

シラカンバの組織培養による
クローン大量増殖法に関する研究

井 出 雄 二

目次

I .	はじめに	1
II .	基本培地の組成および培地の調製	8
III .	初代培養(培養系の確立)	14
A .	メバエを用いた場合	15
1 .	材料および方法	15
2 .	結果および考察	18
B .	苗木を用いた場合	24
1 .	材料および方法	24
2 .	結果および考察	25
C .	成木を用いた場合	35
1 .	剥皮枝条の試験管内さしき法	35
a .	材料および方法	35
b .	結果および考察	36
2 .	葉柄の培養による増殖	44
a .	材料および方法	44
b .	結果および考察	46
D .	結論	56
IV .	継代培養(培養幼植物体からの増殖)	64
A .	試験管内さしき法による増殖	65
1 .	材料および方法	65
2 .	結果および考察	67
a .	発根に対するIBAおよびNAAの影響	67
b .	発根に対するショ糖濃度の影響	70

B.	茎端・えき芽を用いた増殖	74
1.	材料および方法	74
2.	結果および考察	75
a.	茎端を用いた場合	75
b.	えき芽を用いた場合	81
C.	葉柄・茎軸を用いた増殖	88
1.	材料および方法	88
2.	結果および考察	90
D.	結論	101
V.	カルス培養	110
A.	カルスの形成	111
1.	材料および方法	111
2.	結果および考察	113
B.	カルスからの幼植物体の再分化	120
1.	材料および方法	120
2.	結果および考察	122
C.	結論	130
VI.	作出された幼植物体の環境馴化	132
1.	材料および方法	133
2.	結果および考察	134
3.	結論	138
VII.	まとめ	141
1.	得られた成果	141
2.	今後の課題	147
3.	シラカンバの育種における組織培養 によるクローン増殖法の利用	150
	摘要	154
	謝辞	158
	引用文献	159

1. はじめに

林木の組織培養に関する研究は、Schmidt (1924) による針葉樹類の胚培養に始まった。広葉樹においては、Tukey (1933) によるサクラ類のやはり胚培養が最初である。一方、植物体そのものの組織を用いた培養では、1934年に Gautheret がヤナギやヤマナラシ類の形成層から誘導したカルスの継代培養に成功した。しかし、その後の研究の進展は必ずしもはかばかしくなく、本格的な研究の展開は、Wolter (1968) および Winton (1968) によるポプラのカルスからの植物体再分化の成功以降に持ち越された。1970年代に入り、研究者の増加もあって林木の組織培養研究は急速に進むこととなった。現在までに組織培養によるクローン増殖の可能性が認められた樹種は変種等を含め、裸子植物では48種、被子植物では185種にものぼっている (斎藤、1986a)。カルスからの器官再分化の例は、裸子植物では少ないが、胚や子葉の組織から誘導したカルスからの再分化例がいくつか知られている (David、1982)。しかし、いずれの場合も完全な植物体の再分化はみられていない。一方、被子植物では34種の木本植物でカルスからの器官再分化が認められており、そのうち21種で植物体の再分化がみられている (斎藤、1986b)。

以上のように林木の組織培養研究の進展はめざましいが、対象となる樹種のすべての生育段階において、さまざまな組織からの幼植

物体再生や継代培養法が確立し、苗木の生産に至るまでの体系的な増殖方法が確立されている例は見られず、多くの場合限られた材料からの増殖にとどまっているのが現状である。

林木育種に組織培養の手法を応用する効用ないし目的として、Winton and Huhtinen (1976) は、組織からのカルス培養、カルスからの懸濁培養物、カルスや懸濁培養物からの植物体再分化、細胞融合、遺伝子組み替え、生殖細胞や生殖組織の培養などの手法について説明し、主にカルス培養を用いた遺伝的変異の拡大や育種年限の短縮が重要であるとしている。Winton and Huhtinen の考え方は多くの点で農業における組織培養研究の方向を踏襲したものであった。その後、Durzan (1982) は、それら以前の問題として、選抜個体の大量増殖法、また種子採取および種子の品質の良否などにならう造林上のリスクを低減させる方法について言及し、採種園にかわるものとして組織培養による無性繁殖を位置付けた。また、Bonga (1982b) 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、有性繁殖によって得られる森林のポテンシャルは限られていること、樹木のライフサイクルが長く有性繁殖による育種の障害になること、林木は雑種性が高いこと、有性繁殖による数世代にわたる育種によって得られる遺伝的獲得量よりも、選抜個体を無性繁殖して用いた場合の獲得量のほうが大きいこと、クローンの大

量増殖によって育種結果が生産性の向上にすぐに結び付くこと、また、交雑個体や倍数体のように稔性が低い個体の大量増殖が可能になることなどをあげ説明している。Durzan や Bonga の考え方は、組織培養によるクローンの大量増殖法を用いることによって、Libby (1969, 1983) などが示すクローンを林木育種や遺伝の研究に使って行こうとする方向や、クローン林業 (Clonal forestry) の実現に大きな可能性を付与するものといえよう。斎藤 (1985) は、林木育種における育種年限の短縮に組織培養を利用する上で当面推進すべき課題として、優良個体の大量増殖、林木の環境適応力の増大、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点をあげている。このように、組織培養によるクローン増殖技術は、カルス培養や細胞融合などによる新しい育種法を可能にするとともに、従来から行なわれている精英樹選抜による林木育種に新しい可能性をもたらすことが期待されている。

シラカンバは、その生長の早さや生存率の高さ (畑野、1982)、バイオマス変換のしやすさ (佐々木、1984) などの点からバイオマス生産用の早生樹種として最も注目されている樹種のひとつである。シラカンバの遺伝的変異については、種子の産地や家系・クローンによって生育特性に違いがあることが明らかにされており、選抜育種の可能性が指摘されている (畑野、1983, 1984, 1985)。しかし、選

抜された個体のクローン増殖に関しては、古くからさし木による増殖はほとんど可能性がないとされており（本多、1911）、一般につき木による増殖が行なわれている。また、通常用いられる造林用の苗木は実生によって増殖されている。バイオマス生産用の造林材料は、パルプ生産用の造林材料で指摘されているのと同じように、生長が早く生産物が均質でそろっていること（Zobel et al., 1983）が、バイオマスの生産効率を高めるうえで不可欠と考えられる。そのためには目的にあった個体をクローン化し、遺伝的にそろった優良な苗木を大量に供給する必要がある。このような点から、シラカンバのバイオマス生産を目的とした育種を進めていくうえでクローン大量増殖法の開発が不可欠となっており、そのためには、組織培養によるクローンの増殖技術を応用することが適当と考えられる。

シラカンバを始めとする Betula 属における組織培養による増殖に関する研究では、Huhtinen and Yahayaoglu (1974) による Betula pendula の実生の茎軸から誘導したカルスからの幼植物体の再分化の成功が最初の報告である。彼等は、インドール酢酸（IAA）とカイネチンを含む MS 培地（Murashige and Skoog, 1962）上で茎軸から誘導した、若いうちに着花する系統のカンバのカルスを、2,4-ジクロロフェノキシ酢酸（2,4-D）を含んだ MS 培地へ移すことによって幼植物体を得た。このとき再分化した植物体は、その系統

の持つ若いうちに着花するという性質を失っていなかった。

Huhtinen (1978) はまた、Betula pendula の葯培養によって半数体植物を得ることに成功している。McCown and Amos (1979) は、Betula platyphylla var. szechuanica の実生の茎端を培養して得られた幼植物体の節間を再度培養して、その腋芽から多数のシュートを得ることに成功し、それらを有菌状態でさし木して得られた苗木を用いて、苗畑での育苗試験を行っている。しかし、これらの例ではいずれも培養に供する組織（外植体）を得る材料として若い植物体を用いており、実際の精英樹選抜の対象となるような成木の組織を培養に用いて増殖に成功したという報告は現在まで見られない。

また、シラカンバ (Betula platyphylla var. japonica) の組織培養に関しては全く研究がなされていない。本論文はこのような状況を踏まえて、シラカンバの育種や種苗の生産に応用することを目指して、そのすべての生育段階に応じた培養系の確立、幼植物体の大量増殖、カルス培養、幼植物体の環境馴化について研究を行ったもので、各項目の方法を明らかにし、体系的な組織培養によるクローン増殖法を確立することができた。

最初に、野外に生育するシラカンバから組織を分離して無菌的に培養することによって、試験管内に幼植物体を再生させる方法について検討した（初代培養）。組織培養によるクローン増殖法を育種

に利用する場合、成木からの選抜育種や苗木や幼齡木のうちに行う早期選抜にともなうクローン増殖、また、次代検定の効率化のためのメバエを用いた増殖などが考えられ、シラカンバのすべての生育段階での培養方法を確立しておくことが重要であると考えられる。そこで、外植体を得るための材料として、無菌的に発芽させたメバエ、苗木、成木の3段階に齡の異なるシラカンバを用い、それぞれに適した外植体の種類や培養条件について実験的に検討し、試験管内に幼植物体を再生させるための方法を確立した。

次いで、初代培養によって試験管内に再生した幼植物体の組織の一部を、外植体として再度培養することによって、幼植物体を継代的に増殖させるための条件を明らかにした（継代培養）。幼植物体の継代培養は、シラカンバ種苗の急速大量増殖を可能にするほか、系統の保存、カルス培養や細胞育種などのための材料の供給といった面での応用が期待される。そこで、高い遺伝的安定性を確保したまま増殖が可能である、シュート先端部の試験管内さし木法および茎端やえき芽を外植体とした継代培養方法を確立した。また、種苗の急速大量増殖を可能にする方法として、葉柄や茎軸の組織を外植体としこれに苗条原基法を応用するクローン大量増殖法を確立した。

さらに、幼植物体の葉柄や茎軸の組織からカルスを誘導・増殖させるための培養条件を明らかにした。また、形成されたカルスから

苗条原基を誘導することによって幼植物体を再分化させ得ることを示した（カルス培養）。これらは、将来実現が期待される試験管内での育種、すなわち、カルス培養による遺伝的変異の拡大や細胞育種などに不可欠な技術として重要な意味を持つものである。

最後に、増殖された幼植物体が一定の手続きを経ることによって、試験管の外に出した場合においても正常に生育し、実際に苗木として利用できることを明らかにした（幼植物体の環境馴化）。つまりこれによって、上述の組織培養によるクローン大量増殖法は、シラカンバの育種や実地の苗木生産にまで利用できることが示されたといえる。

II. 基本培地の組成および培地の調製

組織培養による種苗の増殖では、培養に用いる培地の成分組成が培養の成否に大きく関係する。草本植物の組織培養には MS培地 (Murashige and Skoog, 1962) が比較的多く用いられるが、木本植物の場合ではその他に、WS培地 (Wolter and Skoog, 1966) や WPM培地 (Lloyd and McCown, 1981) などが用いられる。本研究ではいくつかの基本的な培地を用い、その成分組成の一部分を変更したり、サイトカイニンやオーキシンなどの植物生長調節物質 (植物ホルモン) を種類や濃度を変えて加えることによって、無菌的に発芽させたメバエや苗木、成木などから得られた外植体から出発して、試験管内に幼植物体を再生させる方法について検討した。また、試験管内に再生した幼植物体を材料に用い、新たな幼植物体を増殖させる方法について検討した。ここでは、試験に用いた基本培地についてその成分組成のあらましと調製法についてのべる。

A. 基本培地の組成

表-1 に本研究で用いた4種類の基本培地および MS培地の成分組成を掲げる。このうち IS培地は井出・斎藤 (1985) によって木本植物の増殖用培地として新たに開発された培地である。また、MS1培地と MS2培地は、MS培地の成分組成の一部を変更したものである。

表-1 基本培地の成分組成

組成物	I S ¹⁾	MS ²⁾	MS I ³⁾	MS 2 ⁴⁾	MS 3 ⁵⁾
無機塩					
硝酸アンモニウム NH_4NO_3					825
硝酸カリウム KNO_3	680	1650	1650	1650	790
硝酸カルシウム $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	170	1900	1900	1580	370
塩化カルシウム $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	710	440	440	740	
塩化カリウム KCl	140				
リン酸1カリウム KH_2PO_4	80	170	170	170	85
硫酸カリウム K_2SO_4				280	140
硫酸マグネシウム $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	370	370	370	185
硫酸マンガン $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	8	22.3	22.3	22.3	11.15
硫酸亜鉛 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	9	8.6	8.6	8.6	4.3
硫酸銅 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.25	0.025	0.025	0.025	0.0125
ホウ酸 H_3BO_3	3.2	6.2	6.2	6.2	3.1
ヨウ化カリウム KI	0.8	0.83	0.83	0.83	0.415
モリブデン酸ナトリウム $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25	0.25	0.25	0.25	0.125
塩化コバルト $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$		0.025	0.025	0.025	0.0125
鉄源					
硫酸第一鉄 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$		27.8			
エチレンジアミン4酢酸2ナトリウム $\text{Na}_2\text{-EDTA}$		37.3			
エチレンジアミン4酢酸鉄 Fe-EDTA	5.6		5.6	5.6	2.8
ピタミン・アミノ酸その他有機物					
sym-ジフェニル尿素 sym-Diphenylurea	3				
尿素 Urea	10				
フマル酸 Fumaric acid	1				
ニコチン酸 Nicotinic acid	0.8	0.5	0.5	0.5	0.5
塩酸チアミン Thiamine HCl	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
塩酸ピリドキシン Pyridoxine HCl	0.1	0.5	0.1	0.1	0.1
アスコルビン酸 Ascorbic acid	1				
グリシン Glycine		2			
L-リジン L-Lysine	100		100	100	100
ミオ-イノシトール myo-Inositol	100	100	100	100	100
L-チロシン L-Tyrosine	10				
炭水化物源					
ショ糖 Sucrose	20000	20000	20000	20000	20000

1) 井出・斎藤 (1985) の培地

2) Murashige and Skoog (1962) の培地

3), 4), 5) MS培地の一部を改変

MS培地からの変更点として、MS1の場合は

- ① 鉄源として硫酸第一鉄 ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 27.8mg/lとエチレンジアミン4酢酸2ナトリウム (Na_2EDTA) 37.3mg/lの部分をエチレンジアミン4酢酸鉄 (FeEDTA) の5.6mg/lできおきかえた。
- ② 塩酸チアミンを0.5mg/lから0.1mg/lに引き下げた。
- ③ グリシン2mg/lを除いた。
- ④ L-リジンを100mg/l加えた。

また、MS2の場合は MS1に対して

- ① 硝酸カリウム (KNO_3) を1900mg/lから1580mg/lに少なくした。
- ② 塩化カルシウム ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) を除き、かわってカルシウム源として硝酸カルシウム ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) を280mg/l加えた。
- ③ 硫酸カリウム (K_2SO_4) 280mg/lを新たに加えた。

また、MS3培地は、MS2培地に含まれる無機塩類の量をすべて1/2にした培地である。

IS培地の特徴としては、MS培地と比べ無機塩類の濃度がかなり低いことがあげられる。特に、アンモニウムイオンや硝酸イオン、燐酸イオン、カリウムイオンなど肥料の3要素といわれるイオンの量に大きな違いがみられる。また、IS培地では窒素源として尿素を10mg/l添加しているのも特徴である。培地1リットルに含まれる窒素（尿素中の窒素を含む）、燐、カリウムの量は、IS培地ではそれ

それに、25.02mM、0.59mM、4.00mMであるのに対して、MS1培地では、120.21mM、1.25mM、20.00mMであり、それぞれIS培地に対して4.8倍、2.1倍、5.0倍となっている。木本植物の組織培養では組織の成長が草本植物の場合よりかなり緩慢であることが一般的であり、MS培地など草本の培養に用いられることの多い無機塩類濃度の高い培地では、不定芽の形成やシュート（茎葉）の伸長がうまくいかない場合がしばしば見られる。そこで、木本植物の場合WPM培地のような比較的無機塩類濃度の低い基本培地を用いることがあり、IS培地もそうした培地の一種と考えられる。また尿素は、時間がたつに従ってなんらかのかたちで分解され、組織に窒素源として利用されると考えられ、培養期間中長期にわたって組織に窒素を供給するために加えたものである。いずれの培地でも炭水化物源としては、ショ糖を20g/l加えてある。実際には、これらの基本培地は植物ホルモンであるサイトカイニンやオーキシンなどを加えた培地として、あるいは、それらを全く加えないいわゆるホルモンフリーの培地として用いた。本研究では、サイトカイニンとしては6-ベンジルアミノプリン（BAP）、オーキシンとしては α -ナフチル酢酸（NAA）およびインドール酪酸（IBA）を用いた。その他に、ジベレリン（GA₃）も必要に応じて添加した。

B. 培地の調製

これらの培地の調製は使用のつど行なった。調製に当たっては通常、培地への添加量が多い硝酸アンモニウム (NH_4NO_3) や 硝酸カリウム (KNO_3) などの物質は試薬を直接秤量し、作る培地の総量よりやや少なめの脱イオン水を蒸留した水（以下蒸留水と呼ぶこととする）にマグネチックスターラーを用いてかくはんしながら溶かした。また、添加量が少ない物質については、それぞれの物質（試薬）をあらかじめ一定の濃度に1種類ずつ蒸留水に溶解したものを用意しておき、物質ごとに必要量の成分を含んだ量の溶液をメスピペットを用いて秤量し、蒸留水中に溶かした。そのままでは水に溶けない物質は、小量の1規定あるいは0.1規定の水酸化カリウム (KOH) あるいは水酸化ナトリウム (NaOH) の溶液に溶かした後、蒸留水でうすめ規定濃度に調整したものを用いた。また、継代培地など使用頻度の高い培地の場合には、成分をいくつかのグループにわけ数種類の物質を混合して溶解しておいたストック濃縮液を、それぞれ規定量蒸留水に溶かす方法も必要に応じて用いた。成分を規定量溶かした後、蒸留水を加え全体量を調整し、1規定あるいは0.1規定の水酸化カリウム (KOH) または水酸化ナトリウム (NaOH) と塩酸 (HCl) を用いて、水素イオン濃度 (pH) を5.8に調整した。寒天を用いた固形培地の場合には、pH の調整後1%あるいは0.8%の粉末寒天を

加え、100℃のオートクレーブ内に20-30分置いて寒天を溶かし、直径18mm 長さ180mm (18mm×180mm) の試験管、300mlのコニカルビーカー、直径 40mm 高さ80mm (40mm×80mm)のキャップつき培養びんなどに必要量を分注した。また、液体培地として用いる場合には、寒天は加えずそのまま石英砂を入れたコニカルビーカー中に注いだ。試験管とコニカルビーカーは透明な通気性のあるテトロンフィルムあるいは厚さ15 μ mの家庭用アルミホイルでキャップをした。いずれの場合も培地を分注しキャップをした後120℃のオートクレーブ中で15-20分高圧滅菌し培養に供した。

Ⅲ．初代培養（培養系の確立）

組織培養においては、最初に、野外に生育する植物体の組織の一部を殺菌し無菌的に培養したり、種子を無菌的に発芽させて得られた植物体の組織を培養したりすることによって、試験管内に幼植物体を再生させ培養系を確立する必要がある。これを初代培養、あるいは組織を植物体から切り離して培養するので分離培養という。初代培養で最初に外植体として用いる組織は、野外に生育している植物体から得ることになるために、その表面は多くの雑菌に汚染されているのが普通である。そこで、これらを取り除くための表面殺菌方法を、外植体の種類や培養を開始する時期に応じて確立しなければならない。また、外植体として用いる組織の種類や、外植体からシュートを得るための方法の違い、すなわち、えき芽のような定芽を伸長させてシュートを得るのか、あるいは組織から不定芽を誘導してそれからシュートを得るのかといった違いによって、用いる培地の組成や加える植物ホルモンの種類や量を変え、それぞれに適した培地組成をさがしだす必要がある。

本章では、無菌的に発芽させたメバエや苗畑で育てた1年生の実生苗、また、樹木園に植栽されている成木などいろいろな年齢のシラカンバを材料として、それぞれに適した外植体の種類や滅菌方法、培養に用いる培地や添加する植物ホルモンの種類や量などについて

試験し、試験管内に幼植物体を再生させ培養系を確立する方法について検討した。

A. メバエを用いた場合

1. 材料および方法

本試験では外植体を得るための材料として、無菌的に発芽させたシラカンバのメバエを用いた。用いたのは、山梨県林業技術センターで採種、低温貯蔵してあった富士山麓産のの種子を1985年12月に送付してもらい、そのまま4℃の低温下で貯蔵したものである。必要に応じて貯蔵庫から種子をとりだし、70%エタノール中で5分間、ついで、有効塩素量約1%のアンチフォルミン溶液（次亜塩素酸ナトリウム水溶液）に界面活性剤としてツイン80（Difco）を数滴加えた溶液中で15分間、さらに、3%過酸化水素水中で15分間、それぞれマグネチックスターラーを用いてかくはんしながら表面殺菌を行った。クリーンベンチ内で過酸化水素水中から種子を葉さじを用いてすくいだし、滅菌ろ紙上にひろげ風乾した。これらの種子は、試験管内の寒天培地上に約10粒ずつ置床した。播種した試験管を約1,000luxの24時間日長の蛍光灯照明下におき、更に発芽を促すため30℃8時間、20℃16時間の変温条件下で培養した。

まきつけ後5日目から発芽した種子がみとめられた。まきつけ15

日目にメバエの下胚軸の長さが7mm-10mmになったところで、発芽用の培地からメバエをぬきとり、下胚軸を5-6mm残して幼根の部分を滅菌した安全カミソリを用いて無菌的に切り除いた。この時用いたメバエからは初生葉はまだ展開していなかった。子葉と下胚軸の一部をつけたメバエは、試験管内の寒天培地に下胚軸を約2mm培地中にさしこむようにして置床した。

これらの試験管は、約5000luxの蛍光灯照明下、25℃の恒温条件下において経過を観察した。照明は培養室の都合で24時間連続照明とした。

表-2 に本試験で用いた培地を掲げる。発芽床として用意した培地は、IS培地の成分のうちショ糖を除いたものである。また、根の部分を除いたメバエを培養する培地として用意したのは、IS培地とIS培地のFeEDTAの量を変更した2種類の培地に、BAPを0.8mg/l加えた全部で3種類である。また、得られたシュートの発根培地として、植物ホルモンなどを全く含まない、ホルモンフリーのIS培地を用意した。すべての培地は、それぞれ18mm×180mmの試験管に約20mlずつ分注し、オートクレーブにより高圧滅菌した、0.8%寒天濃度の培地である。

表-2 メバエを用いた初代培養のために用意した培地

期待する効果	基本培地	培地記号	基本培地からの 変更点	添加した植物ホルモンの種類と量(mg/l)		その他
				BAP		
種子の発芽	IS培地	G	シヨ糖 0g/l	-	0.8%寒天培地	
メバエからの シュートの分 岐・伸長	"	S1	なし	0.8	"	"
	"	S2	FeEDTA 28mg/l	0.8	"	"
	"	S3	FeEDTA 56mg/l	0.8	"	"
シュートの発根	"	R	なし	-	"	"

2. 結果および考察

幼根の部分を切除して培地にさしつけられたメバエは、初めうすい緑色を呈していた下胚軸の部分がさしつけ直後から変色をはじめ、数日中に赤褐色を呈するようになった。同時に上胚軸の伸長と初生葉の展開がはじまった。また、下胚軸の切り口はやや肥大しはじめ、1か月後には直径3-8mmの緑色のカルスを形成した。これらの現象は、培地中のFeEDTAの量にかかわらず認められた。

その後、どの培地上でも新たなシュートの伸長と葉の展開が見られた。この培地での培養を始めてから10日目ごろから、子葉の葉えきの部分から1-2本の新たなシュートが発芽し始めた。ここでは、最初にメバエから伸長した真中のシュートを主シュート、子葉の葉えきから伸長したシュートを、副シュートと呼ぶことにする。これらの副シュートは主シュートに比べ、その後の生長は全体に劣っていた。しかし、根を除いたメバエをさしつけてから1か月後には、外植体によっては副シュートが主シュートに近い長さに伸長したものも見られた（図-1）。培養開始1か月目における、形成された副シュートの数および生長の様子を、培地別に表-3に示す。FeEDTAの量が基本量である5.6mg/lの培地では分岐したシュートの数は平均1.1本で、FeEDTAの量が多い他の2種類の培地よりも少なかった。また、主シュートの長さや、分岐したシュートの長さも他に比べ劣ってい

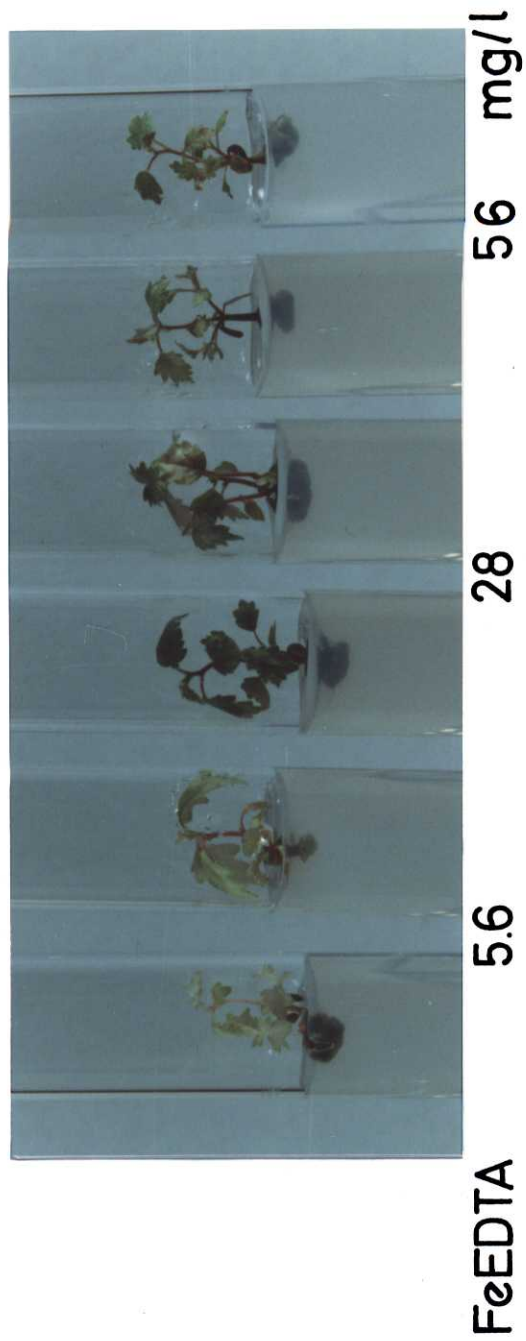


図-1 FeEDTAの量を変えた3種類のIS培地で
培養した幼根部を切除したメバエ
培養開始1か月後
試験管の直径は18mm

表-3 メバエの培養におけるシュートの分岐と伸長(培養開始1か月後)

培地記号	FeEDTAの量(mg/l)	分岐した副シュートの数(本)	主シュートの長さ(mm)	副シュートの長さ(mm)
S 1	5.6	1.1	7.4	1.7
S 2	28.0	1.7	9.7	4.9
S 3	56.0	1.6	8.5	3.7

た。更に、他の培地上で展開した葉は、濃い緑色を呈し、小さめで厚手であったのに対し、この培地上で展開した葉はうすい黄色を呈し、大きめで薄かった（図-1）。FeEDTAを28mg/l含む培地では、シュートの分岐数ではFeEDTAを56mg/l含む培地とほとんど変わらなかったが、主シュートの長さでは9.7mm、また、副シュートの長さでは4.9mmと最も良い生長を示した。FeEDTAの量が56mg/lの培地の場合には、シュートの伸長は前者に比べやや劣った。また、展開した葉は前者に比べ鋸歯の切れ込みが深くなった。このように、シラカンバのメバエの培養では、培地中のFeEDTAの量が重要な意味を持っていることが示された。FeEDTAの量が少ない培地ではメバエの生長が劣ることや葉の黄化現象が起こったことなどは、鉄の欠乏が直接の原因と考えられる。しかし、この場合FeEDTAに含まれる鉄イオンとキレート（EDTA）のどちらが積極的な役割を果たしているのかは明らかではなかった。

さらに1か月後、FeEDTAを28mg/l含む培地上の主シュートの長さが約2cmになった時に、主シュートと副シュートを切り取って、発根培地にさしつけた。これらは、1か月後には発根して幼植物体が再生した（図-2）。

この試験の結果から、図-3 に示す一連の手続きによって、1本のメバエから2-3本の幼植物体を再生させ得ることがわかった。この



図-2 1本のメバエから再生した3本の幼植物体
発根培地へ移植1か月後

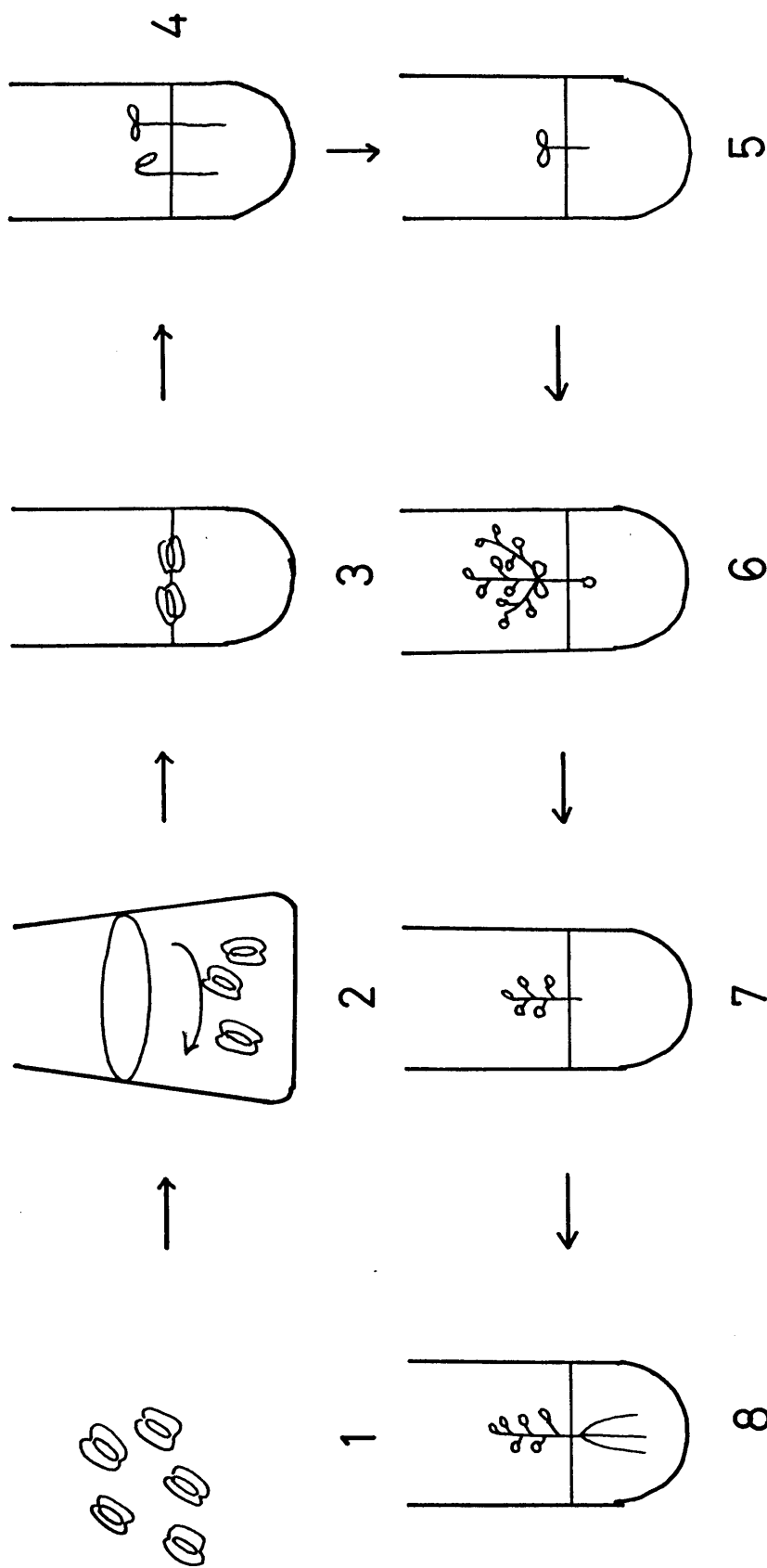


図-3 無菌的に播種して得られたメバエを用いた初代培養法

1. シラカンバの種子 2. 表面殺菌 3. 発芽用の培地に播種する 4. 発芽したメバエ 5. メバエの幼根部を切除してシュートの分岐を促す培地へさしつける 6. 子葉の葉えきからの副シュートの伸長 7. シュートを切り取って発根培地へさしつける 8. 発根して再生した幼植物体

とき、用いる培地としては、IS培地のFeEDTAの量を通常の5倍、28mg/lにしたものが適当であると結論される。この方法によれば、発芽したばかりのメバエから遺伝的に全く同じ複数の苗木を生産できるので、1つの遺伝子型を異なった立地で検定することが容易になる。また、一方の苗をアイソザイムなどによる遺伝子の分析に用い、残りの苗を野外に植えて検定するといった場合にも有効である。

B. 苗木を用いた場合

1. 材料および方法

供試材料としてシラカンバの1年生実生苗を用いた。これらの苗木は、農林水産省林業試験場（以下単に林業試験場と記す）構内のおよそ15年生のシラカンバ成木から1984年10月に採取した種子を、1985年3月に静岡県林業試験場の苗畑に播種し1年間養苗したものである。苗木は1985年11月に播種床から掘り取り仮植し1986年3月に床替えをおこなった。これらのうち約30-50cmに育った複数の苗木から、1986年5月中旬に、新しく伸長した長さ5-10cmで基部の直径2-3mmの小枝を、葉をつけたまま1個体あたり2-5本ずつ採取した。この枝から、葉柄の一部をつけた長さ約20mmの小片をはさみを使って切り取った。枝の小片は個体の区別はせずすべて混合し、70%エタノール中で5分間、次いで3%過酸化水素水中で15分間、それぞれ

マグネチックスターラー上でかくはんしながら表面殺菌をおこなった。クリーンベンチ内で滅菌したピンセットを用いて過酸化水素水中からとりだした枝の小片は、滅菌ろ紙の上にひろげ風乾した後、滅菌した安全カミソリを用いて表面殺菌の際傷んだ両端を1-2mmずつきりもどし、用意した寒天培地にさしつけた。さしつける深さは約5mmとした。

用意した培地はIS培地にサイトカイニンやオーキシンをいろいろな濃度で加えた、表-4 に示す11種類の寒天培地である。これらは、それぞれ18mm×180mmの試験管に約20mlずつ分注し、オートクレーブにより高圧滅菌した後培養に供した。また、枝の小片から伸長したシュートをきりとり発根させるための培地として、MS2培地にオーキシンとしてNAAを0.2mg/l IBAを0.5mg/l 加えた0.8%寒天濃度の培地を、40mm×80mmの培養びんに約20mlずつ分注した後オートクレーブにより高圧滅菌したものを用意した。

すべての培養物は、培養期間中 24時間日長、約5000luxの蛍光灯照明下、25℃の恒温条件下で培養した。

2. 結果および考察

培養開始から2週間目の調査で植え付けた外植体の45%が雑菌やカビに汚染されていた。これらは培養から除外したが、ここで行っ

表-4 苗木を用いた初代培養のために用意した培地

期待する効果	基本培地	培地記号	添加した植物ホルモンの種類と量(mg/l)			その他
			BAP	NAA	IBA	
えき芽からの	IS培地	S1	-	-	-	0.8%寒天培地
シュートの伸長	"	S2	0.4	-	-	"
	"	S3	0.8	-	-	"
	"	S4	1.2	-	-	"
	"	S5	-	0.002	-	"
	"	S6	-	0.02	-	"
	"	S7	-	0.2	-	"
	"	S8	-	-	0.5	"
	"	S9	-	0.002	0.5	"
	"	S10	-	0.02	0.5	"
	"	S11	-	0.2	0.5	"
シュートの発根	MS2培地	R	-	0.2	0.5	"

た外植体の滅菌方法によれば約半数の外植体は汚染を免れており、表面殺菌方法としては一応目的を達し得たと考えられた。

枝の小片の中には、培養開始後3日目には葉柄の付け根（葉えき）から、えき芽が発芽しはじめる（ふくらみはじめる）ものがみられた。培養開始後1週間目にはほとんどの外植体で、えき芽の発芽やシュートの伸長が見られた。培養開始後2週間目には、図-4 に示すように葉の展開したシュートも多く見られ、一部には発根培地へ移せる大きさになっているものが見られた。培地ごとの雑菌等の汚染を免れた外植体の数（以後残存外植体数と呼ぶこととする）、えき芽の発芽の有無、2mm以上伸長したシュートの数および長さ、展開した葉の枚数を調査した。その結果を表-5 に示す。これらからは、植物ホルモンを全く加えなかった場合の結果については残存外植体数が1本であるため判断できないが、BAPを加えた場合には、その量が1.2mg/lのときのシュートの伸長した外植体の割合が低く、また、その生長も劣っていた。しかし、BAPが0.4mg/lや0.8mg/lの場合にはある程度の生長がみられ、培養2週間で発根培地に移せるようなシュートが得られた場合もあった。NAAのみの添加では、それぞれの濃度で発根培地へ移植可能なシュートが1-2本得られたが、濃度の適否についてははっきりした結論がえられなかった。NAAとIBAを組み合わせで加えた場合、NAAの量が0.02mg/lのときに、他の10

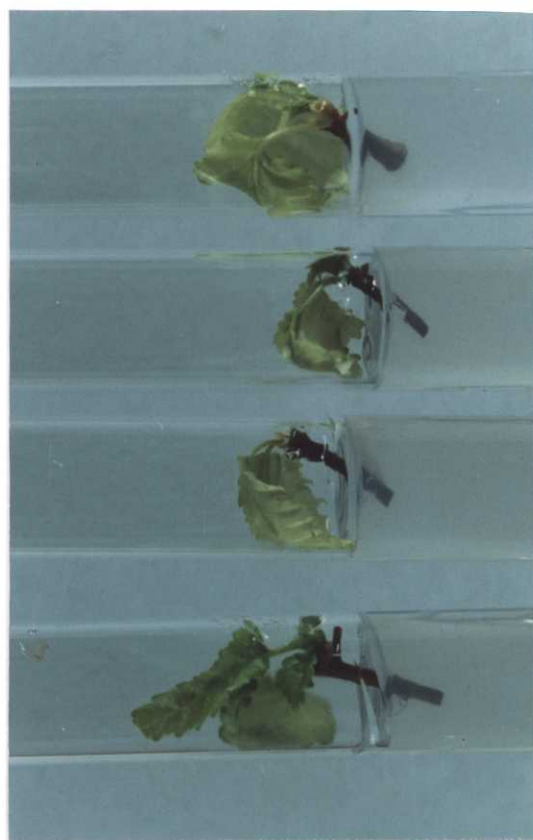


図-4 外植体上のえき芽からのシュートの伸長

培養開始20日目

試験管の直径は18mm

表-5 培地ごとのえき芽の発芽とシュートの伸長・葉の展開(培養開始2週間後)

培地記号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11
培養外植体数(本)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
残存外植体数(本)	1	6	4	8	5	7	8	6	5	6	4
えき芽の発芽率(%)	100	83	100	88	80	71	88	100	100	100	100
シュートの伸長した 外植体率(%)	100	67	75	25	20	29	38	0	60	67	50
平均シュート長(mm)	2	8	3	2	2	5	11	-	2	9	3
葉の展開した外植体 率(%)	0	40	50	0	25	20	29	0	0	67	25

種類の培地のどれよりも多くの発根培地へ移植可能なシュートが得られた。この試験では、残存外植体数が少ない培地があること、複数の個体から得られた外植体を込みにして扱っていることや採取した枝の長さや位置などの条件が様々であるため、シュートの伸長にばらつきが大きく、定量的に培地の適否をとらえることは難しい。しかし、表-5 に示されるシュートの伸長した外植体数や葉の展開状況をみると、外植体からのシュートの伸長には、BAPを0.4mg/lあるいは0.8mg/l含む培地やIBAを0.5mg/l NAAを0.02mg/l含む培地が比較的有効であるように見える。特に、IBAを0.5mg/l NAAを0.02mg/l含む培地については、シラカンバの苗木のえき芽からのシュートの伸長に適していると結論してさしつかえないと考える。

さらに、この試験では培養開始18日目ごろから一部の外植体の下端部の切り口から発根し、そのまま幼植物体が再生した例が見られた(図-5)。その後発根する外植体はさらに増加し、培養開始3週間後には、S4、S5、S7、S8、S10の各培地で複数の発根した外植体が認められた。発根した根の数は1-2本のものが多く、最大でも3本であった。発根した外植体はオーキシンを添加した培地で多かったが、BAPを含む培地でも発根しており、特にこれといった最適培地は認められなかった。培地に含まれる植物ホルモンの働きによるよりも、むしろ、外植体に内在するオーキシン類の働きによるところが大き



図－ 5 外植体から直接発根して得られた幼植物体
培養開始40日目
試験管の直径は18mm

いように想像された。

そのような直接の発根の見られた外植体とは別に、培養開始20日後にシュートが良く伸長していた外植体から滅菌した安全カミソリを使ってシュートをきりはなし、用意しておいた培養びん内の発根培地に1本ずつさしつけた。しかし、これらのシュートの多くはその後黄変しはじめやがて枯れてしまい、一部しか発根に至らなかった(図-6)。このことから、発根した幼植物体を得るためには、上に述べたように外植体から直接発根を促す方法が適当と結論される。

この試験で示された、1年生苗木からの幼植物体再生の過程は図-7のようにまとめられる。ここで示した節間部の小片についてえき芽からシュートを伸長させる増殖方法は、Castanea属 (Chevre et al., 1983, Vieitez et al., 1983, Sanjose et al., 1984) や Quercus属 (Chalupa, 1984, Vieitez et al., 1985) での成功例が知られている。しかし、いずれの場合にもえき芽から伸長したシュートは切り取って発根培地へ移し幼植物体を再生しており、本試験で見られたような、外植体からシュートの伸長と発根が同時に起こるという例は見られない。この方法では発根培地の調製やシュートの移植が省略できるため、効率的な増殖が可能である。また、この方法によって1年生苗木だけでなく、比較的若いシラカンバのクローン増殖も可能と考えられ、若齢木を対象とした早期選抜に有効な手

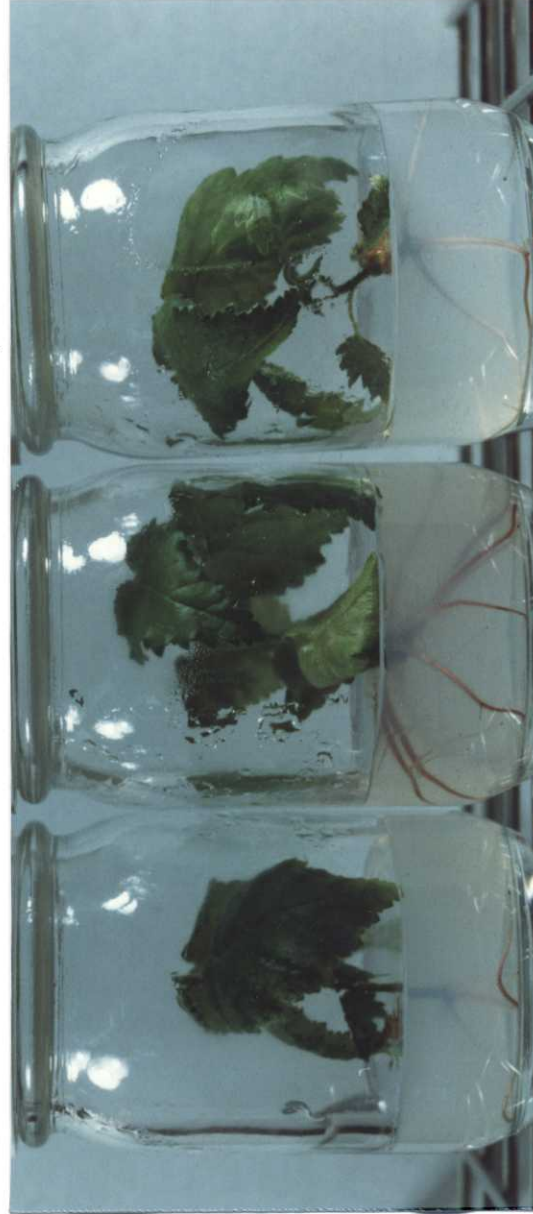


図-6 発根培地にさしつけたシュートから
発根して得られた幼植物体
発根培地にさしつけ1か月後
培養びんの直径は4cm

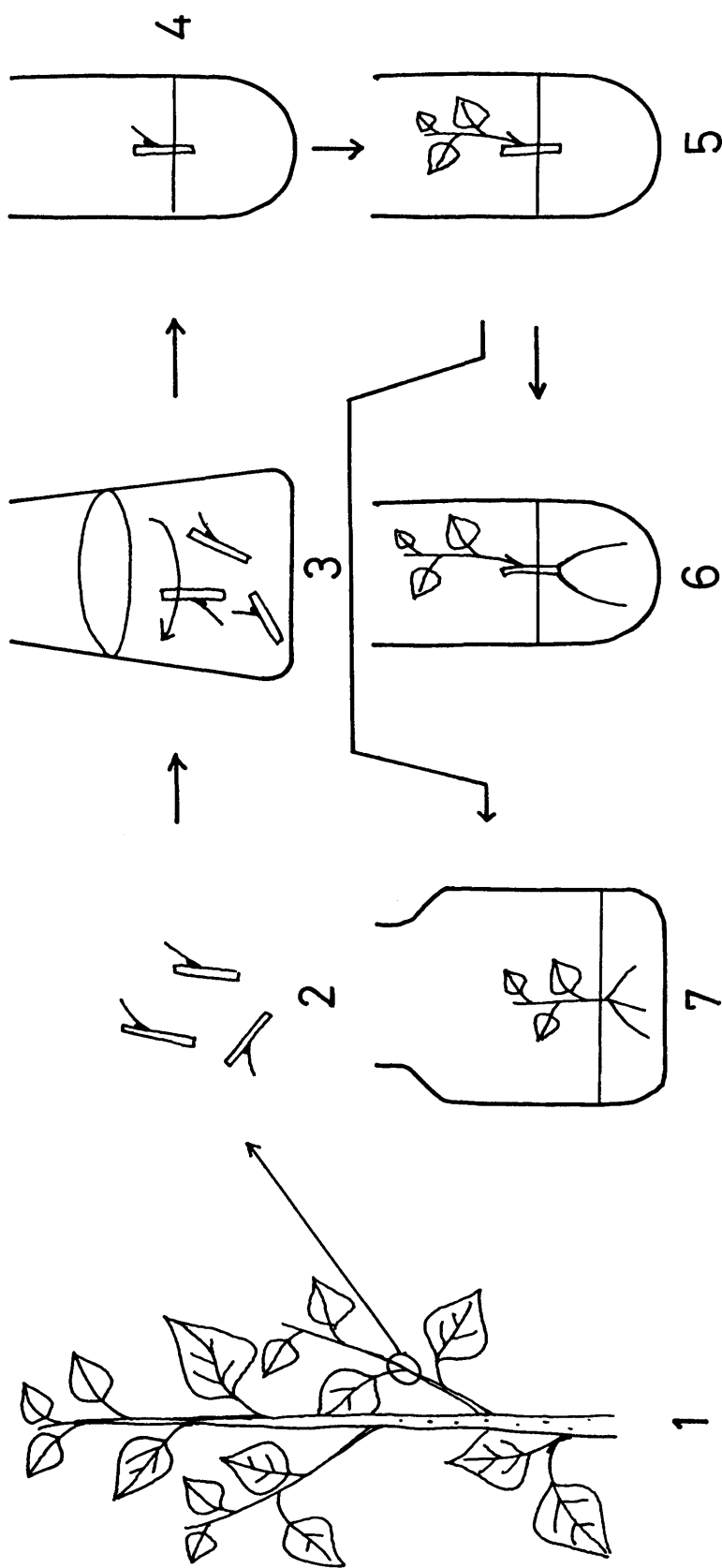


図-7 1年生苗木を用いた初代培養法

1. 播種1年生の苗木 2. 枝からえき芽をつけた小片を採取
 3. 表面殺菌 4. 外植体をシュートの伸長を期待する培地にさしつける 5. えき芽からのシュートの伸長 6. 外植体から直接発根して幼植物体が再生する 7. シュートを切り取って発根培地上での幼植物体の再生

段を提供するものと言えよう。

C. 成木を用いた場合

1. 剥皮枝条の試験管内さし木法

a. 材料および方法

外植体を得る材料として、林業試験場構内の樹木園に生育するおよそ15年生のシラカンバの成木を用いた。1984年の5月中旬に、前年に伸長しすでに新しい枝葉を伸ばしている、直径8-10mmの枝を供試木から採取した。これらの枝は、15-20cmの長さに切りそろえ、表面殺菌のために70%エタノールをスプレーした後、クリーンベンチ内に放置して風乾した。表面に吹き付けられたエタノールが乾いた後、これらの枝の表皮をメスを用いて形成層に達するまで強く剥ぎ取った。このとき、メスは滅菌のために2%炭酸ナトリウム水溶液中ですすぎながら用いた。表皮を剥ぎ取られた枝は、アルコールランプの炎であぶって滅菌した剪定ばさみで、長さ約2cmの小片に切り分けた。これらの剥皮された枝の小片を、用意してあった試験管内の寒天培地にぼぼ中程までさしつけた。

培地に植え付けられた外植体は、25℃の恒温条件下、16時間日長、およそ5000luxの蛍光灯照明下に置いて経過を観察した。

本試験においては、剥皮枝条の小片から不定芽を誘導するための

培地として、表-6 に示すように、サイトカイニンとしてBAPを異なる濃度で加えた4種類のIS培地を用いた。これらの培地は1%寒天濃度の培地とした。また、不定芽から伸長したシュートを発根させ幼植物体を得るための発根培地として、MS2培地およびMS3培地にオーキシンとしてIBAとNAAを加えた4種類の培地を用意した。これらは、300mlのコニカルビーカーに石英砂を約120ml入れた中に、約60mlずつ分注した液体培地である。

b. 結果および考察

培地にさしつけた剥皮枝条のうち、約60%は雑菌あるいはカビによって汚染されていた。逆に、表面殺菌法としてはエタノールをスプレーしただけであることを考えると剥皮による雑菌の除去効果がかなり大きかったともいえる。培養開始から2週間後には、残った外植体の培地から出ている部分は 図-8 に示すようにうす緑色をしたカルスにおおわれ始めた。カルスの形成はBAPを含まない場合やBAPの濃度が0.4mg/lのときにはそれほど顕著でなかったが、BAPが0.8mg/lあるいは1.2mg/l含まれる培地では比較的旺盛であった。さらに2週間後には、どの培地上の剥皮枝条の小片もカルスで覆われ、特に、BAPが0.8mg/lあるいは1.2mg/l含まれる培地ではカルス上に不定芽が形成され2-3本のシュートが伸長しはじめた。しかし、BAP

表-6 剥皮枝条の試験管内さしき法による増殖のために用意した培地

期待する効果	基本培地	培地記号	添加した植物ホルモンの種類と量(mg/l)			その他
			BAP	NAA	IBA	
剥皮枝条からの 不定芽の誘導	MS1	S1	-	-	-	1%寒天培地
	"	S2	0.4	-	-	"
	"	S3	0.8	-	-	"
	"	S4	1.2	-	-	"
シュートの発根	MS2	R1	-	0.02	0.5	液体培地
	"	R2	-	0.2	0.5	"
	MS3	R3	-	0.02	0.5	"
	"	R4	-	0.2	0.5	"

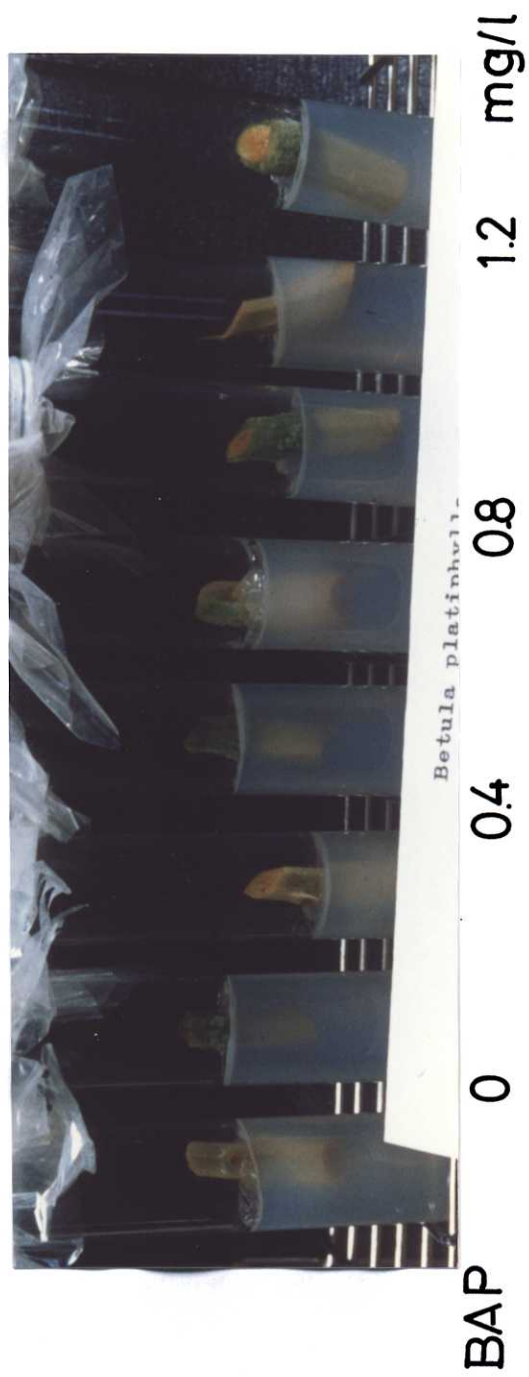


図-8 培養開始から2週間後の外植体の様子
試験管の直径は18mm

を含まない場合やその量が0.4mg/lであった培地では、その後もシュートの形成は見られなかった。表-7 にそれぞれの培地でのシュートの形成率を示してある。これによれば、シュートはBAPが1.2mg/lのときのほうが0.8mg/lのときよりもやや多くの外植体において形成されたことがわかる。また、図-9 に見られるように、BAPが1.2mg/lのときのほうがその後のシュートの伸長も多少良いように思われた。これらのことから、剥皮枝条の試験管内さしき法において不定芽の形成を期待する培地としては、MS1培地にBAPを1.2mg/l添加したものが有効であること結論された。

シュートは伸長開始から1か月後には、その長さは1-2cmになり2-3枚の葉が展開した。そこで、これらのシュートを滅菌した安全カミソリで外植体から無菌的に切り離し、発根培地にさしつけた。このとき発根培地に移したシュートの数は全部で7本で、4種類の発根培地のそれぞれに対して、おのおの1-2個のコニカルビーカーを用意し、それぞれに1本ずつのシュートをさしつけた。発根培地に移植後1か月目に、R2を除いた残り3種類の培地で発根している個体が観察された（図-10）。発根した個体のその後の生育状況は、3種類のいずれの培地でもほぼ同じであり、発根培地へ移植後3か月日には約10cmの幼植物体に育った（図-11）。ここでは、得られたシュートの数が少なかったため、それぞれの発根培地がシュートの発根や

表-7 剥皮枝条からの不定芽の形成(培養開始4週間後)

培地記号	S 1	S 2	S 3	S 4
培養外植体数(本)	24	24	24	24
残存外植体数(本)	12	8	7	9
不定芽の形成された外植体率(%)	0	0	43	56

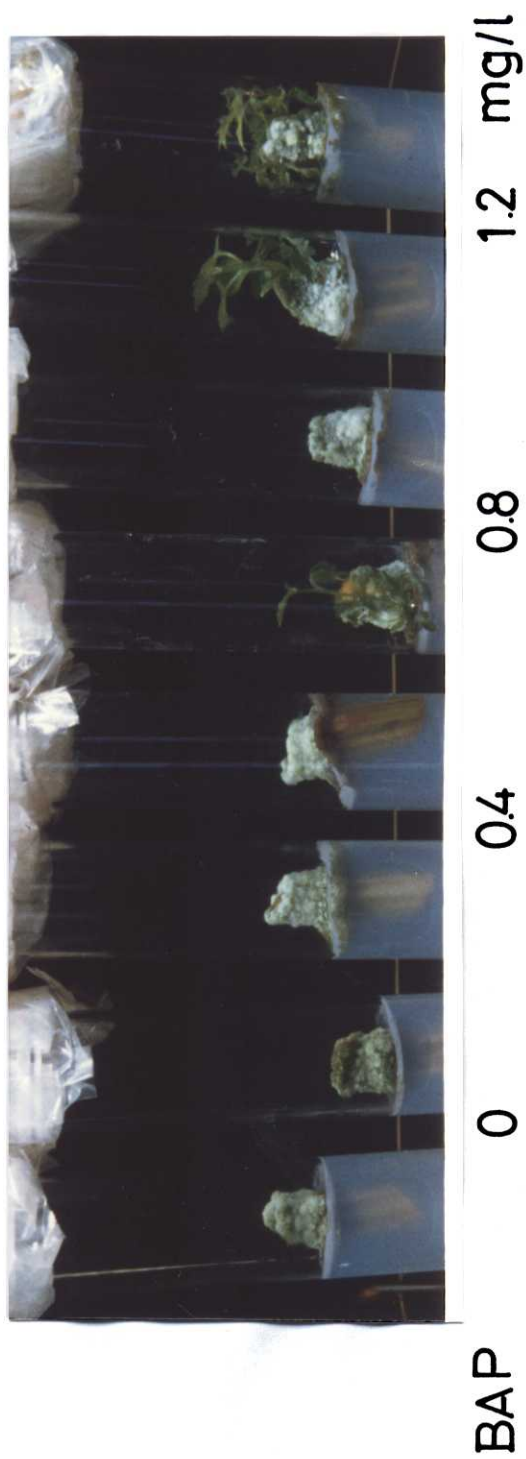


図-9 外植体からのシュートの形成

培養開始40日目

試験管の直径は18mm



図－１０　　剥皮枝条上に分化した不定芽から伸長した
シュートが発根して得られた幼植物体
発根培地にさしつけ1か月後



図－１１　発根培地へさしつけ後3か月後の幼植物体

生育に及ぼす影響を確かめることができなかった。

以上のように、斎藤（1983）の剥皮枝条の試験管内さし木によるクローン増殖法が、シラカンバにも適用できることが示された。そのあらましは、図-12のようにまとめられる。Betula属の樹木の組織培養による増殖では、成木の組織から幼植物体が再生した例はこれまでになく、本研究で初めて成功したものである。これにより、シラカンバ成木のクローン増殖が極めて容易に行えるようになり、その選抜育種に大きな進展を約束するものであると考える。

2. 葉柄の培養による増殖

a. 材料および方法

林業試験場の樹木園に生育するおよそ15年生のシラカンバ成木から、1984年の5月下旬に葉柄をつけたまま葉を採取した。これらの葉から、はさみを用いて葉の一部をつけて葉柄を切り取った。葉柄は、表面殺菌のために70%エタノール中で3分間、次いで、3%過酸化水素水中で15分間、それぞれマグネチックスターラーを用いてかくはんした。クリーンベンチ内で過酸化水素水中から取り出した葉柄は、滅菌ろ紙上で風乾した後、表面殺菌の際傷んだ両端部を滅菌した安全カミソリで1-2mm切り落とした。このようにして用意した長さ約 1.5cmの葉柄を外植体として、約20mlの寒天培地を分注した

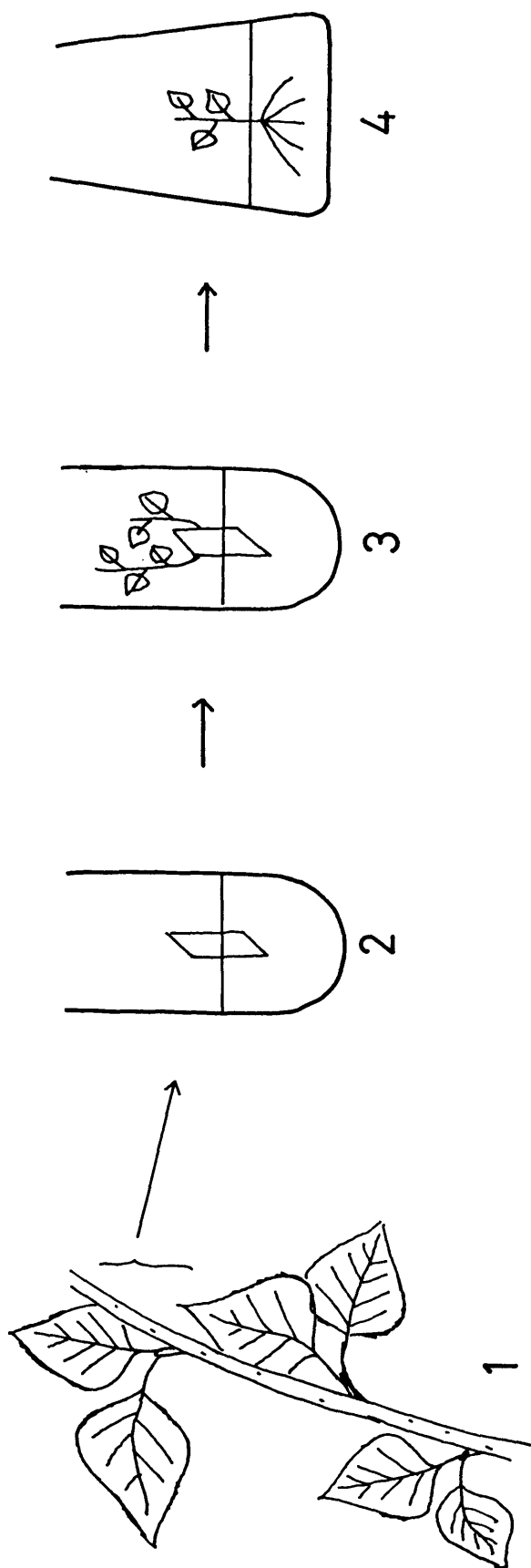


図-112 剥皮枝条の試験管内さし木法による初代培養

1. 直径8-10mmの1年生枝 2. 剥皮した枝の薄片を不定芽の分化を期待する培地にさしつける 3. 外殖体からの不定芽の分化とシュートの伸長 4. シュートを切り取って発根培地にさしつけ幼植物体を再生させる

18mm× 180mmの試験管内に、全長の半分程度が培地中に埋まるようにさしつけた。

培養期間中、試験管内にさしつけられた外植体は、25℃の恒温条件下、16時間日長、約5000luxの蛍光灯照明下に置いて経過を観察した。

本試験において外植体をさしつけるために用意した培地は、IS培地のFeEDTAの量を5.6mg/lから85mg/lに増やしたものである。それに、表-8 に示すようにサイトカイニンとしてBAPを4種類の異なる量で加え、外植体からの苗条原基の分化を期待する培地とした。また、形成された苗条原基塊から、シュートを伸長させるための培地として、FeEDTAが5.6mg/l含まれるもとのIS培地にBAPを0.8mg/l加えた培地を用意した。以上の培地は1%寒天濃度の培地とし試験管に分注した。発根培地としては、MS1培地にオーキシシンとしてNAAを0.02mg/l加えたものをやはり1%寒天濃度の培地とし、これを300mlコニカルビーカーに約60mlずつ分注して用意した。

b. 結果および考察

本試験では、雑菌やカビによる外植体の汚染は全くみられなかった。このことから、ここで用いた表面殺菌方法はこの時期の葉柄に対しては有効であったと認められる。しかし、葉柄上部の葉の一部

表-8 葉柄の培養のために用意した培地

期待する効果	基本培地	培地記号	基本培地からの 変更点	添加した植物ホルモンの種類と量 (mg/l)			その他
				BAP	NAA		
苗条原基の分化	I S 培地	S 1	FeEDTA 85mg/l	-	-		1%寒天培地
	"	S 2	"	0.8	-		"
	"	S 3	"	1.2	-		"
	"	S 4	"	1.6	-		"
苗条原基からの シュートの伸長	"	E	なし	0.8	-		"
シュートの発根	MS1培地	R	なし	-	0.02		"

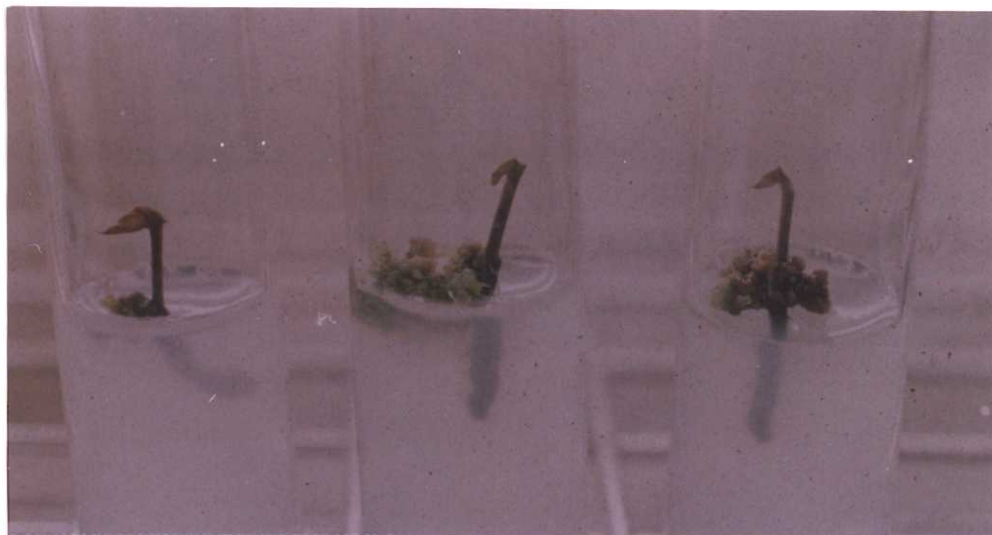
が残っていた部分は、表面殺菌の際にかなり傷んだようで、安全カミソリで切り戻したにもかかわらず、上部が褐変した外植体が多くみられた。

外植体の培養開始後45日目に、BAPが0.8mg/l含まれる培地で培養した葉柄の中程、培地表面に接する部分に濃い緑色をした苗条原基と思われる組織が分化しているのが観察された（図-13）。更に1週間たってから、その他のBAPを含んだ培地上の外植体からも同じようにして苗条原基が分化した。しかし、BAPを含まない培地で培養した外植体からはその後も苗条原基の分化は認められなかった。これらのことから、葉柄の培養において苗条原基の分化を誘導するための培地としては、含まれるFeEDTAの量を85mg/lにしたIS培地にBAPを加えたものが有効であると結論された。特に、その分化の開始が早いことからいって、BAPの量としては0.8mg/lが適当ではないかと推測される。

形成された苗条原基はその後シュートの伸長を伴わず増殖を続けたが、早いうちに形成された古い苗条原基は増殖後約2週間の間に徐々に褐変枯死してしまった。しかし、そのような枯死にもかかわらず増殖を続けた苗条原基は、最初の苗条原基が形成されてから約35日かかって直径約5mmの苗条原基の塊を形成した（図-14）。このことは、苗条原基の増殖する速さが、枯死していく速さよりも速かつ



図－１３　葉柄組織からの最初の苗条原基の形成
培養開始45日目
試験管の直径は18mm



図－14 塊状の苗条原基の形成

培養開始80日目

試験管の直径は18mm

たことを意味している。ここで、メスを用いて塊状の苗条原基を10個の小塊に分割し、それぞれを、シュートの伸長を期待するIS培地へ移した。移植直後から分割した1つ1つの小塊からそれぞれ10-20本のシュートが伸長しはじめ、移植後20日目には、図-15に示すように、それらの各シュートは2-3枚の葉をつけ、約1cmの長さになった。すなわち、1本の外植体からは、100-200本のシュートが形成されたことになる。しかし、このときそれぞれの苗条原基の小塊から伸長したシュートのすべてが同じような伸びを示したわけではなく、少数のシュートだけが良く伸び他の多くはあまり伸長しなかった。これは、頂芽優勢に類似した現象と考えられた。

伸長したシュート塊は、更に4-5本ずつのシュートの塊に分け、発根培地を分注したコニカルビーカー1個に対して、5個ずつ置床した。これらのシュートの塊からは置床2-3日後には発根しているのが観察された。シュートの塊は、その後1か月の間に3-5枚の葉を付けた4-5cmの幼植物体群に生長した（図-16）。この幼植物体群をばらばらにしてみたところ、シュートの1本々が発根して幼植物体となっていることが確認された。

以上の経過から、FeEDTAの量を多くしたIS培地にBAPを加えた培地で葉柄を培養することによって形成された苗条原基の塊を、IS培地にBAPを0.8mg/l加えた培地に移すことによってシュートを伸長さ

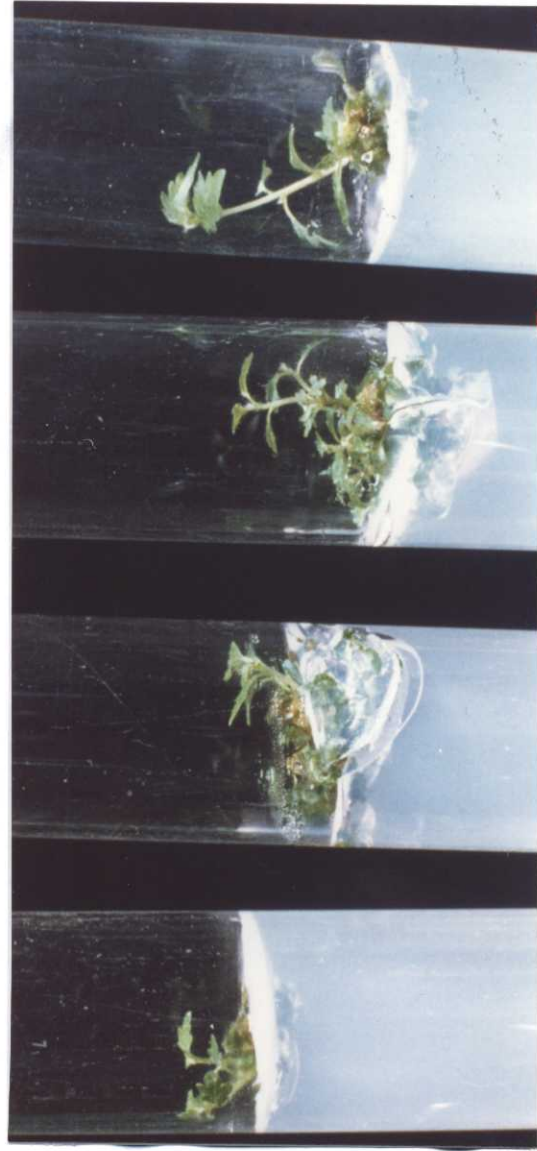


図-15 小さく分割した苗条原基の塊
からのシュートの伸長
分割移植後20日目
試験管の直径は18mm



図－１６　１本の試験管内で伸長したシュート塊から
発根して得られた幼植物体群
発根培地へ移植後１か月目

せ、さらにNAAを加えたMSI培地に移し発根させるという、図-17 に示される一連の手続きによって、多数のシラカンバを増殖することが可能であることが示された。

このように、成木の葉柄を外植体として培養し幼植物体の再生に成功した例は他の樹種では見られない。ここでの幼植物体の再生の様子は Huhtinen and Yahyaoglu (1974) によるシュートの形成状態に類似しているが、ここでは苗条原基が直接外植体から形成されたのに対して、Huhtinen and Yahyaoglu の場合には不定芽はカルス経由で分化している点が異なっている。苗条原基による増殖法は Tanaka and Ikeda (1983) によって Haplopappus の培養において初めて示された。苗条原基はシュートの伸長を起こすことなく増殖し、培養条件を変えることによって必要に応じてシュートを伸長させることができるという。また、一般に苗条原基は茎頂細胞から誘導されるものとされており、現在のところ茎頂細胞起源以外の苗条原基の形成は報告されていない（田中・谷口、1985、谷口、1985、新関・島田、1985、脇塚、1986）。シラカンバの場合には茎頂組織からではなく葉柄組織から苗条原基が誘導されたのであるが、上に述べたように、シュートの伸長を起こさずに増殖し培養条件を変えることによってシュートを伸長させることができるという、苗条原基の持つ基本的特徴をそなえていることから、茎頂組織以外の組織から

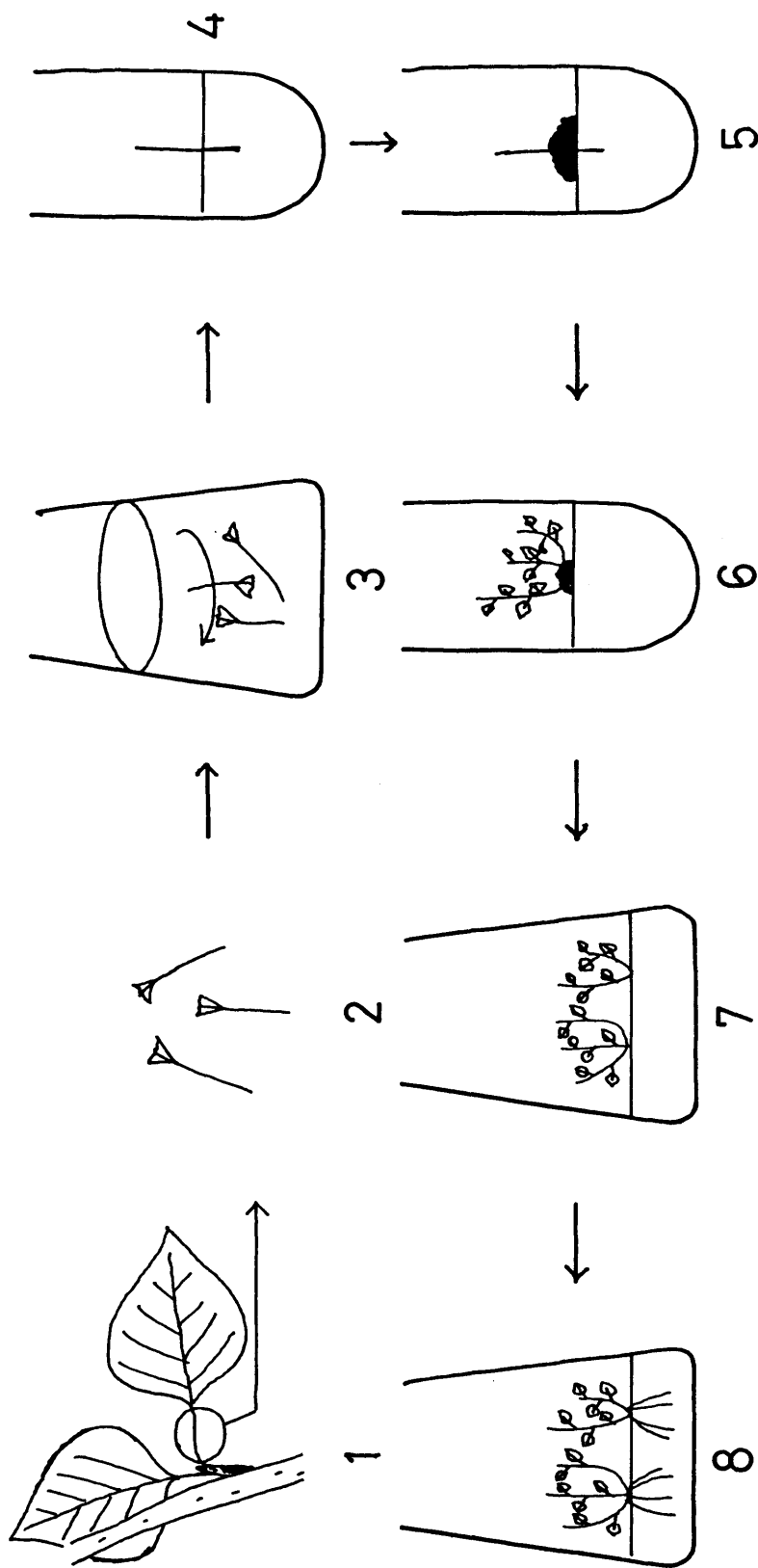


図-17 葉柄の培養による初代培養

1. 成木の葉柄をつけた葉を採取 2. 葉の一部をつけた
葉柄組織 3. 表面殺菌 4. 外植体を苗条原基の分化を期
待する培地へさしつける 5. 葉柄組織から苗条原基の
塊が形成される 6. 塊状苗条原基を分割し別の培地に
移しシュートを伸長させる 7. シュートの塊を分割し
発根培地へ移植 8. シュートが発根して得られた幼植
物体群

形成されたものであっても、広義の苗条原基法による増殖と考えてさしつかえない。苗条原基法によって増殖される植物体は、増殖速度が速いにもかかわらず遺伝的安定性が高いとされており (Tanaka and Ikeda, 1983)、種苗の急速増殖法として注目されている。シラカンバについてこの増殖法が確立されたことにより、シラカンバクロンの急速大量増殖への道が開かれたといえよう。今後の研究として、苗条原基の形成過程の究明や遺伝的安定性の確認などが重要である。また、FeEDTAが通常の15倍も含まれる培地でこのような苗条原基が形成されたことは、苗条原基の形成に鉄イオンかキレート(EDTA)のどちらかが関与していることは明らかである。Bonga (1982a) によれば、不定芽の形成にEDTAが積極的な働きをする場合があるというが、それらの機作については本実験の結果からは論じられない。今後FeEDTAの働きを明確にしていくことが必要であろう。

D. 結論

本章では、いろいろな齢のシラカンバから、それぞれに応じた外植体を用い、試験管内に幼植物体を再生させる方法について検討した。

はじめに、無菌的に発芽させたシラカンバのメバエを材料とした実験では、根の部分を除いたメバエをBAPを0.8mg/l含みFeEDTAの量

を種々に変化させたIS培地を用いて培養し、1本のメバエから2-3本の幼植物体を得ることができた。シュートの伸長の様子から、この試験の範囲ではFeEDTAの量が通常の5倍、すなわち28mg/l含まれる場合に最も良い結果が得られた。

ここで確立した増殖方法では、得られる幼植物体数こそ少ないが、外植体から直接複数のシュートを得ることができるため、1本のメバエから再生した幼植物体は互いに全く同じ遺伝子型を有していると考えられる。そこでこの方法は、単に苗木の増殖にとどまらず、遺伝子解析の分野への今後の応用も可能である。この試験ではBAPの量を変化させてその影響を調べることをしなかったが、ここで用いた量よりも多いBAP濃度でメバエを培養した場合には、より多くのシュートが分岐してくる可能性がある。また、メバエを用いた培養では、胚軸や子葉の組織から誘導された不定芽による増殖例が比較的多い(斎藤、1986a)ので、それらについても今後検討し増殖率の向上を図ることによって、次代検定や遺伝子解析といった方面での応用範囲が更に広がるものと期待される。

ついで、苗畑で養成した1年生の苗木を材料に用いた増殖について検討した。播種2年目の春に新たに伸長し始めた枝の葉えきについてえき芽を伸長させてシュートを得、このシュートを発根させて幼植物体を得るという方法を試みた。短い枝の一部と葉柄の一部を

つけたY字形の組織を外植体として用いた。外植体は、エタノールと過酸化水素水を用いて表面殺菌したが、かなりの割合で雑菌による汚染が見られた。これらの外植体を、BAPやNAA IBAを種々の濃度で含む11種類の培地で培養したところ、どの培地でもえき芽からシュートが伸長したが、IBAを0.5mg/l含み NAAを0.02mg/l含む培地が、えき芽からのシュートの伸長に最も適しているように見られた。また、シュートが伸長した外植体の中には、外植体の基部切り口付近から直接発根して、幼植物体を形成する場合が多くみられた。このような外植体から直接の発根はいろいろな培地で認められ、全体としてはオーキシン添加培地が良い結果を示した。しかし、発根に適したオーキシンの種類や量についてははっきりした結論が得られなかった。また、それらと別に、伸長したシュートを外植体から切り取って発根培地に移したところ、発根の効率は良くなかったが、発根して幼植物体を再生したものが認められた。

この方法による培養では、1外植体あたり1個の幼植物体が再生するだけであるが、1本の苗木からは多くの外植体を得ることができるので、クローンの増殖という点からいえばかなり高い増殖効率をあげることが可能である。また、外植体からシュートの伸長と同時に発根して幼植物体を再生させることができる点は、効率的な種苗の増殖を可能にする方法として評価されよう。さらに、ここでは1

年生の苗木を供試材料として用いたが、この方法は比較的若いシラカンバのクローン増殖に普遍的に利用できるものと考えられ、苗畑やバイオマス生産のための超短伐期施業林地（畑野、1985、渡辺、1986）における早期選抜などに有効な手段となろう。

成木の組織を用いた培養では、斎藤（1983）の開発した剥皮枝条の試験管内さしき法による場合と、葉柄を培養する場合の2方法について実験した。

剥皮枝条の試験管内さしき法では、成木の前年にのびた枝を5月中旬に採取し、樹皮の部分を剥ぎ取ったものを短く切って外植体とした。表面殺菌法としては、単に枝の表面にエタノールをスプレーしただけであったが、かなりの割合で雑菌の汚染を免れ培養を継続できる外植体が残った。樹皮を剥ぎとったことにより汚染が回避されたものと考えられる。外植体は、BAPを異なる濃度で加えたMS1培地で培養した。BAPが0.8mg/lあるいは1.2mg/l含まれる培地で培養開始4週間後には外植体上に直接不定芽が形成された。培養開始約2か月後に、不定芽から伸長したシュートを切り取って発根培地に移したところ、約1か月で発根して幼植物体を再生した。このように、外植体からの不定芽の分化に対しては、ここで用いたBAPを0.8mg/lか1.2mg/l含むMS1培地が有効であり、特に、1.2mg/lの場合が適していると結論された。

このように、剥皮枝条の試験管内さしき法が、シラカンバの成木においても適応できることがわかった。Betula属においては組織培養によって成木の組織から幼植物体が再生した例は知られておらず、本報告が初めての例である。この方法によって斎藤（1983）は、ポプラを始めいろいろな樹種で幼植物体の再生に成功しており、組織培養による樹木の増殖法としては応用範囲が広い手法と考えられる。枝は外植体としていつの時期でも供試できるので、選抜された個体のクローン増殖を行なう場合には特に有効な方法といえる。ここでは5月中旬に外植体を採取し試験を行なったが、ほかの時期に外植体を採取した場合増殖が可能かどうかについて検討しておくことが必要であろう。斎藤（1983）は、初春にこの方法を用いる場合にGA₃の添加が有効であるとしている。

葉柄を用いた場合は、5月下旬に葉柄を採取し、エタノールと過酸化水素水を用いて表面殺菌を行ない、FeEDTAの量を多くしたIS培地にBAPを異なる濃度で加えた4種類の培地で培養した。この場合の表面殺菌方法は完ぺきで、雑菌による外植体の汚染は全く見られなかった。培養開始45日で、BAPを0.8mg/l含む培地上の外植体で苗条原基の形成がはじまった。その後、苗条原基は増殖し、培養開始から80日目には苗条原基の塊を形成した。BAPを含むすべての培地で苗条原基は形成されたが、BAPが含まれない場合には形成されなかつ

た。これらのことから、葉柄の培養で苗条原基を誘導する場合BAPの添加が必須であり、特に、その量が0.8mg/lの 때가最適であると結論された。これらの苗条原基の塊をいくつかに分割して、BAPを0.8mg/l含むIS培地に移し、シュートを伸長させ、そのシュートを発根培地に移して幼植物体を再生させることができた。

この方法での増殖では、1本の葉柄から100-200本の幼植物体が再生することになり、増殖率では他の方法を大きく引き離していた。このような成木の葉柄組織から幼植物体が再生した例は他の樹木では見当たらない。さらに、茎頂組織以外の組織から苗条原基が得られたという報告も見られない。これらの点から、本試験によって組織培養による林木のクローン増殖法としてきわめて画期的な方法が確立されたといえる。

以上のように、メバエ、1年生苗木、成木と齡の異なる材料を用いて、シラカンバの試験管内での培養系を確立することができることが示された。このように、1つの樹種についてすべての生育段階での組織培養による幼植物体の再生に成功したことは、育種的な利用の他に、Bonga (1982b) がとりあげている樹木の加齡や若返りの問題を扱う上でも、貴重な実験材料を提供することになるろう。

本章で培養方法が確立されたものについて、方法や外植体の種類、培養の開始時期などをまとめると 表-9 のようになる。ここで示さ

表-9 初代培養に用いた材料と培養の方法

母材料	外植体	シュートを得る方法	シュートを得るための培地	培養開始時期	幼植物体の形成に 要する期間	1外植体から得られる 幼植物体数
メバエ	根を除いた メバエ	えき芽の伸長	IS培地(FeEDTA 28mg/l + BAP 0.8mg/l)	常時	播種から約100日	3
1年生苗	えき芽	えき芽の伸長	IS培地(NAA 0.02mg/l + IBA 0.5mg/l)	5月中旬	約30日	1
成木	剥皮枝条	不定芽の形成	MS1培地(BAP 0.8mg/lあるいは1.2mg/l)	5月中旬	約90日	2-3
	葉柄	苗条原基の形成	IS培地(FeEDTA 85mg/l + BAP 0.8mg/l) IS培地(BAP 0.8mg/l)	5月下旬	約120日	100-200

れた増殖法のうち、メバエや苗木を用いた場合の増殖法は、外植体上に既に存在していた定芽を培地上で伸長させたものであり幼植物体の増殖率は高くない。そこで、実際に優良系統の選抜や増殖を行おうとする場合には、適当な継代培養法との組み合わせが必要となるだろう。一方、成木の場合には2つの方法とも不定芽を分化させそれからシュートを得る方法であり、芽の培養に比べ高い幼植物体の増殖率が得られる。葉柄を用いた場合には、増殖率はきわめて高いが、葉柄という組織の性質上外植体として培養に供せる時期が限られているため、実際の精英樹の選抜季節との関係から、時期を選ばない増殖方法としての剥皮枝条の試験管内さし木法についてもさらに追及する必要があるだろう。

Ⅳ．継代培養（培養幼植物体からの増殖）

初代培養によって、種々の齡のシラカンバからそれぞれ異なる部分の組織を外植体として用い、幼植物体を試験管内に再生させ得ることがわかった。しかし、種苗の大量増殖を考える場合、必要な数の幼植物体をそのつど野外に生育する成木や苗木、また、無菌的に播種して得られるメバエなどを培養して作り出していたのでは増殖の効率が極めて悪い。特に、外植体の採取に手間がかかること、また、その採取時期が限られていること、外植体のカビや雑菌による汚染も少なくないことなど多くの問題があり、初代培養によって安定的に大量のクローンを増殖することは困難である。

そこで、培養中の幼植物体を材料として、その組織を外植体として用いることができれば上に述べた初代培養に伴う諸問題は回避でき、周年必要な時に必要な量のクローンの増殖が可能になると考えられる。このように培養中の幼植物体の組織を用いて、新たな幼植物体を継続的に再生させる増殖方法を継代培養と呼ぶ。継代培養方法が確立した場合、一度初代培養によって試験管内に幼植物体を再生させれば、以後、継代培養を繰り返すことにより永続的にクローンの増殖を行うことが可能である。

本章では、シラカンバの継代培養法を確立するため、初代培養によって得られた幼植物体から、シュートの一部、茎端、えき芽、葉

柄、茎軸などの各組織を摘出し外植体として用い、試験管内で幼植物体を増殖させる方法について検討する。ここでは、成木の葉柄の培養によって再生した幼植物体を供試材料とした。これは、一般に組織培養による増殖が難しいとされる、成木から得られた幼植物体の組織を材料に継代培養方法が確立されれば、より若い植物体から再生した幼植物体の継代培養にも応用が可能であると考えたためである。

A. 試験管内さし木法による増殖

1. 材料および方法

成木の葉柄の培養から苗条原基経由で得られた幼植物体を材料として用いた。これらは、苗条原基から伸長したシュートをNAAを0.2mg/l、IBAを0.5mg/l含んだMS2培地上で発根させて長さ4-5cmで葉を5-6枚つける大きさに育てたものである。これらの幼植物体のシュートの先端部、葉を2-3枚つけた長さ約1cmの部分を、滅菌したはさみを用いて無菌的に切り分け、用意した発根用の寒天培地へ基部の3mm程度が埋まるようにさしつけた。

用意した培地は、シュート先端部の発根に対するオーキシンの影響を調べるためにMS2培地にIBAやNAAを表-10に示す濃度で加えたR-1からR-6までの全部で6種類の0.8%寒天濃度のものであり、これ

表-10 試験管内さしき法による継代培養に用いた培地

期待する効果	基本培地	培地記号	基本培地からの 変更点	添加した植物ホルモンの種類と量(mg/l)		その他
				N A A	I B A	
シュートの発根 に対するオーキ シンの影響	MS2培地	R 1	なし	-	-	0.8%寒天培地
	"	R 2	"	0.02	-	"
	"	R 3	"	0.2	-	"
	"	R 4	"	-	0.5	"
	"	R 5	"	0.02	0.5	"
	"	R 6	"	0.2	0.5	"
シュートの発根 に対するショ糖 の影響	"	R 7	ショ糖 0 g/l	0.2	0.5	"
	"	R 8	" 5 g/l	0.2	0.5	"
	"	R 9	" 10g/l	0.2	0.5	"
	"	R 10	" 20g/l	0.2	0.5	"

らは約20mlずつ40mm×80mmの培養びんに分注後、オートクレーブしたものである。

また、発根やその後のシュートの生長に対する、ショ糖の濃度の影響を調べるために、含まれるショ糖の量を表-10に示す4種類の濃度で変化させたR-7からR-10までのMS2培地にそれぞれ、IBAを0.5mg/l、NAAを0.2mg/l加えたものを用意した。これらも先の培地と同じく、40mm×80mmの培養びんに約20mlずつ分注して、オートクレーブした0.8%寒天濃度の培地である。

培養びん内にさしつけられたシュートの先端部は、終日5000luxの蛍光灯照明下、25℃の恒温条件下で培養した。

2. 結果および考察

a. 発根に対するIBAおよびNAAの影響

さしつけられたシュートの先端部は、早いものではさしつけ後5日目から下部切り口から発根が認められた。その後、さしつけ2週間目には全体の50%以上のシュートで発根し、根の長さが1cmを超えているのが観察された。発根とほぼ同時にシュートの伸長が始まり、さしつけ50日後に苗長は4cmから6cmになり、新たに2-3枚の葉が展開していた。発根した幼植物体は個々の生長には多少の差はあるものの、培地間では明瞭な生長差は認められなかった。この時点

で、最終的な発根の有無を調査した。さしつけ50日後の発根率は、
図-18 に示すとおりである。これによって、NAAやIBAを全く含まない場合でも、70%近くのシュートが発根しており、シュートの発根には必ずしも培地にオーキシンを添加する必要があることがわかる。しかし、オーキシンとしてNAAを加えることによって10%程度の発根率の向上が認められた。ただし、この試験では、加えたNAAの量が0.02mg/lの場合と0.2mg/lの場合では発根率の差は見られなかった。一方、オーキシンとしてIBA 0.5mg/lを単独で加えた場合には、オーキシンを加えなかった場合と全く同じ発根率となっており、IBA添加の効果は見られなかった。ところが、オーキシンをIBA 0.5mg/lとNAA 0.02mg/lの組み合わせで培地に加えたときには、NAA 0.02mg/lを単独で加えた場合よりさらに発根率が向上し、すべてのシュートから発根しているのが観察された。しかし、IBA 0.5mg/lとNAA 0.2mg/lを組合せた場合には、NAA 0.2mg/lを単独で加えた場合に比べて20%も発根率が低下した。

これらのことから、シュートの先端部を用いた試験管内さし木法による幼植物体の増殖では、NAAやIBAを加えないいわゆるホルモンフリーのMS2培地を用いた場合にも相当数のシュートで発根することがわかった。また、オーキシンとしてNAAを0.02mg/lあるいは0.2mg/l加えることによって発根率を高めることができる。IBAを加

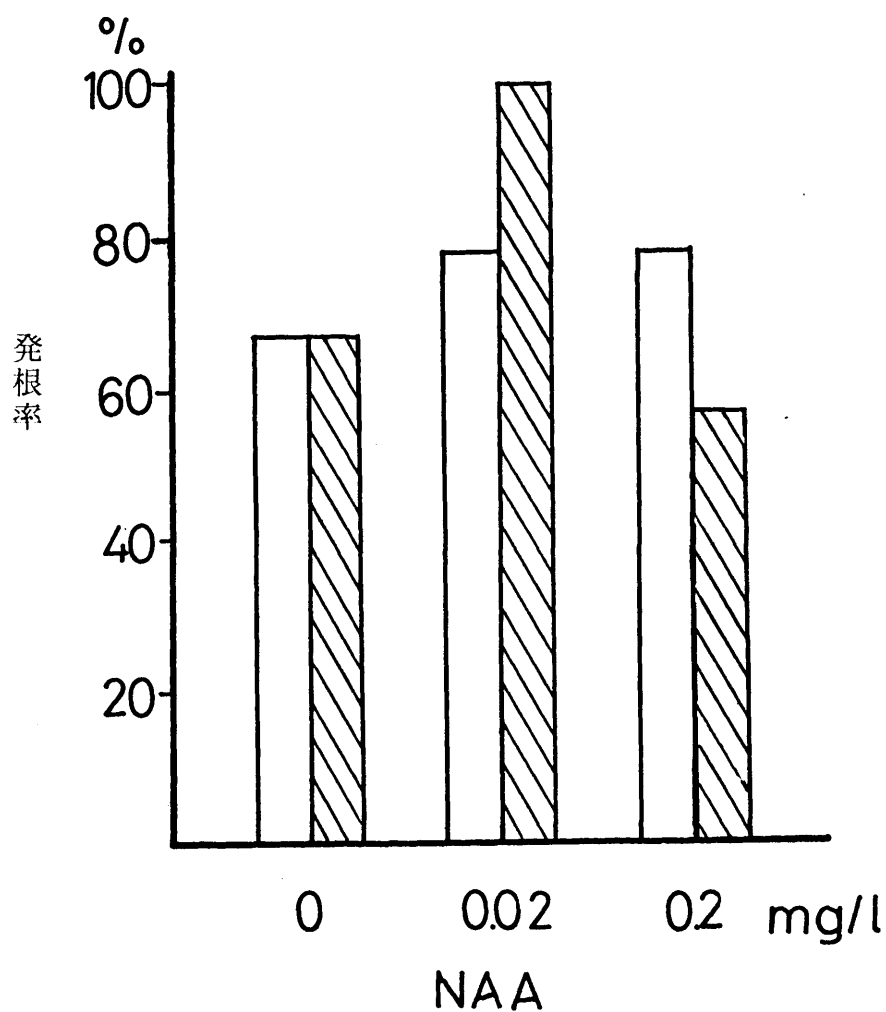
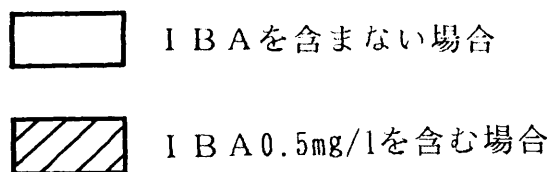


図- 1 8 試験管内さしきにおけるシュート先端部の
発根に対するNAAおよびIBAの影響
培養開始50日目



えた場合には、IBA単独では効果がなく、NAA 0.02mg/lとの組合せで最も高い発根率を示す。しかし、NAA 0.2mg/lとの組合せでは逆に発根率が低下する。このことは、適当な量の組み合わせで用いた場合、IBAとNAAは相乗的に働いて発根を促進するが、NAA濃度が過剰になると全体のオーキシンレベルが高くなりすぎるために、発根に対して阻害的に働くようになるためと考えられる。このように、この方法での継代培養には、MS2培地にIBA 0.5mg/lとNAA 0.02mg/lを加えた発根培地が適していると結論される。

b. 発根に対するショ糖濃度の影響

ショ糖濃度の異なる4種類の発根培地にさしつけられたシュートの先端部は、さしつけ後10日目には全体の65%で発根しているのが認められた。このときには、発根しているシュートからは、いずれも1cmに満たない短い根が1-2本形成されているだけであったが、ショ糖の濃度別の発根率では、表-11に示されるように、ショ糖が10g/lと20g/lの場合にやや低い傾向が認められた。その後、15日たったさしつけ後25日目の発根率と根やシュート形成の様子を表-11に示す。ショ糖の濃度別の発根の違いについてみると、発根率ではショ糖の添加量が0g/l、5g/l、10g/lの3種類の培地間では余り大きな差は見られず、いずれも90%を超える高い発根率を示していた。しか

表-111 発根培地に添加したショ糖の発根やシュートの生長におよぼす影響

ショ糖の量(g/l)	発根率(%)		培養開始後25日目の根やシュートの様子		
	10日目	25日目	根の数(本)	平均根長(mm)	シュート長(mm)
0	65	90	6.9	8	14.9
5	75	95	6.8	14.4	19.4
10	60	90	7.1	17.5	20.5
20	60	75	4.9	24.3	18.6

し、ショ糖が20g/lの培地では、それらに比べると発根率は75%で劣っていた。形成された根の数をみても、前の3種類の培地では約7本で差がないのに対して、ショ糖20/lの場合には約5本と少なかった。一方、根の伸びぐあいを見てみると、ショ糖が全く含まれない場合には、伸長が極めて悪く1cmにも満たなかった。その他のショ糖を含む培地では、ショ糖濃度が高くなるに従って根の伸びが良くなる傾向が認められた。特に、ショ糖を20g/l含む培地の場合には2cmを超える伸びを示した。シュートの長さは、ショ糖を添加した場合にはいずれも2cm程で濃度による違いははっきりしなかった。しかし、ショ糖を加えなかった培地では約1.5cmで、明らかに他の培地よりも劣っていた。図-19 にさしつけ25日目の発根培地別の幼植物体の様子を示す。

これらのことから、シュート先端部を用いた試験管内さし木法による幼植物体の増殖に用いる培地では、発根そのものに対してショ糖は必ずしも必要ではないものと考えられる。また、初期の発根率がショ糖濃度10g/lや20g/lの培地でやや劣り、さしつけ25日目でも、20g/lの培地での発根率が依然として低かったこと、20g/lでの発根した根の数が少ないことなどを考えると、ショ糖の濃度が高くなると根の原基の形成は多少阻害されるのではないかと考えられる。

Chalupa (1984) が、Quercus robur や Tilia cordata の増殖の際

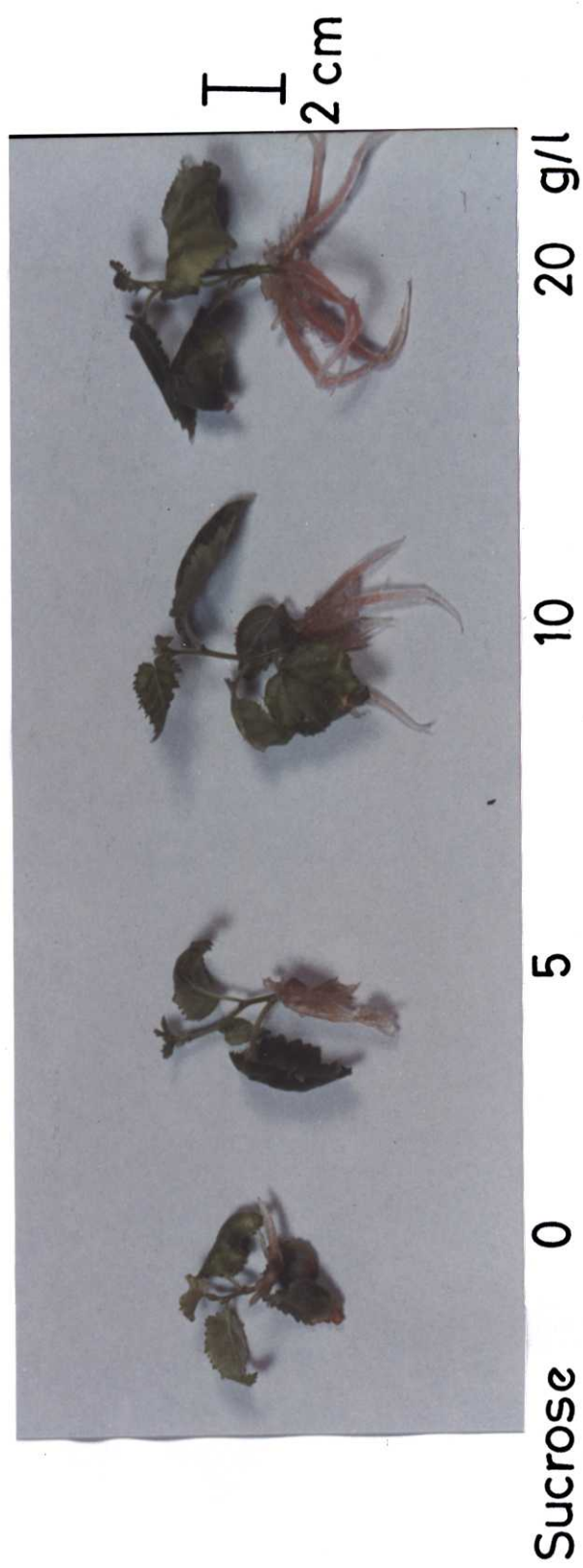


図-19 ショ糖濃度の異なる発根培地で発根し
再生した幼植物体
発根培地へさしつけ後25日目

に発根培地としてショ糖濃度を低くしたものをを用いており、いろいろな樹種について、上に述べたような傾向が認められるものと考えられる。しかし、ショ糖の添加は発根後の根やシュートの伸長に関与していることは明らかで、特に、発根後の根の伸長にはこの実験の範囲内ではショ糖の添加量が多いほうが良い結果が得られることがわかった。シュートの伸長がショ糖を加えた培地間で余り差がないのは、この時期には吸収されたショ糖やその他の養分の多くが根の伸長に利用されているためであろう。

B. 茎端・えき芽を用いた増殖

1. 材料および方法

ここでは、試験管内さし木法（上記A）によって成木葉柄－苗条原基經由で継代培養して得られた、5-6枚の葉をつけた苗長約4cmの幼植物体を供試材料として用いた。茎端部としては、シュートの先端約2mmのまだ葉が展開し始めていない部分を滅菌した安全カミソリで切り取り、これを外植体とした。また、えき芽には、シュートから葉柄の一部をつけた全長8-10mmのいわゆるY字型とでもいうような小片を、やはり滅菌した安全カミソリできりとり外植体として用いた。これらの組織は、あらかじめ用意しておいた試験管内の寒天培地に、茎端の場合は切り口を下にして軽く置床し、Y字型の

外植体の場合は基部を約3mm程度培地中にさしつけた。

外植体の培養に用いた培地は 表-12 に示すとおり、IS培地およびMS1培地にサイトカイニンとしてBAPを異なる濃度で加えた8種類で寒天濃度はいずれも0.8%である。これらは、それぞれ18mm×180mmの試験管に約20mlずつ分注しオートクレーブした。また、伸長したシュートを切り取ってさしつけ発根させるための培地として、ともに0.8%の寒天濃度でホルモンフリーのIS培地とNAAを0.02mg/l、IBAを0.5mg/l加えたMS2培地の2種類を40mm×80mmの培養びんに分注しオートクレーブしたものを用意した。

試験管内に置床あるいはさしつけられた外植体は、24時間日長、約5000luxの蛍光灯照明下、25℃の恒温条件下で培養した。

2. 結果および考察

a. 茎端を用いた場合

培地に置床された茎端部の組織は、置床後3日目には新しい葉を展開し始めた。しかし、その後の葉の展開やシュートの伸長ははかばかしくなく、置床後20日目の調査では、展開した葉は1枚未満のものから多くとも2枚であり、シュートの長さは1mm以下でほとんど伸びていないものから、長いものでもせいぜい3mm程度であった。また、展開した葉はいずれも薄い紙質で淡い黄緑色を呈し、なかに

表-12 茎端・えき芽の培養に用いた培地

期待する効果	基本培地	培地記号	添加した植物ホルモンの種類と量(mg/l)			その他
			BAP	NAA	IBA	
茎端・えき芽から のシュートの伸長	IS培地	S1	-	-	-	0.8%寒天培地
	"	S2	0.4	-	-	"
	"	S3	0.8	-	-	"
	"	S4	1.2	-	-	"
	MS1培地	S5	-	-	-	"
	"	S6	0.4	-	-	"
	"	S7	0.8	-	-	"
	"	S8	1.2	-	-	"
シュートの発根	IS培地	R1	-	-	-	"
	MS2培地	R2	-	0.2	0.5	"

は葉の一部が褐変しているものも認められた (図-20)。

図-21 にこの時の培地間のシュートの伸長や葉の展開の違いを示す。基本培地間の違いをみると、MS1培地上でのシュートの伸びがIS培地上での伸びを上回っていた。また、BAPが0.4mg/lあるいは0.8mg/l含まれる場合に、MS1培地上の茎端部は葉の展開数においてIS培地上の茎端部を大きく引き離していた。このことから、茎端部からシュートを伸長させるための培地としては、MS1培地にBAPを0.4mg/lあるいは0.8mg/l加えたものが適しているように見える。しかし、先に述べたように、葉の質や色の様子は必ずしも健全とは言えず、これらが最適培地であるとは結論しにくい。

これらの茎端部から伸長したシュートを、置床後20日の時点でそのままMS2の発根培地へ移し替えた。移植されたシュートのなかにはその後やや伸長したものもあったが、1か月後には大部分は枯死してしまい、発根が認められたのは全体の4%にすぎなかった。これは、発根培地に問題があるというより、茎端部からシュートの伸長を期待した培地が適当でなく、葉の様子などからわかるように伸長したシュートが充実していなかったことが原因であったものと考えられる。発根して得られた幼植物体の様子を 図-22 に示す。

ここでは、培養中の幼植物体の茎端部の小さな組織を用いて、継代培養を試み、わずかではあるが幼植物体が再生することがわかつ

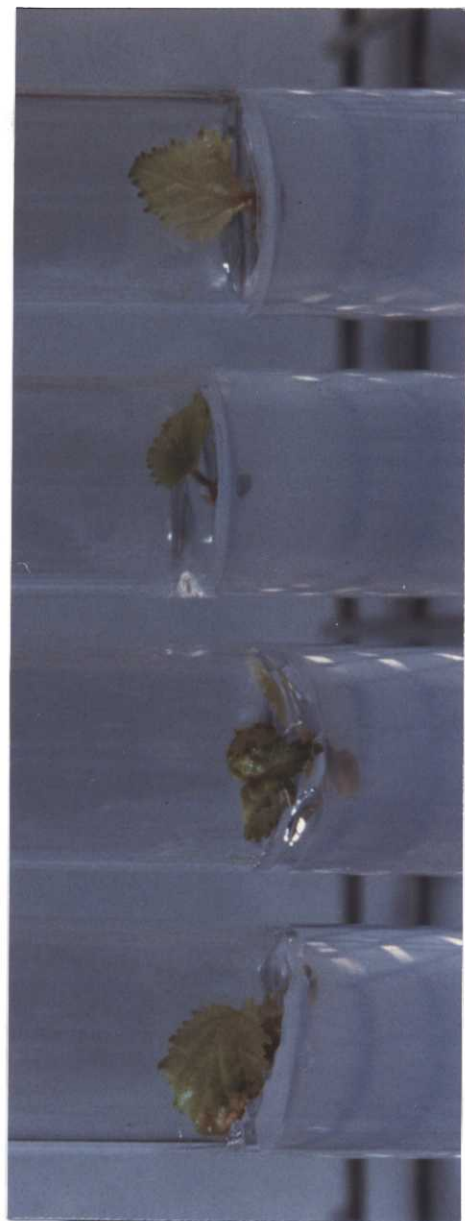


図-20 茎端部の組織からの葉の展開

培養開始20日目

試験管の直径は18mm

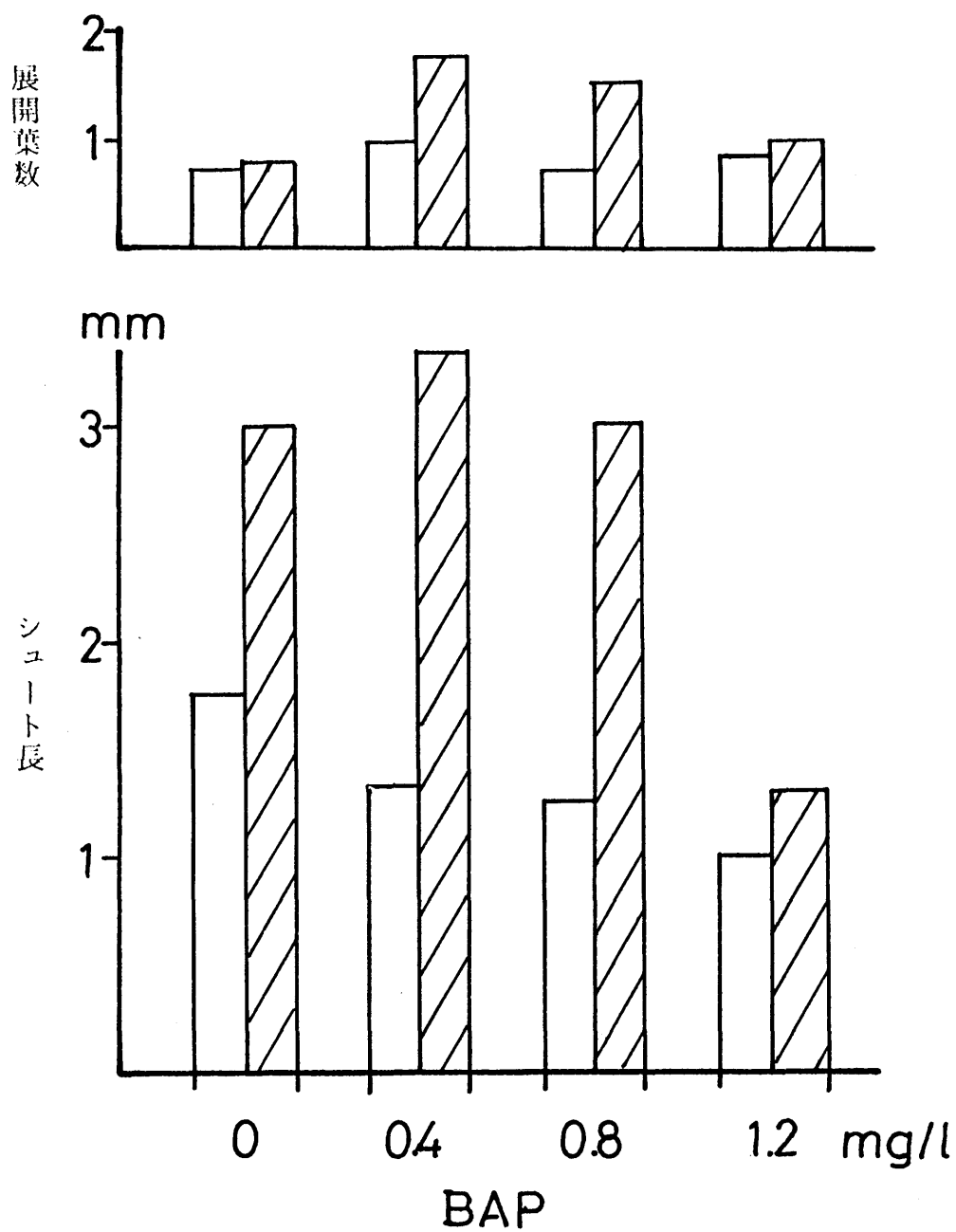
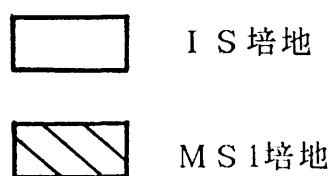


図-21 茎端部の組織からのシュートの伸長
培養開始20日目



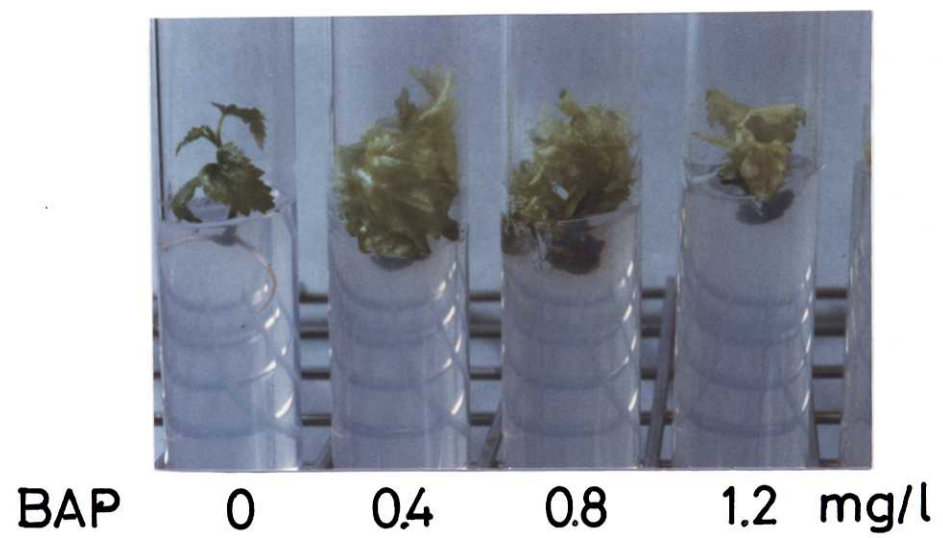


図－22 茎端の培養で得られた幼植物体
発根培地へ移植後3週間目
培養びんの直径は4cm

た。しかし、必ずしも培地や植物ホルモンの組み合わせが適しているとは言いがたく、より効果的な培地条件の検索が必要である。

b. えき芽を用いた場合

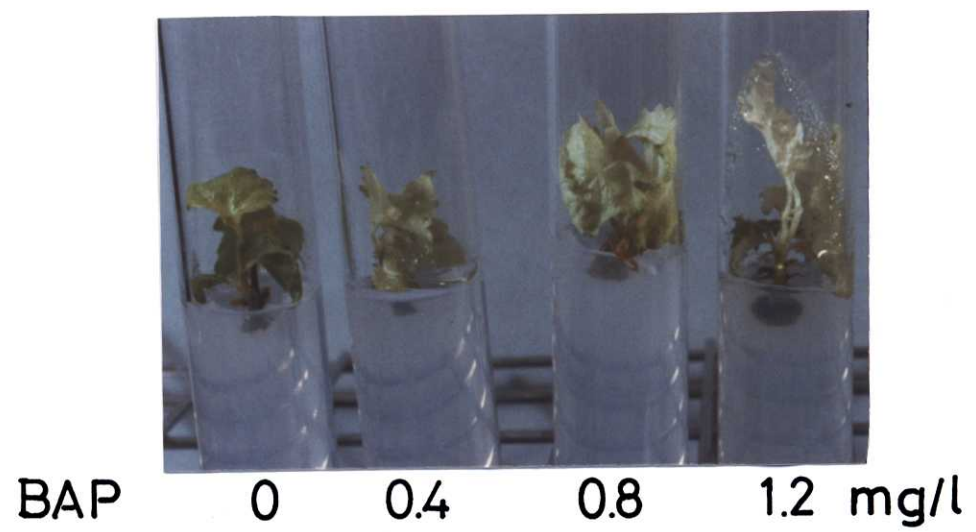
培地にさしつけられたY字型の小片の葉えきの部分からは、さしつけ後数日でえき芽の発芽がみられ、引き続いてシュートの伸長が始まった。培養開始1週間目には、BAPを加えないIS培地にさしつけた外植体の中に、数本の発根している外植体が認められた。さらに、さしつけ20日後には、この培地上で培養されている外植体の60%で5-10mmに伸びた1-2本の根が確認された。さしつけ後20日目における培地ごとのシュートの形成の様子を 図-23、24 に示す。また、ホルモンフリーのIS培地上で外植体から直接発根して得られた幼植物体の様子を 図-25 に示す。さしつけ20日目における培地ごとの平均シュート長および平均展開葉数は、図-26 に示すとおりである。この図から、IS培地ではBAPの濃度が高まるにつれて、シュートの伸長は抑えられる傾向があることがわかる。一方、MS1培地ではBAPが0.4mg/lのときにシュートの伸長量が小さかったものの、IS培地のようなBAPの濃度による明瞭な傾向は認められなかった。これらのなかで、発根した外植体が見られたBAPを含まないIS培地では、シュートの長さや展開葉数において他のどの培地よりも明らかに優



図－23 異なるBAP濃度のIS培地上で培養した
えき芽から伸長したシュート

培養開始20日後

試験管の直径は18mm



図－24 異なるBAP濃度のMS1培地で培養した
えき芽から伸長したシュート

培養開始20日目

試験管の直径は18mm



図－25 植物ホルモンを含まないIS培地上で外植体
から直接発根して再生した幼植物体

培養開始35日目

試験管の直径は18mm

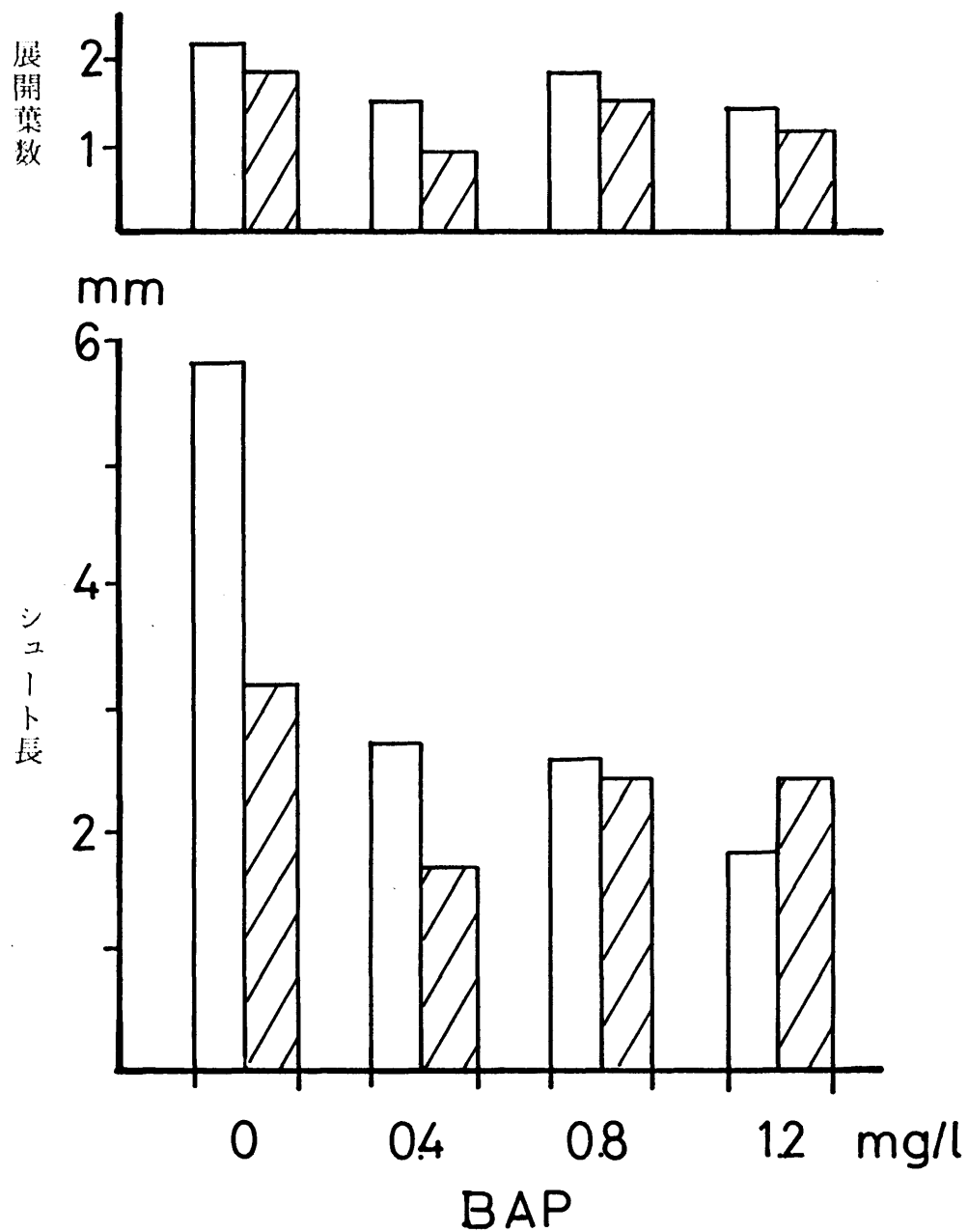
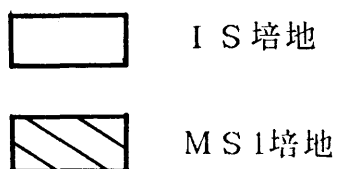


図-26 えき芽を用いた継代培養におけるえき芽からのシュートの伸長及び葉の展開
培養開始20日目



れていた。BAPを含むIS培地や、すべてのMS1培地では、展開した葉は茎端部の組織を用いた場合と全くおなじように、淡黄色の紙質を呈し不健全に見えたが、BAPを含まないIS培地にさしつけられた外植体のえき芽から生じた葉は、その外植体が発根しているいないにかかわらず、比較的厚手で黄緑色を呈し健全に展開していた。

さしつけ後20日目にえき芽から伸長したシュートを滅菌した安全カミソリできりとり、発根培地へ移植した。早いものでは、1週間目に発根しているものが認められた。発根培地としてMS2培地にIBAとNAAを加えたものを用いた場合には、大多数のシュートは発根しないでやがて葉の脱色が起こり1か月のうちに枯死してしまった。この培地では、移植1か月後に発根していたのは全体の9%であった。一方、発根培地としてホルモンフリーのIS培地を用いた場合には全体の48%が発根しており、外植体からの直接の発根とあわせ、この培地の発根に対する有効性が示された。このような発根に対する培地の適否は、基本的には培地間の成分組成の違いに起因するものと考えられる。以上のような結果から、幼植物体のえき芽を伸長させる増殖方法では、えき芽をもつ短い茎軸をホルモンフリーのIS培地にさしつけてそのえき芽からシュートを伸長させるとともに茎軸の下端部から直接発根させて幼植物体を得る方法、あるいは、シュートを切り取って再び同じホルモンフリーのIS培地にさしつけること

によって幼植物体を得る方法が有効であると考えられる。

ここでは、えき芽付茎軸を培養することによって、シュートを伸
長させ幼植物体を再生させ得ることが示された。えき芽の培養にあっ
ても茎端部の培養の場合と同じく、大方の培地はシュートの伸長に
は不適であるといえる。しかし、えき芽の場合には、茎軸の部分をつ
けているため培地条件が適していれば、自らの組織にある物質の
助けを借りて発根することが可能であると言えよう。Quercus属で
は、サイトカイニンを加えることによって、えき芽から複数のシュ
ートを形成することが知られている (Chalupa, 1984, Vieitez
et al., 1985)。また、McCownら(1979)の場合も、Betulaの培養でえ
き芽から多数のシュートの形成が認められており、シラカンバでも
培地の条件いかんではそのようなタイプの増殖が可能と思われ今後
の検討課題とされる。ここではサイトカイニンの添加しか実験しな
かったが、サイトカイニンとオーキシンの組合せや、初代培養時に
えき芽の培養に用いたようなオーキシンの添加などについても試験
する必要がある。

C. 葉柄・茎軸を用いた場合

1. 材料および方法

外植体を得る材料として、茎端やえき芽を用いた増殖の場合と同じく、成木の葉柄から苗条原基を経由して、試験管内さし木法によって継代培養して得られた幼植物体を用いた。5-6枚の葉をつけ苗長約4cmに育った幼植物体の茎の中央部の2-3節から、滅菌したはさみを用いて葉柄と茎軸を切り取った。葉柄は付け根から長さ8-10mm切り取りった。茎軸の場合は長さ5-6mmとし節間中央部のえき芽や葉柄を含まない部分を切り取った。あらかじめ試験管内に寒天培地を用意し、葉柄の場合はその寒天培地面を傾斜させてその上に置床あるいは下端部の約3mmを培地中にさしつけた。茎軸の場合はそのまま横にして置床した。

葉柄の培養に用いる培地として、表-13 に示すように、FeEDTA量を葉柄の初代培養の時と同じく85mg/lに変更しBAPを0.8mg/l加えたIS培地を用意した (S1)。その他に、初代培養の時と異なる培地条件下で葉柄や茎軸から苗条原基の形成が可能かどうかを調べるために、BAPやNAA、ジベレリン (GA_3)を 表-13 に示すような濃度で加えたS2からS5までの4種類の培地を用意した。また、これらの培地上で形成された苗条原基からシュートを伸長させるために、IS培地にBAPを0.8mg/l加えたものを用意した。伸長したシュートの発根培

表-13 葉柄・茎軸の培養に用いた培地

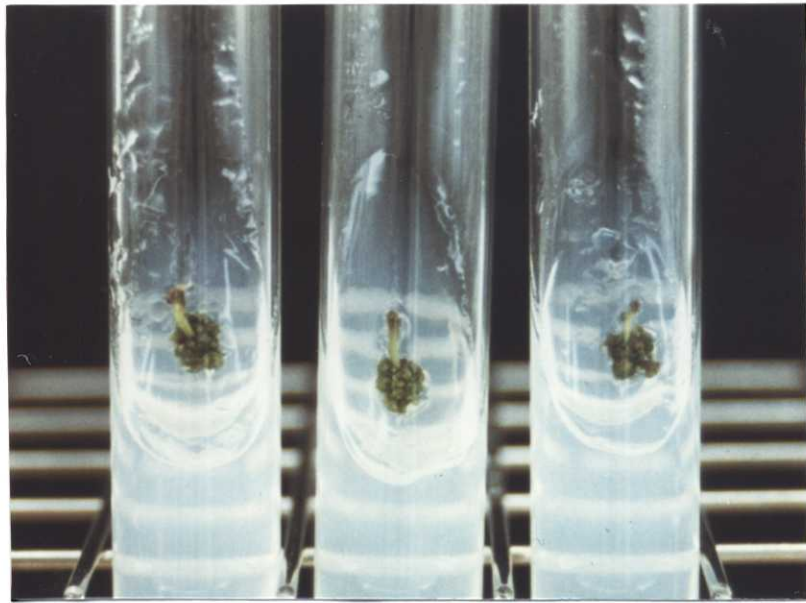
期待する効果	基本培地	培地記号	基本培地からの 変更点	添加した植物ホルモンの種類と量(mg/l)				その他
				BAP	GA ₃	NAA	IBA	
苗条原基塊の 形成	I S 培地	S 1	FeEDTA 85mg/l	0.8	—	—	—	0.8%寒天培地
	〃	S 2	なし	0.8	0.5	—	—	〃
	〃	S 3	〃	0.8	0.5	0.002	—	〃
	〃	S 4	〃	0.8	0.5	0.02	—	〃
	〃	S 5	〃	0.8	0.5	0.2	—	〃
苗条原基塊から シュートの伸長	〃	E	〃	0.8	—	—	—	〃
	MS2培地	R	〃	—	—	0.2	0.5	〃

地として、MS2培地にNAAを0.2mg/l IBAを0.5mg/l加えたものを用意した。これらは、0.8%の寒天濃度で約20mlずつ18mm×180mmの試験管（発根培地の場合は、40mm×80mmの培養びん）に分注してオートクレーブした。

これらの培養物は、24時間日長、約5000luxの蛍光灯照明下、25℃の恒温条件下で培養した。

2. 結果および考察

培養中の幼植物体から得られた葉柄を、BAPを0.8mg/l含みFeEDTAの多いIS培地で培養した場合には、植え付け後約3週間目には、いくつかの葉柄で苗条原基の形成が始まった。苗条原基は、初代培養の時には葉柄の中程、培地に接した部分から分化したが、この場合にはすべて葉柄の基部切り口から分化した。これは、初代培養の場合、葉柄の基部切り口は表面殺菌の際相当傷んでおり、その部分の切り戻しをしたにもかかわらず影響が残り切り口からの分化が妨げられたためであると推定される。苗条原基はその後供試したすべての葉柄の基部から分化したのが認められ、培養開始から4週間で直径5-7mmの塊状の苗条原基を形成した（図-27）。形成された塊状の苗条原基は初代培養の時と同じく濃い緑色を呈していた。分化した苗条原基が初代培養の時のように褐変枯死してしまうという現象は



図－27 培養中の幼植物体の葉柄組織からの苗条原基塊の形成
培養開始4週間目
試験管の直径は18mm

見られなかった。また、その増殖のスピードは、直径5-7mmの苗条原基の塊が形成されるのに初代培養では培養開始から80日、また、最初の苗条原基が認められてから35日かかったのに対して、培養中の幼植物体の葉柄を用いた場合には、培養開始から40日、最初の苗条原基の形成から20日と極めて速くなることがわかった。このような組織の培養に対する適応とでもいうような現象の原因として、植物体自身の若返りや、組織中に含まれる苗条原基の分化を阻害する物質の減少、培養中に用いられた培地成分や植物ホルモンの蓄積による影響などが考えられるが、本試験からはそれを特定することはできない。

これらの塊状の苗条原基を直径3mm程度の4-5個の小さな塊に分割して、シュートの伸長を促すために用意したIS培地に置床した。分割移植後直ちにシュートの伸長が始まり、20日後には1-2cmの苗長で葉を2-4枚付けたシュートが、それぞれの塊から5-10本形成された。この時、初代培養のとき観察されたのと同じように、複数のシュートのうち1-2本だけが良く伸びる傾向がみられ、塊に含まれる苗条原基の多くからはわずかに伸長したシュートができただけであった。そこで、良く伸びたシュートの付近のシュート塊を切り取って発根培地に移し、残りのシュートの塊をもとの培地上に戻したところ、別の1-2本のシュートが伸長し始め、2週間後には2cm程に育っ

て発根培地に移せる状態になった。このことは、苗条原基の塊からシュートが伸長する際に頂芽優勢に似た現象が働いて、後発のシュートの伸長を抑えているものと考えられる。このような現象は、組織培養による種苗の増殖を行おうとする際に、しばしば起こることであり（高山、1985）、急速に幼植物体を増殖しようとする場合には障害となっている。

発根培地に移したシュートは、2-3週間で発根して幼植物体が再生した。

葉柄・茎軸をBAP、GA₃、NAAを組み合わせたIS培地上で培養した場合には、培養開始から1週間後いくつかの外植体で切り口の部分が肥大し始め、2週間目にはいりカルスや苗条原基の形成が始まった。その後、カルス、苗条原基とも増殖を続け、培養開始40日目には大きいもので直径10mmほどの塊になった。この時形成された塊状の苗条原基は、IS培地のFeEDTAの量を変化させた培地で形成された苗条原基と様子が異なり、全体に赤味を帯びており、個々の苗条原基も前者に比べると若干大きく見えた。また、苗条原基の多くは形成後2週間目ころからシュートの伸長を始め、長く苗条原基の状態に留どまっていなかった。図-28 に培養開始40日後の、葉柄組織からの苗条原基とカルスの形成の様子を示す。形成率は苗条原基やカルスの形成された外植体の割合で示し、その生長は、できた苗条原

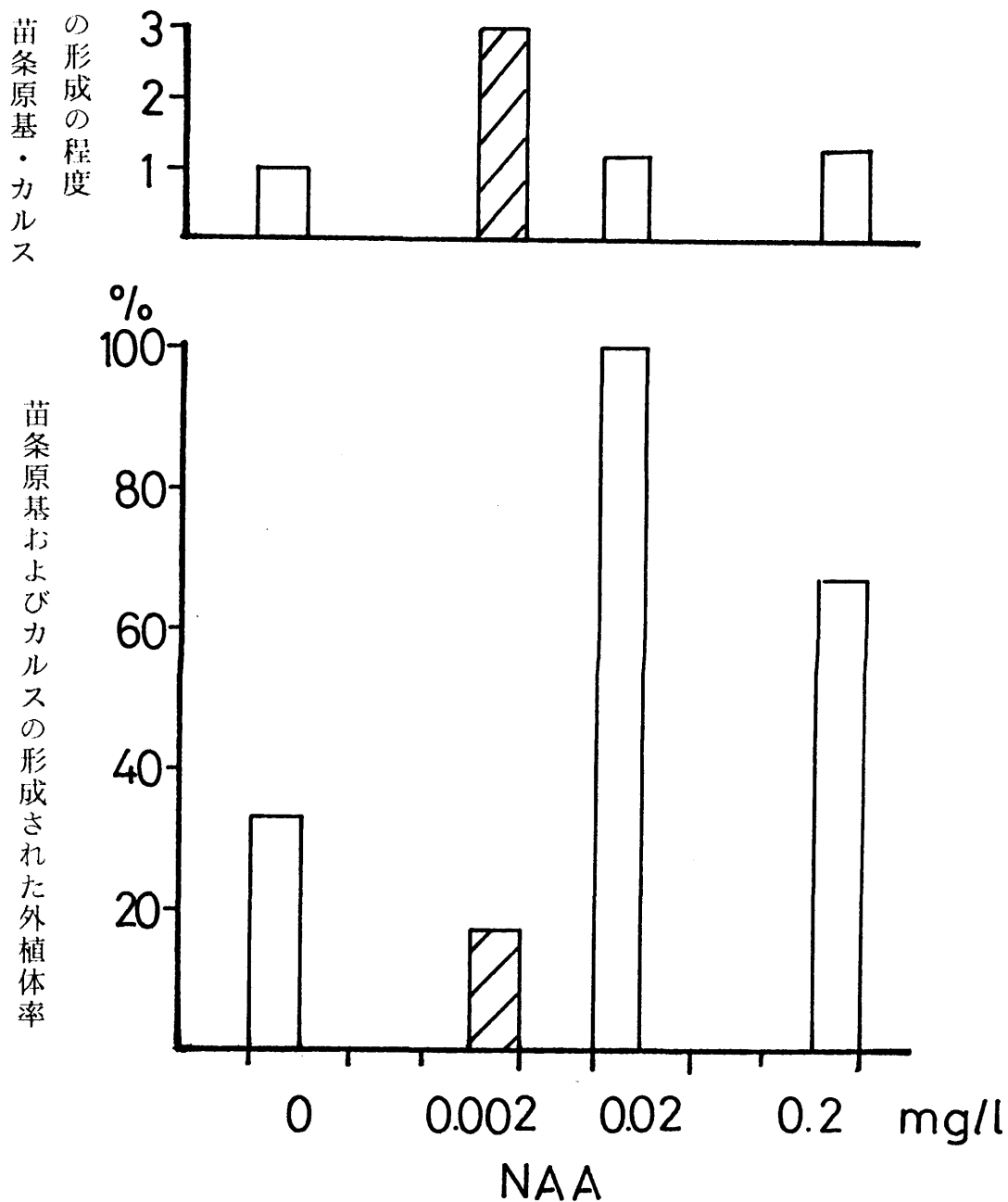
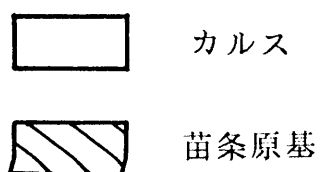


図-28 BAP、GA₃、NAAを含んだIS培地上で培養した
葉柄組織からの苗条原基塊の形成

培養開始40日目

苗条原基塊やカルスの形成の程度は次の3段階に区分

1. わずかに形成が認められた
2. 直径5mm程度の塊が形成された
3. 直径10mm以上の塊が形成された



基塊やカルスの塊の大きさによって3段階に評価した。その方法は、わずかに認められたものを1、5mm程度の塊が形成されたものを2、10mm以上の塊が形成されたものを3として評価した。この図にみられるように、NAAが0.002mg/lの時にのみ少数の外植体から苗条原基塊が形成された。これは、FeEDTAの量を多くしたIS培地で、すべての外植体から苗条原基の塊が形成されたことと対照的である。その他のNAAの濃度ではカルスが形成され、特に、NAAが0.02mg/lの時のカルス化率が高かった。しかし、いずれもその生長は良くなかった(図-29)。

茎軸を用いた場合の苗条原基塊やカルスの形成の様子を 図-30 に示す。これによると、NAAが全く含まれない場合や、0.002mg/lないし0.02mg/l含まれる場合に塊状の苗条原基が形成されたことがわかる。苗条原基塊の形成率では、NAAが0.02mg/lの時がもっとも高い値を示した。しかし、この場合にはカルスも同時に形成されたためにか苗条原基塊の発達は良くなかった。NAAがまったく含まれない場合にもカルスが同時に形成された。苗条原基塊の発達はNAAが0.002mg/lの時がもっとも良かった。また、NAAが0.2mg/lの時には、カルスだけが形成されその発達は最も良かった(図-31)。

このようなことから、IS培地にBAP、GA₃、NAAを組み合わせた培地(S3、S4、S5)でも、葉柄や茎軸から苗条原基塊が形成され得る

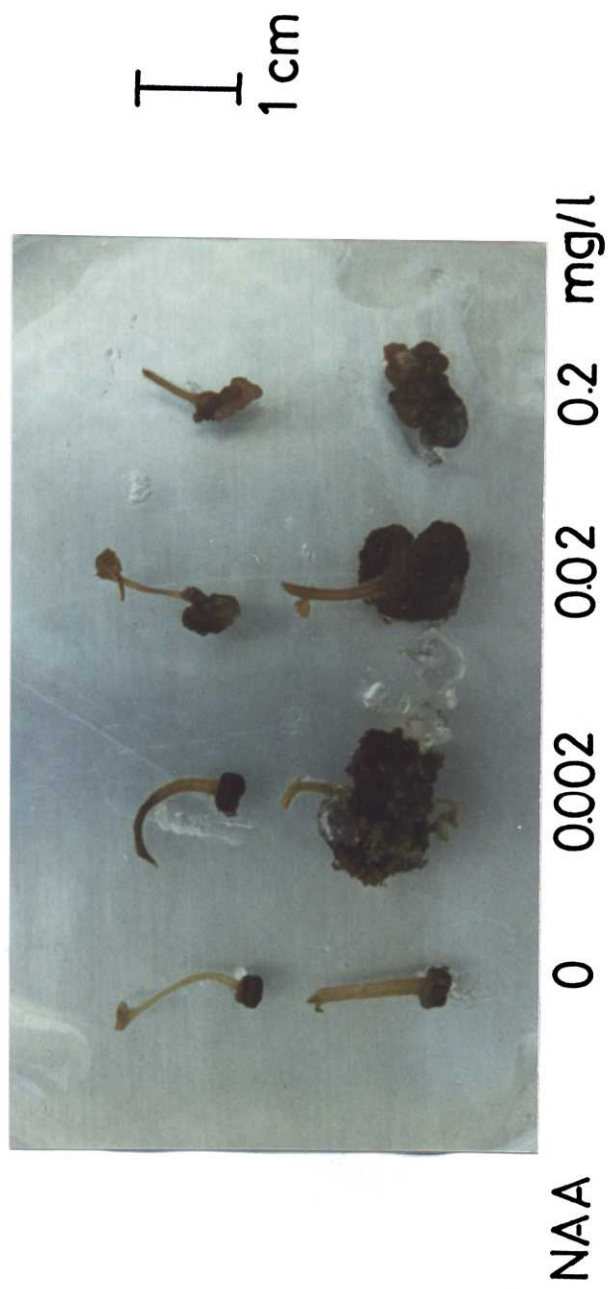


図-29 BAP、GA₃、NAAを含んだIS培地上で培養した葉柄組織
から形成された苗条原基の塊およびカルス
培養開始後40日目

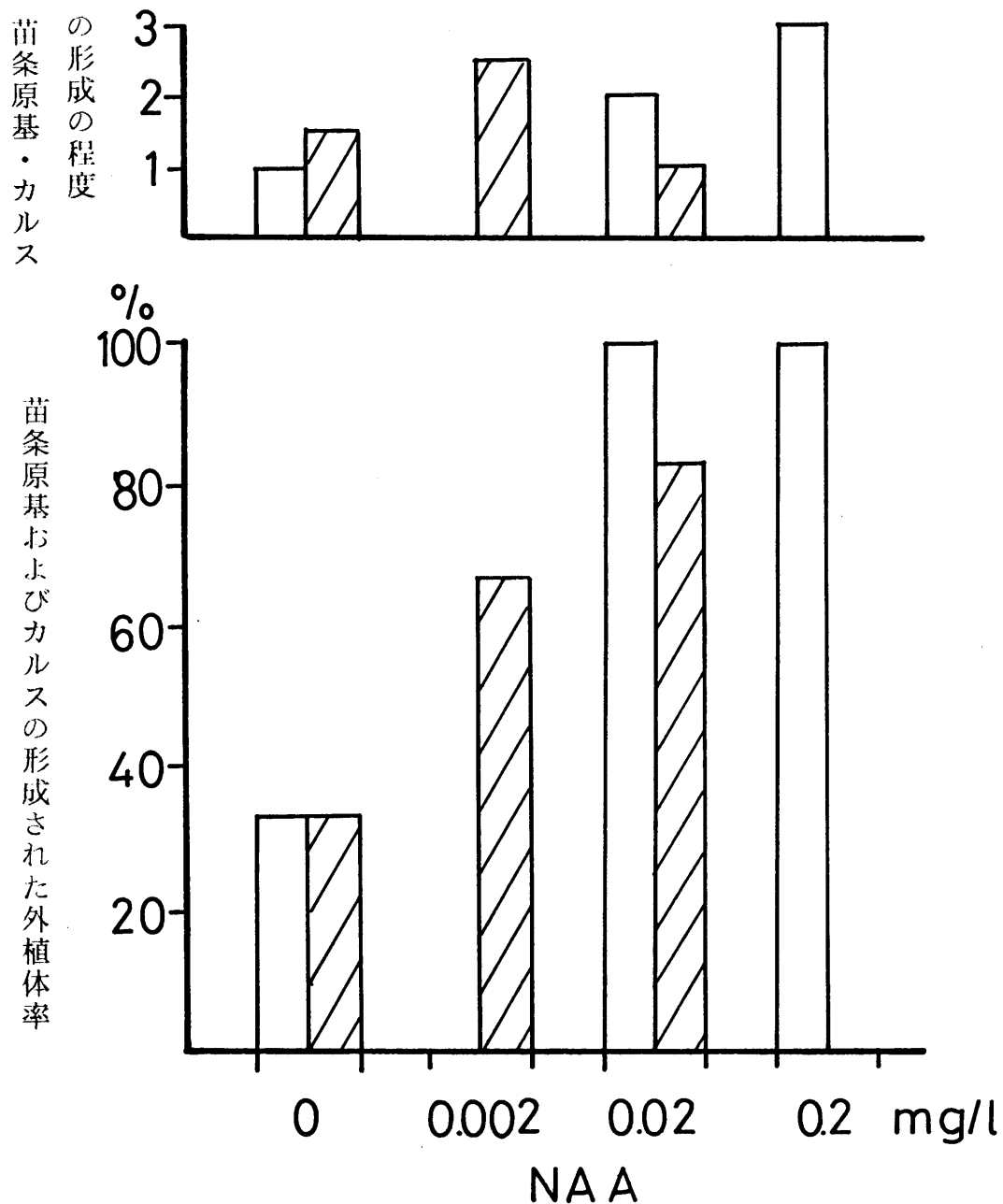


図-30 BAP、GA₃、NAAを含んだIS培地上で培養した
茎軸組織からの苗条原基の形成

培養開始40日目

苗条原基やカルスの形成の程度は次の3段階に区分

1. わずかに形成が認められた
2. 直径5mm程度の塊が形成された
3. 直径10mm以上の塊が形成された



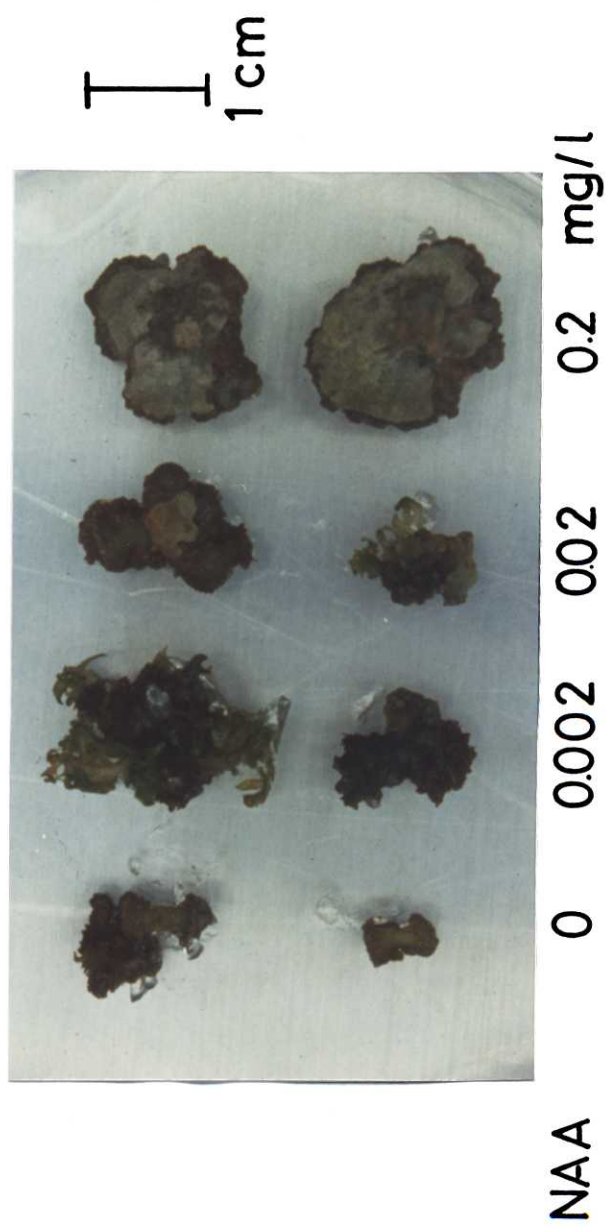


図-3-1 BAP、GA₃、NAAを含んだIS培地上で培養した茎軸組織
から形成された苗条原基の塊およびカルス
培養開始後40日目

ことがわかった。特に、苗条原基の形成や増殖にはNAAの量が0.002 mg/lの時が適していると結論された。しかし、苗条原基塊の形成は、葉柄ではあまり芳しくなく、茎軸の方が優れていた。そこで、葉柄からの苗条原基塊の形成にはFeEDTAの量を増やしたS1培地が、茎軸からの苗条原基塊の形成にはS3培地が適しているように考えられ、外植体として用いる組織によって、苗条原基塊の形成および増殖に適する培地条件が異なっていることがわかった。

S3培地上で形成された塊状の苗条原基塊を、やはり、直径3mm程度の小塊に分割しBAPを0.8mg/l含むIS培地へ移した。移植後直ちにシュートの伸長が始まり、それにやや遅れて4-5日目から根の分化が起こった。シュートは移植2週間後には約2cmの長さに生長し、根も引き続き伸長した(図-32)。このような発根性は、苗条原基塊の形成にオーキシンを含んだ培地を用いたことと関係があるものと考えられる。このようにして、1本の試験管内に5-10本の幼植物体が再生した。この時再生した幼植物体は、FeEDTAの量が多いIS培地上でできた苗条原基塊から再生した幼植物体に比べ、茎はやや太くしっかりしていた。これは、さきに述べたように個々の苗条原基がやや大きかったためであろう。外見の違いや、分化後早い時期からシュートの伸長が見られること、発根培地に移すことなくシュートの伸長と同時に発根することなどから、ここでできた塊状の苗条原基は、



図－3 2 IS培地にBAP、GA₃、NAAを加えた培地で形成された苗条
原基塊からの幼植物体の再生

培地はIS培地にBAP0.8mg/lを加えたもの

試験管の直径は18mm

先の方法で葉柄から得られた苗条原基とは性質を異にするものであると結論される。しかし、分化の初期の段階ではシュートの伸長を伴わずに苗条原基の増殖が起こるので、増殖のタイプとしては苗条原基法の範ちゅうに入るものと考えられる。また、カルス化と苗条原基の形成が同時に起こるような培地条件が認められたことは、苗条原基が分裂組織、カルス、シュートの3つの状態の閾状態にあるという考えかた（田中、1983）からすると興味深い。

ここで行った試験で、葉柄や茎軸の組織から再生した幼植物体の数は1外植体あたり数10本から多い場合には200本であり、大量の幼植物体を得ることが可能であることが示された。また、外植体によって適した培養方法が異なることがわかり、葉柄の場合にはFeEDTAの量を多くしたIS培地にBAPを0.8mg/l加えた培地上で苗条原基塊を形成させる方法、茎軸の場合にはIS培地に、BAP、GA₃、NAAを組み合わせ加えた培地上で苗条原基塊を誘導増殖させる方法が適当であると考えられた。

D. 結論

本章では、初代培養によって試験管内に再生した幼植物体を材料として、その様々な組織を外植体として培養し、試験管内に新たな幼植物体を継続的に増殖する方法を検討した。

最初に、最も基本的な手法として、試験管内さしき法による増殖について実験した。この方法では、発根培地にさしつけたシュート先端部の発根が良いことが必要である。そこで、ここではシュートの発根やその後の伸長に適した培地条件の検索を行なった。発根用の基本培地として、剥皮枝条の試験管内さし木法による初代培養の際発根培地として用いたMS2培地を用い、IBAとNAAを種々の濃度で組み合わせて、オーキシンの添加と発根の関係について検討した。

また、発根に及ぼすショ糖の添加量の影響を調べるために、IBA 0.5mg/l NAA 0.02mg/lを加えたショ糖の濃度を0g/l、5g/l、10g/l、20g/lの4段階に変化させたMS2培地を使った実験を行なった。その結果、オーキシンを添加しないホルモンフリーの培地でもある程度の発根は見られたが、オーキシンとしてNAAを加えた時には発根率の向上が認められた。オーキシンとしてIBAを 0.5mg/l添加した場合では単独では効果が無く、NAA 0.02mg/lとの組合せで著しい発根促進作用が認められた。また、ショ糖の濃度については、ショ糖を全く含まない時でも根が形成され、発根自体にはショ糖が必須ではないことが明らかとなった。発根率は、ショ糖濃度が10g/l以下の時にはいずれも90%近くの値を示し差がなかった。しかし、ショ糖濃度が20g/lの時にはやや発根率が落ちたことなどから、高濃度のショ糖の添加がむしろ発根を阻害するかもしれないと考えられた。

形成された根の伸長はショ糖濃度が高いほど良く、シュートの伸長も濃度による差こそはっきりしなかったが、ショ糖を加えた場合のほうが優れていた。ここでは、ショ糖の量とオーキシンの関係などについては検討しなかったため、これらのどのような組合せが試験管内さし木法における発根やシュートの伸長に最適なのかは分らないが、これらの試験の範囲では組織培養における一般的なショ糖濃度である20g/lのショ糖を加えた培地では、NAA0.02mg/lとIBA 0.5mg/lを加えた培地が最も有効であるといえる。今後、ショ糖濃度とオーキシンの関係についても調べていく必要があると思われる。

試験管内さし木法による増殖では、培養中の1本の幼植物体からは、最初ただ1本の幼植物体が再生するだけであるが、やがてシュートの先端部を切り取られたもとの幼植物体の複数のえき芽から新たなシュートが伸長してくることが観察されており、これらのシュートも切り取って発根培地にさしつければ、さらに多くの幼植物体を再生させることができる。このようにしてできた幼植物体は、約50日で再びシュートを切り取れる大きさに育つので、再度試験管内さし木を行なうことによって継続的な増殖がはかれる。また、この方法では一般のさし木と同じく継代培養によって遺伝的な変化をおこすことは少ないと考えられ、増殖率こそ低い試験管内での実験

材料の増殖や遺伝子の保存などには適した増殖方法であると考えられる。さらに、ここで得られた発根に適した培地の条件は、他の方法によるシラカンバの増殖の際の発根培地にも適用が可能と考えられる。

次の茎端やえき芽を用いる増殖方法についての検討では、初代培養の際葉柄起源の苗条原基からシュートを伸長させるのに、IS培地にBAPを加えたものが有効であったことを参照して、茎端やえき芽のような小さな組織からシュートを伸長させることができるように、IS培地やMS1培地に同じくBAPを加えて用いた。

茎端部からのシュートの伸長には、これらの培地の中ではMS1培地にBAPを0.4mg/lあるいは0.8mg/l加えたものが良かったが、どの培地でも展開した葉は不健全で栄養の供給がうまくいっていないように思われた。伸長したシュートを発根培地に移した場合にも大多数は枯死してしまい、発根して幼植物体が再生したものはわずかであった。このようなことから、とりあえず茎端部の小さな組織から幼植物体を再生させることの可能であることは示されたが、ここで用いた培地によっては、充実したシュートを形成させることはできない、と結論された。

茎端部の小さな組織から幼植物体を再生させる意義として、次のような点があげられる。一般に多くの樹木の組織は雑菌に感染して

おり、組織培養において生長点以外から得られた幼植物体のほとんどは、多かれ少なかれそのような雑菌を保有しているといわれている。これらの雑菌は単に種苗の増殖を目的とする場合にはそれほど問題になるものではないが、細胞融合や細胞育種などのためにプロトプラストを単離培養する際には大きな障害になる（斎藤、1984、1986）。そこで、これらを除くためには、生長点の組織を用いて幼植物体を再生させればよいのであるが、樹木の場合生長点の組織培養は組織に含まれるタンニンや精油成分の悪影響があってかなり難しい（斎藤、1984）。そこで、茎端部の微小组織を培養し幼植物体を再生させることを繰り返すことによって雑菌の密度を低くして行き、最終的には全く無菌の幼植物体を得るという方法が現実的であると考える。このような観点から、ここで茎端部の微小组織から幼植物体が再生した意義は大きい。今後より効率的な増殖のための培地条件の検索がのぞまれる。

えき芽の培養では、茎端の培養に比べどの培地でもシュートの伸長は優れていた。これは、えき芽の培養では茎軸を付けて培養したために、茎軸に存在していた養分によって伸長が促進されたためと考える。しかし、この場合でも培地からの栄養供給は不十分で、外植体からの直接の発根が認められたBAPを含まないIS培地を除いては、茎端部の場合と同じように展開した葉の色や質は健全とはいえ

なかった。これらから、この方法でえき芽からシュートを伸長させるためには、ホルモンフリーのIS培地を用いるのが適当と考えられる。ホルモンフリーであってもIS培地の代わりにMS1培地を用いることや培地にBAPを添加することは有効とはいえなかった。

えき芽を用いた増殖では、培養中の幼植物体から複数の外植体を得ることができるので、試験管内さし木法の場合より増殖効率は高い。しかも試験管内さし木法と同様に遺伝的な変異を起こしにくく、実験材料の増殖やクローンの保存などに有効な手段であるといえる。

葉柄・茎軸を材料とする増殖法についての検討では、成木の葉柄を外植体として用いた初代培養と同じくIS培地のFeEDTAの量を85mg/lに増やしBAPを0.8mg/l加えた培地条件で幼植物体の葉柄を培養し、塊状の苗条原基を再び誘導することの可能であることが示された。継代培養の場合には、直径5-7mmの塊状の苗条原基が形成されるまでに、初代培養の80日に対して40日しかかからず、苗条原基の分化および増殖のスピードが著しく速くなり、試験管内での培養に対する適応とでもいうような現象が見られた。これらの原因として、野外に生育する成木の葉柄では、組織内に苗条原基の分化や増殖を阻害するような物質が多く含まれていることや、表面殺菌の際に組織が傷んだりすることなど、苗条原基塊の形成に対するマイナス要因が働いており、一方、培養中の幼植物体ではそれらが少なくなっている

いることが考えられる。

別に、この試験では葉柄と茎軸から苗条原基を形成させるために、IS培地にBAPを0.8mg/l、IBAを0.5mg/l加え、さらにNAAを4種類の濃度で加えた培地を用いた実験を行なった。この培地は、外植体として葉柄を用いると、苗条原基の分化率が低くそれほど適した培地とは思えなかった。しかし、茎軸を外植体とした場合には比較的高い苗条原基の分化率を示した。葉柄・茎軸ともNAAを0.002mg/l含む方が、苗条原基の分化および増殖に適していた。また、この培地上で誘導された塊状の苗条原基は、FeEDTAの量を多くしたIS培地上でできた苗条原基塊とはその性質を異にしていた。

この試験から、葉柄・茎軸を外植体として苗条原基塊を形成させるための培地としては、葉柄の場合には前者すなわちFeEDTAの量を多くしたBAPを0.8mg/l加えたIS培地が、茎軸の場合には後者すなわちBAP、IBA、NAAを組み合わせで加えたIS培地がそれぞれ適していると結論された。

この方法によれば、苗条原基塊を誘導して大量の幼植物体を短期間に育成することができるので、実際の造林用種苗の増殖に十分利用できる。しかし、苗条原基からのシュートの伸長に際して頂芽優勢的な現象が働いて、少数のシュートしか伸びてこないことが多く、効率良く種苗を増殖するためにはこうした点を解決することが必要

である。そのための1方法として、液体振とう培養（高山、1984）の利用などが有効であるかもしれない。また、苗条原基を毎回葉柄や茎軸から誘導するのではなく、苗条原基そのものを継代し増殖させる方法についても検討する必要がある。苗条原基自体の増殖や継代培養は一般に液体培地を用いた回転培養が行なわれており（谷口、1985）、シラカンバの場合もそのための培養条件を明らかにする必要がある。本章で可能性が示された外植体の材料や方法別の増殖法について、まとめてみると表-14 のようになる。実際の種苗の増殖については、増殖効率の点からいって苗条原基法が最も適していると考えられるが、その他の増殖法も系統の保存や実験材料の提供にはそれぞれに有用であり、いろいろな継代培養の方法を必要に応じて組み合わせて、増殖を行なって行くのが实际的であろう。

表-114 培養中の幼植物体からの継代培養方法

外植体	シュートを得る方法	シュートを得るための培地	幼植物体の再生に 要する日数	1外植体から得られる 幼植物体数
1cm程度のシュート 先端部	-	-	約2週間	1
基端部の小組織	基端部の伸長	MSI(BAP 0.4mg/lあるいは0.8mg/l ?)	約40日	1
えき芽をつけた 基軸	えき芽の伸長	IS培地(ホルモンフリー)	約20日	1
葉柄	苗条原基塊の形成	IS培地(FeEDTA 85mg/l + BAP 0.8mg/l) IS培地(BAP 0.8mg/l)	50 - 60日	20-200
基軸	"	IS培地(BAP 0.8mg/l GA ₃ 0.5mg/l NAA 0.002mg/l) IS培地(BAP 0.8mg/l)	約45日	20-200

V. カルス培養

植物の組織片をオーキシンやサイトカイニンを含んだ培地上で培養することによって、不定形の細胞の塊を形成させることができる。この細胞塊をカルスと呼び、継代培養することによって無限に増殖させることができる。カルスは潜在的に様々な組織に分化する能力を保持しており、適当な培地条件に置かれると芽や根、胚などを形成する。また、カルスは通常の分裂組織に比べ遺伝的安定性が低いとされており、カルス培養によって染色体数が倍化した細胞が高頻度で現れることが知られている（小野、1979）。組織培養の林木育種への応用分野として、カルスからの植物体再生にともなう遺伝的変異の拡大を利用する場合や、細胞融合や細胞育種などの手法を利用する場合が考えられる。細胞をあつかう場合には、一度組織から単離されたプロトプラストや個々の細胞から、植物体を再分化させる必要が生ずる。一般に、こうしたプロトプラストや遊離細胞からの植物体再生のためには、細胞のコロニーから形成されるカルスを経由して、不定芽を分化させる方法がとられている。いずれの場合にも、組織からのカルスの誘導や増殖、カルスからの器官再分化の方法が確立されていることが必須である。そこで、本章ではこうした利用を前提に、継代培養中の幼植物体の葉柄および茎軸の組織を材料とし、これらからのカルスを誘導し増殖させる方法と、誘導され

たカルスからの苗条原基の形成、および、苗条原基から幼植物体を再生させる方法について検討した。

A. カルスの形成

1. 材料および方法

供試材料として、成木の葉柄を培養して得られた幼植物体を、試験管内さしき法によって継代培養して得られた幼植物体を用いた。5-6枚の葉をつけた苗長約4cmの幼植物体を、クリーンベンチ内で寒天培地から抜き取り、シュートの中程の2-3節から葉柄および茎軸を約8mmの長さに滅菌したシャーレ上ではさみを用いて無菌的に切り分けた。この時、茎軸には葉えきのえき芽部分がかからないようにした。また、1本の幼植物体から得られた葉柄および茎軸は、それぞれ2-3本であった。これらの組織は、あらかじめ用意した試験管内の寒天培地に横にして置床した。

本試験に用いた培地は 表-15 に示すとおり、IS培地にBAPとNAAを加えた4種類の培地である。これらは、それぞれ18mm×180mmの試験管に約20mlずつ分注し、オートクレーブした0.8%寒天濃度の培地である。

培養期間中これらの培養物は、24時間日長、約1000luxの蛍光灯照明下、25℃の恒温条件下で培養した。

表-15 葉柄および茎軸組織からのカルスの増殖に用いた培地

期待する効果	基本培地	培地記号	添加した植物ホルモンの種類と量 (mg/l)		その他
			BAP	NAA	
カルスの形成	I S 培地	C 1	0.8	-	0.8% 寒天培地
および増殖	"	C 2	0.8	0.002	"
	"	C 3	0.8	0.02	"
	"	C 4	0.8	0.2	"

2. 結果および考察

茎軸を外植体として用いた場合には、外植体はどの培地でも置床後1週間で組織全体が肥大し始めた。置床2週間後にはNAAが0.02mg/lあるいは0.2mg/l含まれる培地上の外植体の両方の切り口からカルスが増殖し始めた。その後、NAAを0.002mg/l含む培地でも、カルスの形成された外植体が認められた。しかし、NAAを全く含まない培地では、その後もカルスの形成は認められなかった。形成されたカルスは、全体に暗い緑色を呈しており一部に赤褐色をした部分が見られた（図-33）。培地ごとの増殖の程度は比較的そろっており、外植体によるばらつきはあまり見られなかった。培養開始40日目におけるカルス化した外植体の割合（カルス化率）と、カルスの増殖の程度を 図-34 に示す。カルスの増殖の程度は次に示すように4段階に評価した。カルス形成が認められたがその生長は余り良くなく外植体を含めたカルスの重量が約400mg程度のものを1、やや大きなカルスの塊が形成されその重さは800mg程度であったものを2、さらに大きなカルス塊が形成されその重さが1000mg程度のものを3とした。不定芽の場合もこれに準じて評価した。これによれば、カルス化はNAAを含むどの培地でも100%起こっていた。しかし、カルスの増殖の程度は、培地に含まれるNAAの濃度によって左右され、この試験の範囲ではNAAの添加量が多い培地ほど、カルスが良く増



図-3-3 BAP、NAAを加えたIS培地上で培養した
茎軸組織からのカルスの増殖
培養開始40日目

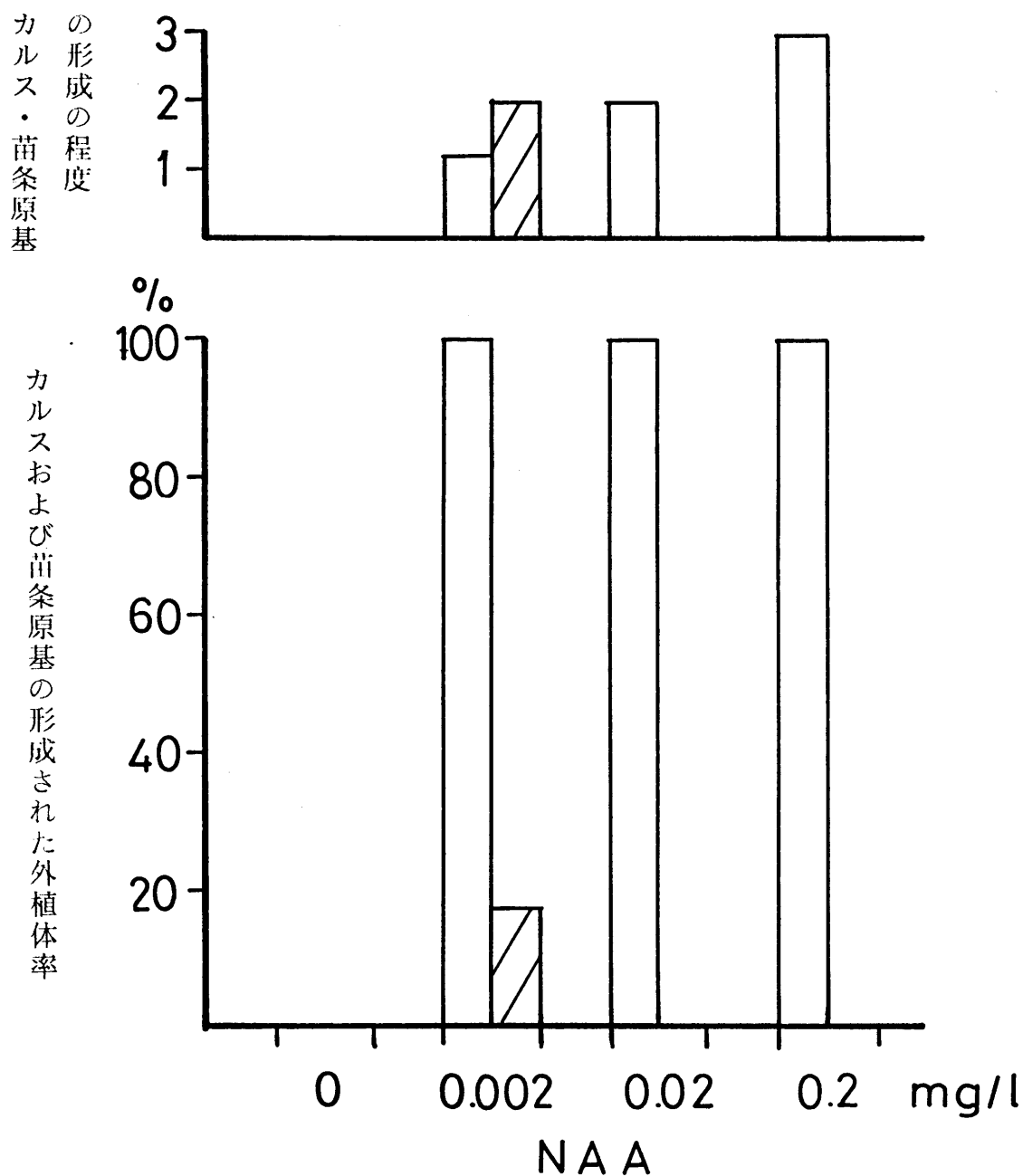


図-34 BAP、NAAを含むIS培地上で培養した
茎軸組織からのカルスの増殖

培養開始40日目

カルスの増殖の程度は次の3段階に区分した

1. カルスがわずかに形成され外植体を含めた重さが400mg程度
2. やや大きめのカルスが形成されその重さが800mg程度
3. 良く発達したカルス塊が形成され重さが1000mg程度

苗条原基の形成の程度は図-29、31に従った



殖することがわかった。また、ごくわずかではあるが、NAAが0.002mg/lの培地では苗条原基が分化した場合もあり、これはやがて増殖して塊状の苗条原基を形成した。この、苗条原基の塊の性状は、赤褐色を呈しやや大きめの苗条原基によってできあがっており、継代培養において茎軸をBAP、NAA、IBAを含むIS培地上で培養して得られたものとおなじようであった。

葉柄を外植体として用いた場合には、カルスの形成は茎軸を用いた場合よりもややおくれ、置床後20日目頃より葉柄基部の切り口から始まった。形成されたカルスの外観は、茎軸から誘導されたカルスとほとんど変わらなかった（図-35）。置床後40日目のカルス化の様子を 図-36に示す。図-36で明らかなように、カルス化率ではNAAが0.02mg/lの場合と0.2mg/lの場合でそれぞれ100%を示していたが、増殖の程度ではNAAが0.2mg/lの時が最も優れていた。また、茎軸の場合には全くカルス化の見られなかったNAAを全く含まない培地でも、わずかながらカルス化が認められた。茎軸ではNAAが0.002mg/lでも100%のカルス化率であったのに対して、葉柄を用いた場合にはカルス化したものは全く見られなかった。葉柄を用いた場合のカルスの増殖の程度は、同じNAA濃度の培地内でも、外植体によってばらつきが大きく、茎軸の場合と異なっていた。これは、葉柄がもとと茎軸に比べて細くその組織内に蓄積されている養分が少ない



図-35 BAP、NAAを加えたIS培地上で培養した
葉柄組織からのカルスの増殖
培養開始40日目

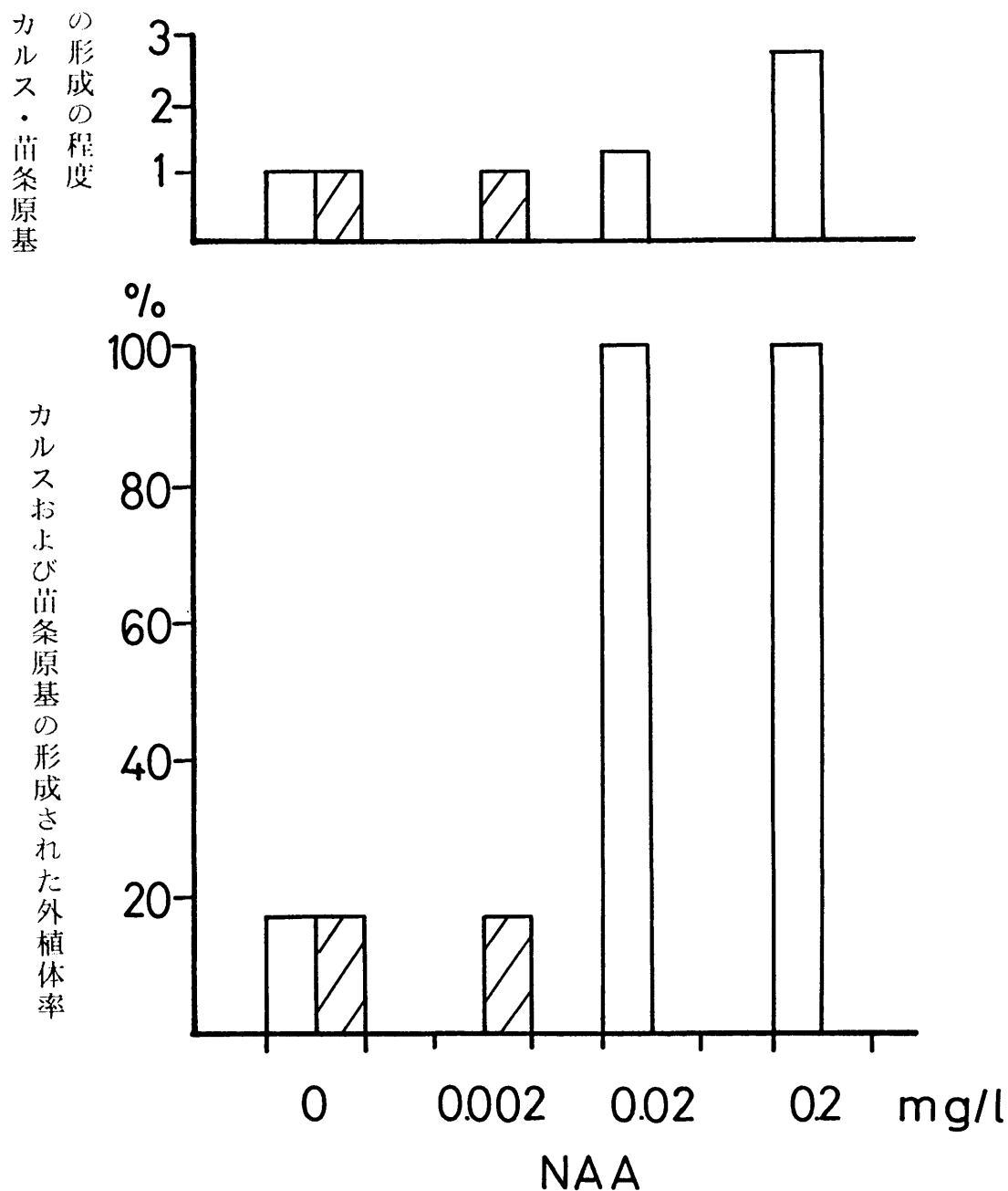


図-36 BAP、NAAを含むIS培地上で培養した
葉柄組織からのカルスの増殖

培養開始40日目

カルスの増殖の程度は次の3段階に区分した

1. カルスがわずかに形成され外植体を含めた重さが400mg程度
2. やや大きめのカルスが形成されその重さが800mg程度
3. 良く発達したカルス塊が形成され重さが1000mg程度

苗条原基の形成の程度は図-29、31に従った



カルス



苗条原基

うえ、シュートに付いていた時の位置や、葉の新旧によって変動が大きいのではないかと考えられる。なお、葉柄の場合でもNAAを含まない場合や0.002mg/lの培地上で、苗条原基を形成した外植体が認められたが、それらのその後の増殖はあまり良くなかった。得られた塊状の苗条原基は、茎軸の場合と同じような性状を示していた。このように、継代培養中の幼植物体の茎軸および葉柄を外植体として用い、カルスを誘導し増殖させることができた。いずれの外植体を用いた場合にも、この試験の範囲内ではNAAの濃度が高くなるとカルスの増殖が旺盛になり、特に、NAAが0.2mg/lの時が最も優れていた。また、NAAが0.002mg/lの時や0mg/lの培地では時として苗条原基の形成が起こることがあった。一般に、不定芽の形成とカルスの形成とはオーキシンとサイトカイニン量のバランスによって決定されていると考えられ、Haplopappus (Tanaka and Ikeda、 1983) などですぐそれが確かめられている。本研究でも、NAAの量の違いによってそうした現象が認められたことになる。ここでは、サイトカイニンやオーキシンの種類や量をいろいろに変化させる試験は行わなかったが、これらを変化させることによりここで得られたものと異なった性状のカルスが形成されるものと考えられる。

B. カルスからの幼植物体の再分化

1. 材料および方法

ここでは、前節において、BAPを0.8mg/l含みNAAを0.2mg/l含むIS培地上で茎軸および葉柄から形成されたカルスを供試材料として用いた。これらのカルスは、クリーンベンチ内で培養中の試験管から3%寒天シャーレ上に取り出し、およそ150mgの小塊にメスを用いて無菌的に切り分けた。このとき、カルス化の際に外植体として用いた茎軸や葉柄の組織の残骸が切り分けたカルスの小塊に含まれないように注意した。また、カルス表面に不定芽あるいは苗条原基が分化していないか実体顕微鏡を用いて注意深く調べたが、いずれのカルスにもそれらしい組織は認められなかった。カルスの小塊は、試験管内に用意した不定芽の再分化を期待する寒天培地に軽く押し付けるように置床した。

ここで、カルスからの不定芽の再分化のために用意した培地は、表-16 に示される4種類の培地である。これらは、カルスの誘導および増殖のために用いた培地のそれぞれに、IBA 0.5mg/lを加えたものであり、継代培養において茎軸や葉柄から苗条原基を誘導する際に用いたものと同一である。また、分化した不定芽からシュートを伸長させるための培地として、IS培地にBAPを0.8mg/l加えた培地を、さらに、それらのシュートからの発根を期待する培地として、

表-16 カルスからの幼植物体再分化に用いた培地

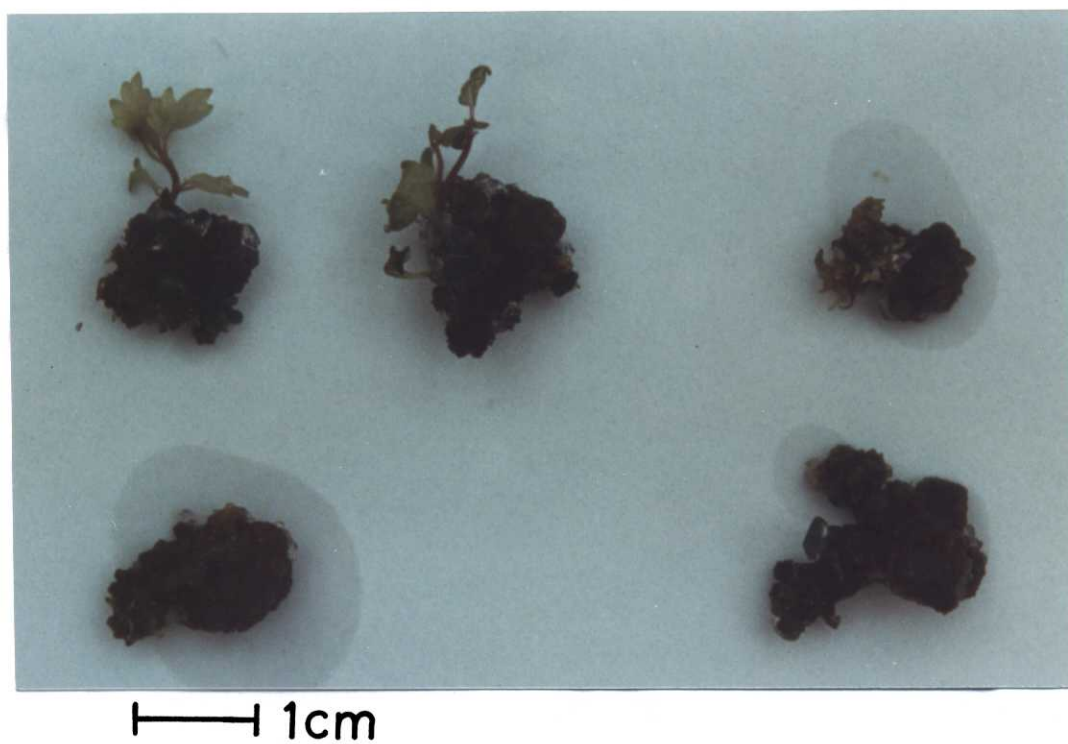
期待する効果	基本培地	培地記号	添加した植物ホルモンの種類と量(mg/l)			その他
			BAP	GA ₃	NAA	
カルスからの苗条 原基の分化	I S 培地	S 1	0.8	0.5	-	0.8%寒天培地
	"	S 2	0.8	0.5	0.002	"
	"	S 3	0.8	0.5	0.02	"
	"	S 4	0.8	0.5	0.2	"
苗条原基塊からの シュートの伸長	"	E	0.8	-	-	"
	"	R	-	-	-	"
シュートの発根	"	R	-	-	-	"

ホルモンフリーのIS培地を用意した。すべての培地は0.8%の寒天濃度で、それぞれ、18mm×180mmの試験管に約20mlずつ分注してオートクレーブした。

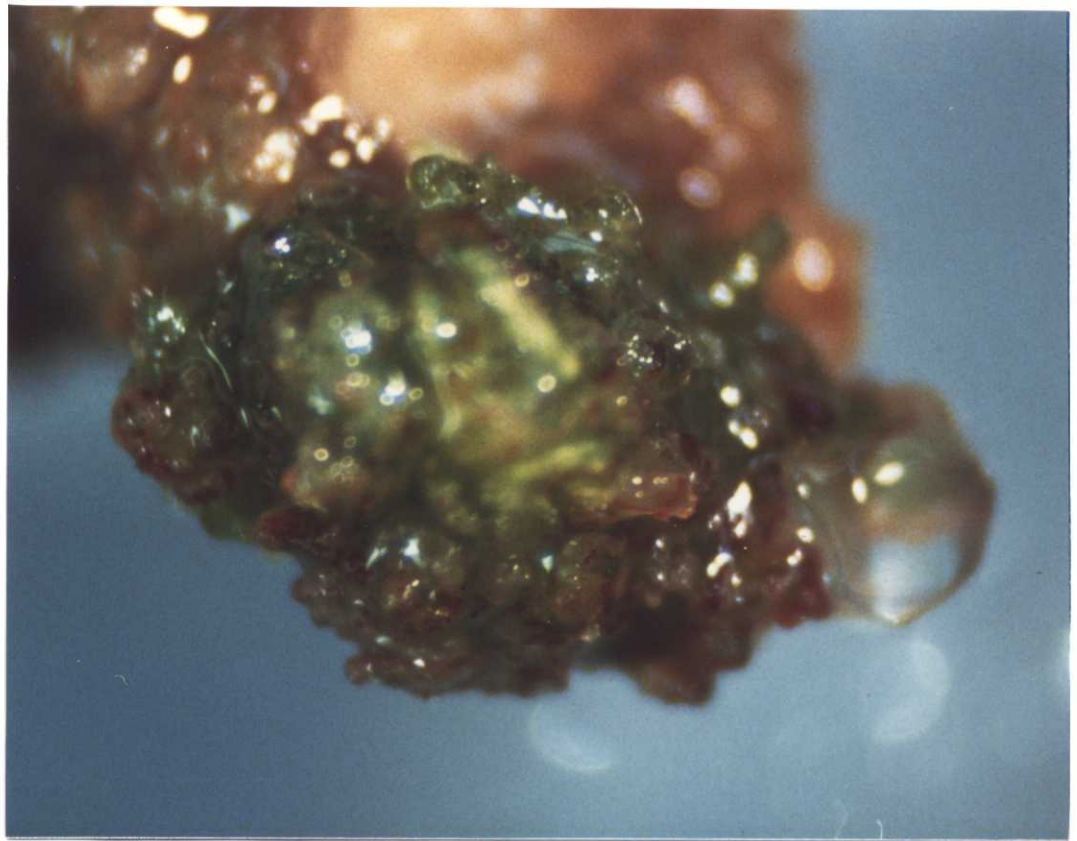
培養物はすべて、24時間日長、約5000luxの蛍光灯照明下、25℃の恒温条件下で培養した。

2. 結果および考察

不定芽の分化を期待するIS培地に移されたカルスは、移植後全く増殖しなかった。初め暗緑色を呈していたカルスは、移植10日目頃から徐々に変色と萎縮を始め、3週間後には表面が灰色がかった組織塊に変わってしまった。この時点で、いくつかのカルスをメスを用いて半分にして観察したところ、灰色の外皮で被われた内側は緑色の組織が詰まっており、生きていることがわかった。そのまま培養を続けたところ、移植後30日目には一部の組織の表面に赤色の点が見られた。赤色の点はその後生長して苗条原基となり増殖を続け、移植後50日目には2mmから6mmの苗条原基塊を形成した（図-37、38）。これは、Huhtinenら（1974）が、*Betula pendula* の実生から誘導したカルスからシュートを再生させた時の様子とは異なっているようにみえた。すなわち、Huhtinenらの場合、不定芽は同時多発的にカルス表面のあちこちから多数分化しているように見え、大多数の



図－37 茎軸由来のカルスから再分化した苗条原基の塊の様子
再分化培地へ移植50日目



└── 1mm

図－38 カルスから形成された苗条原基塊の様子
小さな粒がすべて苗条原基
再分化培地へ移植50日目

カルス細胞は、用いられた培地条件において不定芽を再分化させる能力を持っていたと考えられる。それに対し、本試験の場合には、カルス表面に形成された最初の苗条原基は1-3個程度で、その少数の苗条原基が分裂生長し塊状の苗条原基を形成していった。このことは、この培地条件下では、限られた一部のカルス細胞だけが苗条原基を分化させる能力を備えていたにすぎないと推定される。カルスからの再分化個体を育種的に利用しようとする場合には、より多くのカルス細胞から幼植物体が再生した方が有利であると考えられ、その意味では Huhtinenらの場合のような再分化のしかたが望ましい。しかし、本試験の場合一般に再分化が難しいとされる成本由来の組織から分化したカルスを供試材料として、幼植物体の再分化に成功している点は評価されよう。

図-39 に再分化培地に移植50日目における、カルスの起源別、培地中のNAAの量別の苗条原基の形成率を示す。これを見ると、茎軸起源のカルスでは、NAAが0.02mg/lあるいは0.2mg/lの培地で苗条原基が形成され、特に、NAA 0.2mg/lの培地で30%近くの再分化率を示した。NAAが含まれない培地やNAAが0.002mg/lの培地では、全く再分化が認められなかった。一方、葉柄由来のカルスでは、NAAが0.2mg/lの培地では、全く苗条原基の形成は見られなかったのに対し、NAAが0.02mg/l以下の培地や、NAAを全く含まない培地でも30%

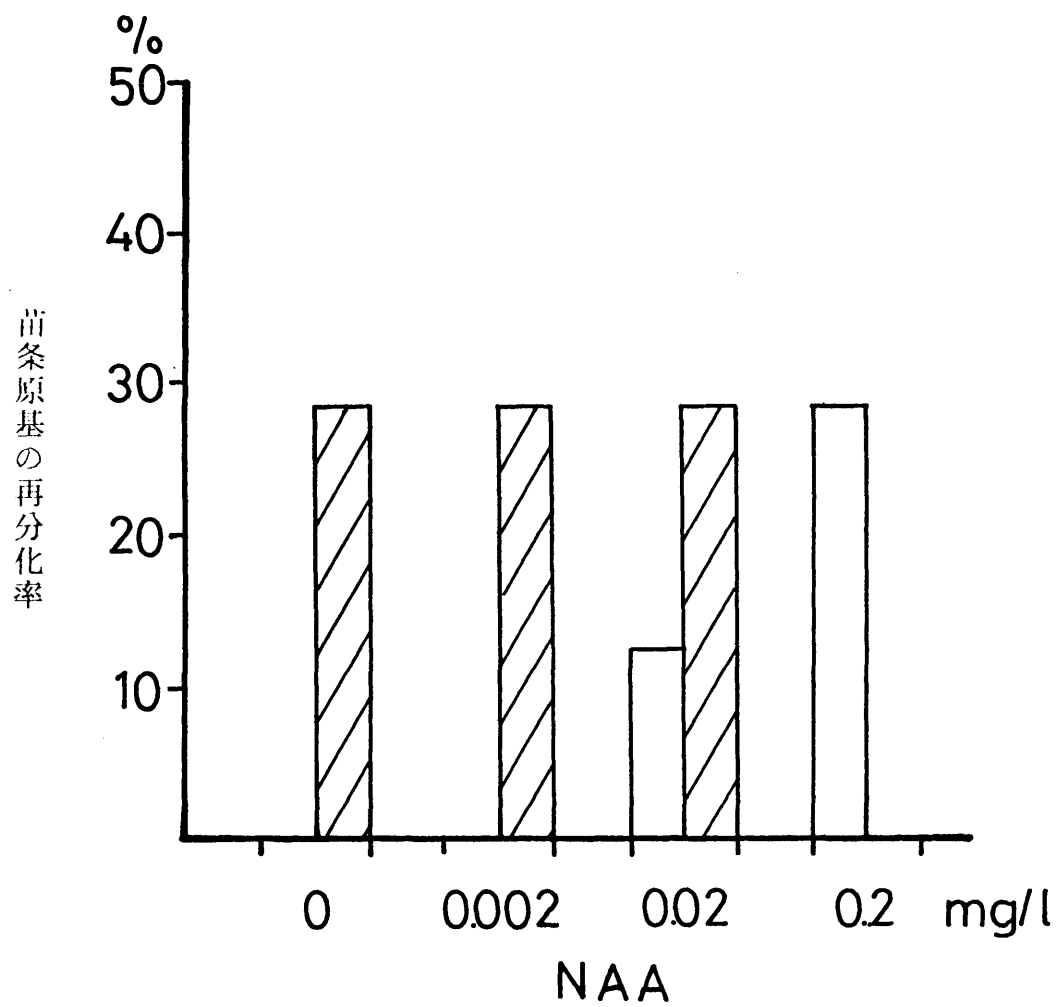
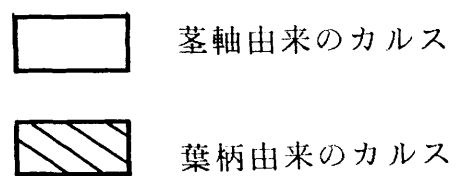


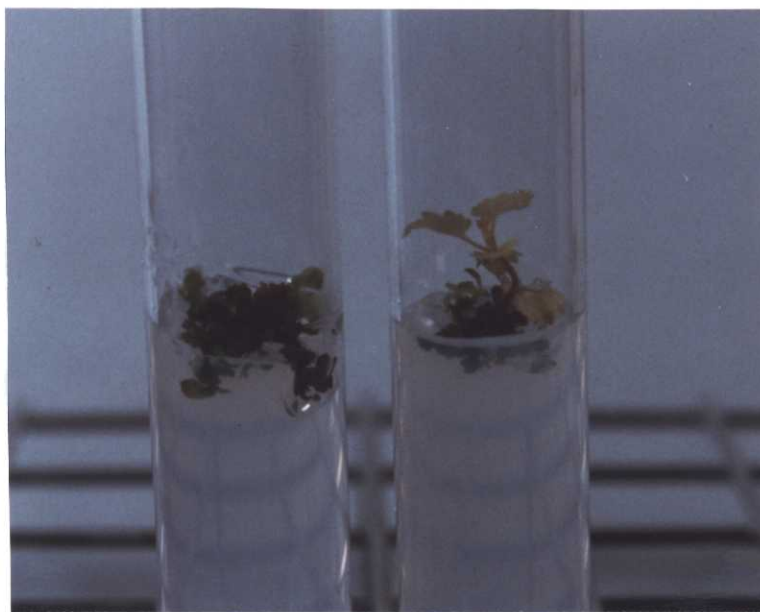
図-39 カルスからの苗条原基の再分化
再分化培地へ移植後50日目



近い再分化率を示した。このように、全く同じ培地条件で異なる組織から誘導したカルスを、同じ再分化培地で培養したにもかかわらず、カルスの起源となる組織が異なると苗条原基の分化に適した培地条件が異なるという結果になった。

形成された塊状の苗条原基をもとのカルス組織から切り離し、発達の良いものは、直径3-5mmの小塊に分け、また、それほど発達していないものはカルスから切り離しそのままシュートの伸長を期待する培地に移植した。一部にはカルスから切り離す以前に伸長を始めたシュートもあったが、大部分は移植後2-3日目から、複数のシュートの伸長を開始し、20日目にはシュートの長さは長いものでは約1cmになり、2-3枚の葉を展開した（図-40）。1つの苗条原基の塊からは10本程のシュートが伸長したが、ここでも、頂芽優勢によると考えられる少数のシュートだけが良く伸びる現象が見られた。これらのシュートの塊を、2-3本のシュートを含む4-5個の小塊に分割し、ホルモンフリーのIS培地に移したところ、早いものでは5日目から発根が開始され、20日後にはすべてのシュートの塊から発根しているのが観察された（図-41）。

このように、カルスから再分化した苗条原基からも、葉柄や茎軸から直接分化した苗条原基と同じようにシュートが伸長し、それらを発根させて幼植物体を得ることができることが示された。これら



図－4 0 カルスからの再分化した苗条原基より
伸長を開始したシュート
シュートの伸長を期待する培地へ移植後1週間目



図－４１　カルス経由で得られたシュートが発根して
再生した幼植物体群
発根培地へ移植後1か月目

の、カルスから再分化した幼植物体が遺伝的に変化しているかどうかについては今後検討を行う予定である。

C. 結論

本章では、継代培養中の幼植物体から得られた茎軸および葉柄の組織からカルスを誘導・増殖させ、そのカルスから再び植物体を得ることができることを示した。

組織のカルス化に対しては、IS培地にサイトカイニンとしてBAPを0.8mg/l、オーキシンとしてNAAを0.2mg/l加えた培地が、外植体として葉柄・茎軸のどちらを用いた場合にも有効であった。NAAの量が少なくても、カルス化する場合もあったが、カルスの増殖はいずれもNAA 0.2mg/lの場合に比べ劣っていた。形成されたカルスは、いずれも表面が暗緑色を呈した。

このようにして誘導されたカルスを、BAPを0.8mg/l、IBAを0.5mg/l、NAAを4種類の異なった濃度で加えたIS培地に移して不定芽の再分化を図ったところ、どの培地からも苗条原基が形成され、それらはやがて塊状の苗条原基を形成した。この場合、カルスを誘導するために用いた組織が、葉柄であるか茎軸であるかによって、苗条原基の分化に適したNAAの濃度に差があることが観察された。茎軸から誘導されたカルスの場合は、NAAが0.2mg/lの時に最も多く

のカルスで苗条原基塊の形成が見られたが、葉柄経由のカルスの場合には、NAAが0.2mg/lの培地では、全く苗条原基の分化は見られず、それ以下の場合においてのみ苗条原基塊が形成された。

このようにしてカルスから再分化した苗条原基は、葉柄や茎軸の組織から直接形成された苗条原基の場合と同じようにして幼植物体を再生させることができた。一連のカルス培養の方法が確立されたことによって、シラカンバにおいてもカルス培養による変異体の作出や細胞融合などの実現に大きく近付いたものと考えられる。

本試験では、外植体から誘導されたカルスを継代培養せずに、直接再分化培地へ移し苗条原基の分化を図ったが、それでもカルスからの苗条原基の再分化率は30%を超えなかった。一般に、カルスは継代すると再分化能が低くなると考えられているが、シラカンバにおいてもそのようなことが起こる可能性がある。しかし、カルス培養を育種的に利用していく場合には、何代も継代したカルスであっても高頻度で植物体を再分化することが望まれるので、カルスの増殖やカルスからの植物体の再分化により適した培地条件の検索が必要と考えられる。

VI. 作出された幼植物体の環境馴化

これまでの章では、試験管内での幼植物体の増殖について、いろいろな母材料から得られた種々の外植体を用いて検討してきた。その結果、葉柄や茎軸を培養し塊状の苗条原基を誘導する方法で急速に幼植物体を増殖できることがわかった。これによって、試験管内での大量増殖法は確立されたといってよい。しかし、実際の苗木生産では、これら試験管内に再生した幼植物体を培地から抜き取って普通の培養土に移し替え苗木として育成する必要がある。幼植物体を外部環境へ移す場合、幼植物体は無菌状態から有菌状態へ、培地中の高栄養状態すなわち従属栄養的状态から土壌中の貧栄養状態での独立栄養に、また、試験管内の高湿度から通常の湿度へ、さらに培養室内の恒温状態から変温状態へと、急激な環境の変化を受ける。このため、幼植物体を直接野外へ出せば急速に萎凋し枯死してしまう。そこで、そのような環境の激変を緩和して徐々に外の環境に慣らしてやる必要がある。このための手続きを外部環境への馴化、あるいは単に馴化と称している。通常、組織培養による種苗の増殖では馴化の作業にかなりの手間がかかり、この成否が最終的な種苗の増殖効率を決定するといえる。

本章では、試験管内である程度の大きさに生育した幼植物体を用いて、これらの幼植物体が一定の方法により外部環境に馴化し試験

管の外へ出した後も正常に生育することを示した。

1. 材料および方法

1986年5月中旬に培養中の幼植物体をポットに移植する馴化試験を開始した。供試材料として試験管内さし木法で継代培養した幼植物体を用いた。40mm×80mmの培養びん内で苗長約5cmに育ち、葉を5-6枚つけ、4本以上の太い根を持ち、その長さが平均3cm以上の幼植物体を60本用意した。この時、幼植物体が発根培地へ移されてからの期間は問わなかったが、概ね30-50日の範囲に入っていた。これらを、実験室内で寒天培地から抜き取り直ちに水を張ったバットの中に入れ、水中で根についた寒天培地を良くもみ落とした。根を洗った幼植物体は、口径8cm 高さ7cmの黒いビニール製のポットに、バーミキュライト約200cm³を培養土として用い、手早く植え付けた。幼植物体を植え付けたポットは、全体を水につけバーミキュライトに十分吸水させた後、それぞれ透明なビニール袋に入れ密閉した。ビニール袋中の幼植物体は、実験室内で終日約1000luxの蛍光灯照明下に置いた。ポットに植え付けてから1週間は、ビニール袋に密閉したままにし、2週間目に入ってから1日の内一定の時間はビニール袋の口を開いて中の湿度の調節をした。ビニール袋の口を開く時間は、1日連続30分から始め、1日につき30分ずつ長くして行

き6日目には3時間とした。植え付け2週間後にはビニール袋からポットを取り出してミスト装置のあるガラス室に移した。ミストの噴霧は20分ごとに10秒とした。

ガラス室内に置いてから2週間後に、コーティング肥料100日タイプ (N:P:K=16:10:10) を1ポットあたり約300mg施した。

2. 結果および考察

ポットに移植直後の幼植物体の様子を 図-42 に示す。ポットに植えられてからしばらくは、幼植物体に何の変化も見られなかった。その後、移植1週間目ころからほとんどの幼植物体で新しい葉が展開しはじめ、一部にはシュートの伸長が認められた。また、もともと展開していた葉は薄手であったのが、やや厚さを増して光沢が認められるようになった。ところが、移植10日目頃から一部の幼植物体ではシュートの先端部の新しい葉の展開している部分が黒変萎凋し始め、黒変部は徐々にシュートの下の方に広がった。また、あるものでは、根元近くの葉からカビの汚染が始まり菌糸が蔓延してしまった。このように、カビや雑菌に冒されてしまったものは全体の25%に達した。これらの幼植物体はビニール袋から出すまでは、緑色の部分を保っていたが、ガラス室内に移した後やがて全体が黒変萎凋し、ほとんどは枯死してしまった。このようなカビの繁殖や病



図-42 ポットに植え付けられビニール袋に
密閉された幼植物体



図-43 馴化の過程を終わりガラス室で生育中の植物体
ポットへ移植後1か月目

害の起きる原因として、ビニール袋内の湿度が高くカビや雑菌が繁殖するのに適した環境であること、寒天培地の除去が不完全であった場合には、培地中のショ糖などが栄養源となるため、一層それらが繁殖しやすいことなどがあげられる。そこでこのような、カビやバクテリアの汚染による枯死を回避するために、幼植物体からできるだけ丁寧に培地を落とすことや、水洗に用いる水や培養土、ポットなどもできるだけ清浄なものを用いる必要があるであろう。また、場合によっては、移植時にベンレート水和剤など適当な殺菌剤を用いることも検討する価値があると考ええる。

移植2週間後にガラス室内に移したポット中の幼植物体は、ビニール袋内で何等かの汚染が見られたものを除いて、その後順調に生育した。ガラス室内に移して1週間後には、新しいシュート伸長や葉の展開が盛んになり、茎の部分も緑色から赤褐色に変化し、やや木質化し始めた。さらに、1週間後には葉柄や葉脈の色も緑色から赤褐色に変化し、葉質もかなり厚手になった。これらの様子から、この時点ではほぼ馴化の過程が終了したものと考えられる（図-43）。このことから、ポットへ移植してから通算4週間が馴化に必要な期間ということが出来る。この間に馴化に成功した幼植物体は、カビなどで地上部だけが枯れてその後新しいシュートが伸長したものも含めて、全体の77%であった。馴化に成功した個体はその後生長を

続け、ポットに移植してから2か月後には、さらに茎の木質化が進み、根系の良く発達した苗長7-8cmの苗に育った（図-44）。

本試験では、以上のような手続きで、試験管内で増殖した幼植物体を外部の環境に馴化させ苗とすることができることが明らかになった。しかし、馴化の過程で、かなりの頻度でカビなどに汚染され枯れてしまうものもあったことや、ビニール袋を用いたために袋の開閉などに手間がかかったことなどから、今後より効率の良い馴化法の検討を行う必要があるだろう。

3. 結論

組織培養による幼植物体の大量増殖法を実際の種苗の増殖に利用しようとする場合、幼植物体の環境への馴化が適切に行えることが重要である。試験的には、ここで行なった方法でシラカンバの幼植物体の馴化ができることが明らかとなった。このことにより、組織培養による増殖法が現実のシラカンバの増殖や育種に対して有効な手段となり得ることが示されたと言えよう。実際の種苗生産に際しては、より簡単でカビなどの汚染が起こりにくい馴化方法の確立が必要であると考ええる。また、ここでは馴化に供する幼植物体の大きさなどについては検討しなかったが、幼植物体の大きさによって、その後の苗木としての生育状況に差がでるものと考えられ、今後検



図－４４ ポットに移植後2か月目の苗の様子

討してゆく必要がある。さらに、馴化に引き続いて山行苗に育てあげるための育苗方法の開発も今後の課題である。McCown and Amos (1979) は、組織培養で得られた、カンバの苗と実生苗では苗畑での生育特性に違いがみられるとしている。本試験で得られたシラカンバの苗についても、そのようなことが起こり得ると考えられるので、育苗方法と合わせて調査しておく必要があるだろう。

Ⅶ. まとめ

本研究で得られたシラカンバの組織培養に関する成果は、表-45のようにまとめられる。まず、齢の異なるシラカンバから組織培養の手法を用いて試験管内に幼植物体を再生させる方法を確認した（初代培養）。次いで、初代培養によって試験管内に再生した幼植物体のいろいろな組織を外植体として用いることによって、試験管内でシラカンバの幼植物体を永続的にかつ大量に増殖させる方法を確認した（継代培養）。また、培養中の幼植物体の組織からカルスを誘導し、さらに、そのカルスから再度幼植物体を分化させることに成功した（カルス培養）。最後に、これらの試験で生産された幼植物体を野外の環境に馴化させ、シラカンバの苗木として育てることが可能であることを示した（幼植物体の環境馴化）。本章では、本研究で得られた主な結果の概要を示すとともに、今後の課題、また、組織培養によるシラカンバの増殖の利用について述べまとめとする。

1. 得られた成果

（1） 初代培養

無菌的に発芽させたメバエや1年生苗木、成木などどのような齢のシラカンバでも、その組織の一部を無菌的に培養することによって試験管内に幼植物体を再生させることができた。

継代培養

初代培養

実験室外

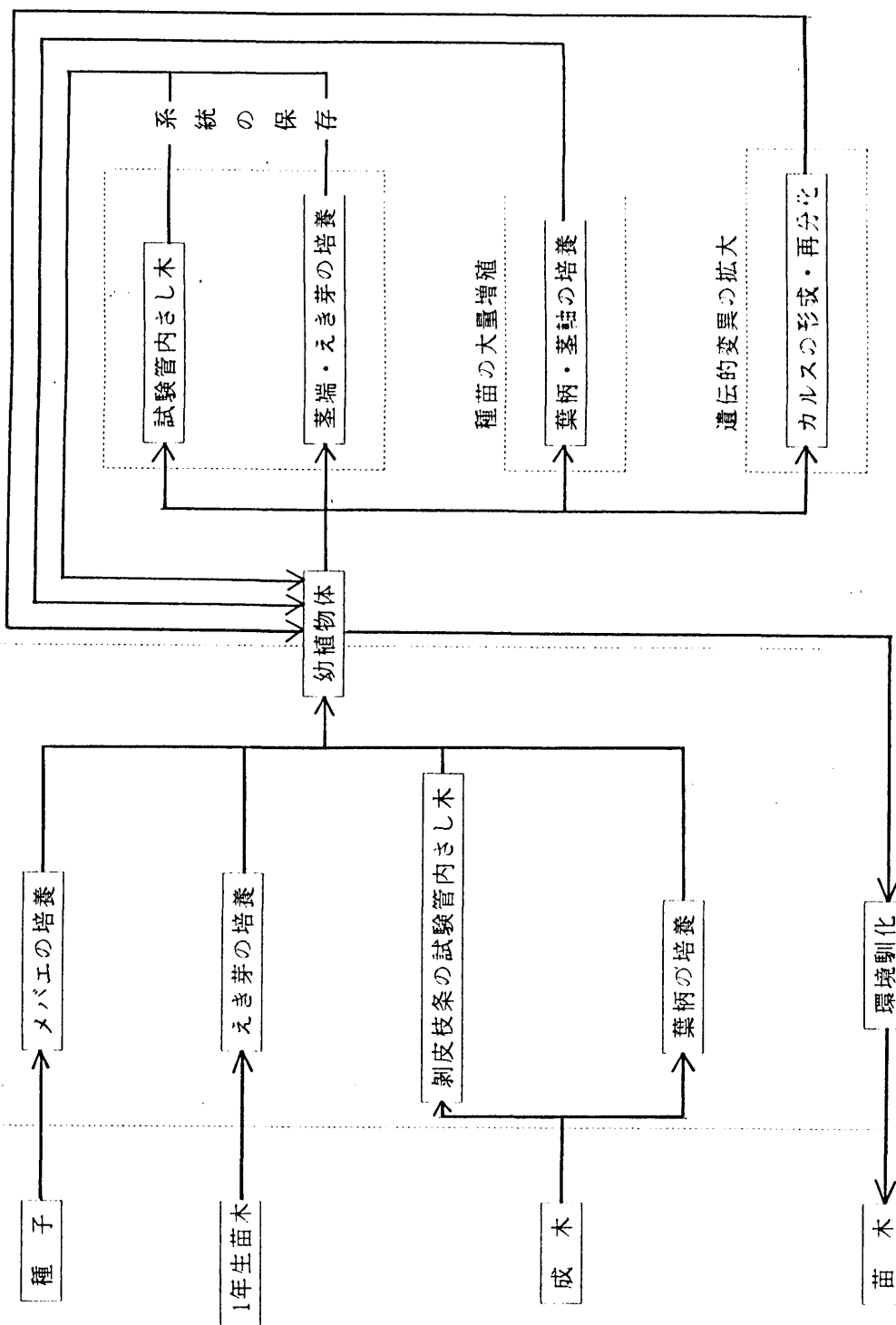


図-45 本研究において確立されたシラカンバの組織培養技術の流れ

メバエの場合には、子葉の葉えきからえき芽を発芽させる方法で複数のシュートを得、それらのシュートを発根培地上で発根させて幼植物体を得ることができた。また、1年生苗木の場合には、2年目に新しく伸びた細い枝の葉えきについたえき芽を短い枝の組織とともに培養することによってえき芽を発芽伸長させシュートを得た。この場合には、シュートを切り取って発根培地へ移すことなく、初めの培地上で外植体から直接発根して幼植物体を再生した。メバエや1年生苗木の場合の増殖方法は、組織上に既に存在している芽を発芽、伸長させる方法でありいわゆる芽培養（石原、1979）の範ちゅうに属する方法といえる。既にある芽をそのまま伸長させるため、これらの方法によって1外植体から得られる幼植物体の数は限られており増殖効率は高くない。しかし、遺伝的に安定した幼植物体が複数得られるため、次代検定や遺伝子解析、苗木や比較的若い林からの早期選抜などに対して有効な方法であるといえる。

成木を材料とした場合には、まず1年生の枝を用いた剥皮枝条の試験管内さしき法（斎藤、1983）による増殖を行った。これは、剥皮した枝の形成層組織から不定芽の誘導し、それからシュートを伸長させ、それを切り取って発根培地に移し幼植物体を得る方法である。本法では1外植体あたり数本の幼植物体を得られた。また別の方法として、葉柄の組織を培養することによって、いわゆる苗条原

基 (Tanaka and Ikeda, 1983) を分化・増殖させることが出来た。増殖した苗条原基を分割して別の培地上へ移すことにより、多数のシュートを伸長させ、さらに発根培地に移して幼植物体を再生させることが出来た。この増殖方法では、1外植体あたり100 - 200の幼植物体が再生し、本研究で確立した初代培養方法のうちもっとも増殖効率が高かった。苗条原基が茎頂組織以外から誘導されたという報告は今までになく、林木の組織培養による増殖法としては画期的な方法を提供したといえる。また、従来 *Betula* 属の樹木の組織培養では成木からの増殖に成功した例はなく、本方法はシラカンバの成木からの精英樹選抜や種苗の大量増殖に貢献するものである。

初代培養においてメバエから成木までのすべての発育段階のシラカンバから幼植物体を再生させることができたことは、上にのべた遺伝・育種的な利用面ばかりでなく、植物における加齢や若返りの問題を解明する上で有効な手段を提供するものといえる。

(2) 継代培養

初代培養によって試験管内に再生した幼植物体の比較的大きなシュートや、シュートの先端部の小さな部分、短い茎軸組織についたえき芽、葉柄、茎軸など様々な組織を用いて、永続的な試験管内での幼植物体の増殖が可能であることを示した。

試験管内さしき法による増殖では、比較的大きなシュートを発根

培地にさしきすることによって幼植物体の増殖が可能である。本研究では、シュートの発根効率を高める為に培地中のオーキシンの種類や量、ショ糖の量について検討し適当な継代培養条件を明らかにした。これらの条件は試験管内さし木法だけでなく、他の培養法における発根培地についても適用することができると考える。茎端の培養では、最適な培養条件が明らかになったとはいえなかったがこのような微小な組織からも幼植物体の再生が可能であることが示された。これによって雑菌の感染のない幼植物体を作り出すことが可能となり、プロトプラストの単離などに培養中の幼植物体の組織が利用できる道を開いた。また、短い茎軸の組織とともにえき芽を培養した場合には、えき芽の伸長と外植体からの直接発根が認められ、そのまま幼植物体が再生し、試験管内さし木法に比べて効率の良い増殖法を提供した。以上の方法はメバエや苗木を用いた初代培養の場合と同じく芽の培養ということができ、遺伝的な安定性を利用した、試験管内での系統保存技術として位置付けることができる。

葉柄や茎軸の増殖では、初代培養と同じ苗条原基法による増殖が可能であることがわかった。しかし、苗条原基の分化、増殖に最適な培地条件は、葉柄を外植体とした場合と茎軸を外植体とした場合とでは異なっていた。どちらの場合も、初代培養で葉柄から苗条原基法によって幼植物体が再生するまでの期間に比べ、継代培養では

大幅に期間短縮が図られた。この方法を繰り返し用いることによってシラカンバのクローンを急速大量に増殖することが可能となった。

(3) カルス培養

試験管内で継代培養中の幼植物体の葉柄や茎軸の組織からカルスを誘導するための培地条件を明らかにした。この場合、葉柄よりも茎軸のほうがカルス形成のための組織として適していた。形成したカルスを再分化培地に移し苗条原基を誘導する方法と、それから塊状の苗条原基を経て再び幼植物体を得るための培地条件を明らかにした。この場合、葉柄起源のカルスと茎軸起源のカルスでは、苗条原基の再分化に適した植物ホルモンのバランスが異なっているように見えた。カルスの形成とカルスからの幼植物体再分化の条件が明らかになったことにより、シラカンバにおいてカルス培養による遺伝的変異の拡大や細胞育種が可能であることが示された。

(4) 作出された幼植物体の環境馴化

組織培養によって試験管内に再生した幼植物体を野外で苗木として育てるための方法について検討した。幼植物体を培養びんから出してポット内のバーミキュライトに植え付け、徐々に外部環境に慣らしてゆくことによって約4週間で馴化の作業が終了することが示された。これによって、組織培養による大量増殖技術が現実のシラカンバの種苗生産や育種に利用できることが明らかになった。

2. 今後の課題

本研究においては、シラカンバの組織培養による増殖に関して必要と考えられる技術の大部分について、実際に培養を行うことによって実現の可能性が示された。しかし、個々の技術については今後研究を重ね、より実際の利用に適したように改良して行く必要のある点も多い。ここでは、それぞれの培養方法について検討の必要な点を挙げるとともに、さらにそれらを発展させるために必要な研究について触れ、今後の目標とする。

(1) 初代培養

表面殺菌方法の改善 初代培養では野外に生育する植物体を母材料とするため表面殺菌が必要である。本研究では、外植体の種類によってはかなりの部分が雑菌やカビに汚染されてしまい残存した外植体が大変すくなくなってしまう場合があった。そこで、より効率良く初代培養による幼植物体の再生を成功させるために、外植体や採取時期ごとに最適な表面殺菌方法を確立しておく必要がある。

(2) 継代培養

生長点や茎端など微小组織を用いた増殖法の確立 本研究では茎端部の組織を用いた増殖が可能であることが示されたが、その成功効率は必ずしも高くなかった。初代培養で比較的大きい外植体を用いているため、試験管内に再生した幼植物体はかなりの割合で雑菌

などを保持していると考えられる。これらを少なくあるいはなくするためには、できるだけ小さな組織から幼植物体を再生する必要がある。そこで、茎端や生長点などの組織からの幼植物体再生を可能にする培養条件についての一層の検討が求められる。

苗条原基法による増殖方法の改良 葉柄や茎軸を用いた苗条原基法による増殖は、シラカンバのクローンの急速大量増殖への道を開いたが、本研究で示した方法では、苗条原基そのものを毎回葉柄や茎軸から誘導しており苗条原基が分化するまでの期間を相当必要としている。これを省略するために、苗条原基そのものを継代的に増殖する方法の開発が望まれる。また、苗条原基からシュートが伸長する際に頂芽優勢が働いて少数のシュートしか伸長しないことが観察されたが、すべての苗条原基から同じようにシュートを伸長させる方法として液体振とう培養法を検討する必要がある。

(3) カルス培養

カルスからの苗条原基の再分化効率の向上 本研究ではカルスからの苗条原基の再分化率は30%以下であった。育種的にカルス培養による変異の拡大を利用しようとする場合、カルスから再分化してできた植物体が必要とする有用な変異を持っている可能性は多くない。そこで、できるだけたくさんの植物体をカルスから再分化させる必要があると考えられる。そこで、どのようなカルスからも高い

再分化能率で植物体を再生させ得る条件の検索が課題となる。

継代したカルスからの器官再分化 本研究では外植体から誘導されたカルスを直接再分化培地に移して苗条原基を誘導した。しかし、上で述べたような利用を考えると、何代も継代培養したカルスからの器官の再生ができることも必要であり、再分化能力を失わせないでカルスを継代培養するための培地条件や、再分化培地の確立などが求められる。

(4) 作出された幼植物体の環境馴化

馴化の効率向上と手続きの簡素化 組織培養による種苗の増殖を行おうとする場合、馴化と土壌への移植が最も大きな難関である。本研究では、実験的には馴化が可能であることを示したにとどまったため、その方法が極めて繁雑であった。実際に種苗を生産しようとする場合には、より簡単な方法で短期間に馴化の過程を終わらなければならないので、馴化に必要な環境条件についての検討や、そのための施設などについても研究をすすめる必要がある。また、それに引き続く育苗方法の確立も急務である。

3. シラカンバの育種における組織培養による

クローン増殖法の利用

ここでは、今までに述べてきた組織培養によるシラカンバのクローン増殖法が、実際の育種の中でどのような役割を果たすことができるかについて考えた。

シラカンバの育種方法は生産物の利用形態によって異なると考えられる。シラカンバの利用として、まず、比較的高い伐期の施業を行い材そのものを利用しようとする方向が考えられる。パルプ材などとしての生産を考える場合はこれに相当するであろう。この場合には、通常の精英樹選抜を行い、組織培養によるクローンの増殖を行いその種苗を用いて造林を実行する、造林と同時に平行してクローン検定を行い優良クローンを選定し、次回の造林からは不良クローンを除外してゆく方法がとられるだろう。また、バイオマス生産、特に、家畜の粗飼料としての利用を想定する場合には、超短伐期施業によって材だけではなく葉なども含めた全木の利用が考えられる。この場合にも、用いる系統によって生産量に大きな差が出ると考えられる。そこで、母樹あるいは産地によるバイオマス生産量の違いを明らかにすることによって、まず実生系統の系統選抜を行い、それと同時に、それぞれの優良系統内での個体選抜を行う。選抜された個体は、ただちに増殖に移し造林に供することとなる。これらの

場合、経常的な育種は選抜個体間の交配によって行なわれるか、胚培養による半数体作出による育種法、カルス培養による変異の拡大、あるいは、細胞育種や細胞融合などの手法によって達成されるであろう。シラカンバの育種の方法と、組織培養技術の関係は 図 46 のように示される。組織培養によるクローン大量増殖技術は、従来の林木育種にあって、非常に多くの面積と費用、時間を必要としていたクローンの収集、集植の分野を完全に肩代わりするとともに、その増殖の効率を飛躍的に高めることができる。この図で、バイオテクノロジーによる育種については、シラカンバでは何の成果も得られていない。この分野に関連して、Bajaj (1985) は、樹木の育種期間短縮とバイオマス生産の増大のために必要な組織培養関係の研究として10項目をあげている。すなわち、1. マイクロプロパゲーション（組織培養による種苗の増殖） 2. 病害を持たない植物、諸害に対する抵抗性の植物の生産 3. 突然変異体の誘導とその選抜 4. やく培養による半数体および純系の作出 5. 胚培養による交雑範囲の拡大 6. 細胞融合による体細胞雑種の作出 7. 遺伝子の組み替え 8. 窒素固定能のある樹木の作出 9. 光合成能力の向上 10. 遺伝子変異の凍結保存 である。このうち、1のマイクロプロパゲーションについては、本研究においてその方法を確立することができた。また、3についてもカルス培養によってその手掛かりを得た。しかし、その他の分

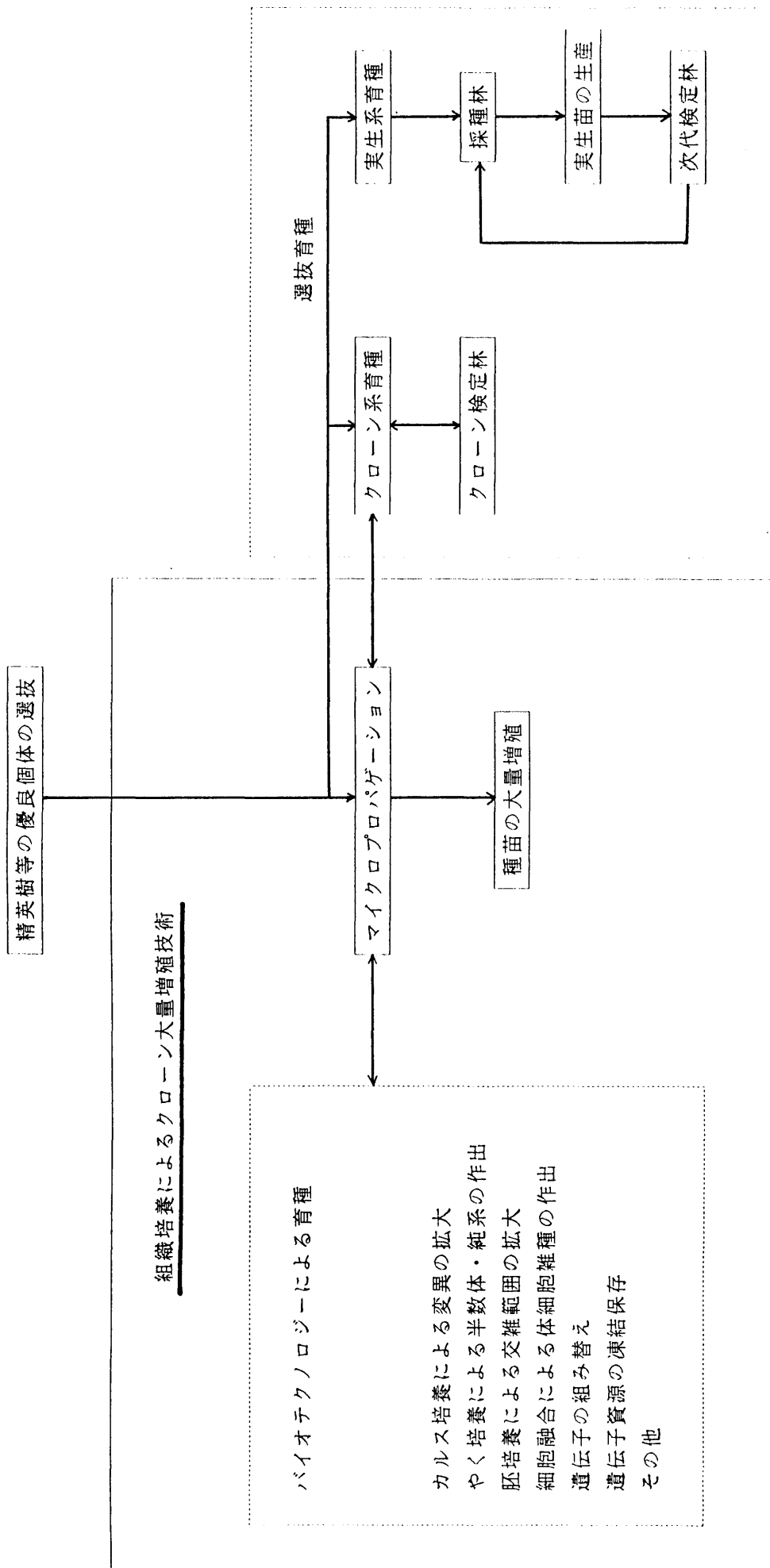


図-46 組織培養によるクローン大量増殖技術のシラカンバの育種への応用

野では多くの課題が山積しており、それらの多くは全く手がつけられていない状態にある。本研究がなされたことにより、ここに示された幅広いバイオテクノロジーの分野の研究やそれによるシラカンバの育種に対して、有効な接近手段が提供されたと言えよう。

摘要

本研究は、組織培養によるクローン増殖法をシラカンバの育種に応用することを目標として、培養系の確立、幼植物体の増殖、カルス培養、幼植物体の環境馴化の各項目について実験を行いそれぞれの方法を明らかにしたものである。まず、いろいろな齢のシラカンバから組織培養の手法を用いて試験管内に幼植物体を再生させる方法を確立した。ついで、試験管内に再生した幼植物体のいろいろな組織を外植体として用いることによって、試験管内でシラカンバの幼植物体を永続的にかつ大量に増殖させる方法を確立した。また、培養中の幼植物体の組織からカルスを誘導し増殖させ、そのカルスから再度幼植物体を分化させることに成功した。更に、これらの試験で増殖された幼植物体を野外の環境に馴化させ、シラカンバの苗木として育てることが可能であることを示した。以下に本研究で得られた成果の概要を示す。

1. 無菌的に播種して得られたメバエの幼根を切除して、BAP 0.8mg/l、FeEDTAを5.6、28、56mg/l含む3種類のIS培地にさしつけ、子葉の葉えきから2本のシュートを伸長させた。それらのシュートは切り取ってホルモンフリーのIS培地へさしつけると発根して幼植物体が再生した。

2. 1年生の実生苗から2年目にのびた枝から、えき芽をつけた小片

を採取し、BAP、NAA、IBAなどを含んだIS培地上で培養し、えき芽からシュートを伸長させるとともに、外植体の下部切り口から直接発根させて幼植物体を再生させた。別に、伸長したシュートを切り取って発根培地にさしつけることによって幼植物体を再生した。

3. 成木の1年生枝を用いて剥皮枝条の試験管内さし木法を試み、BAPを含んだMS1培地上で培養した剥皮された枝の小片から不定芽を誘導した。不定芽から伸長したシュートを切り取って発根培地にさしつけると発根して幼植物体を再生した。

4. 成木の葉柄をBAPを含み、FeEDTAを85mg/l含むIS培地にさしつけて培養したところ、苗条原基の塊が形成された。別の培地で苗条原基塊から伸長させたシュートを、発根培地に移し幼植物体を再生した。このとき、1外植体から100-200本の幼植物体が再生した。

5. 試験管内に再生した幼植物体のシュート先端部を切り取って、発根培地にさし木することによって発根させ、新たな幼植物体が増殖することがわかった。このとき、発根培地に添加するオーキシンとしてはNAA 0.02mg/l IBA 0.5mg/lの組合せが適当であった。

6. 幼植物体のシュートの試験管内さし木用の発根培地に添加するショ糖の影響を調べたところ、発根そのものにはショ糖は必要なく、また、ショ糖の添加量が多いと根の原基の形成が抑制された。しかし、発根した根やシュートの伸長にはショ糖の量が多い方が良い結

果が得られた。

7. 培養中の幼植物体の茎端部の小さな組織を、IS培地とMS1培地のそれぞれにBAPを0、0.4、0.8、1.2mg/l加えた8種類の培地で培養したところ、葉の展開とシュートの伸長がみられた。しかし、培地の適合性に問題があり、展開した葉は健全とはいえなかった。伸長したシュートを発根培地へ移したところ、わずかではあるが発根して幼植物体を再生した。

8. 幼植物体からえき芽をつけた茎軸を切り取って、7.と同じ4種類のIS培地で培養したところ、えき芽からシュートが伸長した。ここでも、ほとんどの培地はシュートの伸長に適しておらず、形成されたシュートは健全とはいえなかった。しかし、ホルモンフリーのIS培地では健全なシュートが形成され、また、外植体から直接発根して幼植物体を再生した。

9. 培養中の幼植物体の葉柄を切り取り、初代培養の時と同じBAPを0.8mg/l含んだFeEDTAの量の多いIS培地で培養したところ、基部切り口から苗条原基塊を形成した。苗条原基塊は別の培地上でシュートを伸ばし、発根培地に移すことによって幼植物体を再生した。ここでの、幼植物体の再生に要する期間は初代培養の時に比べ半減した。

10. 培養中の幼植物体の葉柄、茎軸組織をBAPを 0.8mg/l、GA₃を

0.5mg/l含みNAAを0、0.002、0.02、0.2mg/l含む4種類のIS培地上で培養し、苗条原基塊やカルスを分化させた。苗条原基はBAP

0.8mg/lを含むIS培地上に移すとシュートを伸長するとともに発根し幼植物体を再生した。

11. 幼植物体の茎軸や葉柄をBAPを0.8mg/l含みNAAを0、0.002、0.02、0.2mg/l含むIS培地上で培養しカルスを誘導、増殖させた。このとき、カルスの誘導増殖にはNAAの0.2mg/lの添加が最も有効であった。

12. 11.で形成されたカルス塊を分割して、10.で用いたのと同じIS培地上で培養したところ苗条原基を再分化した。苗条原基は別の培地上でシュートを伸長し、発根培地上で発根し幼植物体を再生した。

13. 試験管内で再生した幼植物体を、バーミキュライトを培養土に用いたポットに移植しビニール袋内に密閉し、徐々にその口を開くという方法で馴化を行った。移植後2週間でビニール袋から出しミスト室に移し、その後2週間で馴化の過程を終了した。

14. 以上の結果から、組織培養によるクローン大量増殖法がシラカンバの優良系統の選抜や系統保存、種苗の増殖に極めて有効であるとともに、カルス培養による遺伝的変異の拡大が利用可能であることを論じた。また、これらの技術がシラカンバのバイオテクノロジー研究やそれによる育種を進展させ得ることを論じた。

謝 辞

本研究の取りまとめに際して終始懇切なるご指導をいただき、本稿の校閲を賜った東京大学農学部教授濱谷稔夫博士、同助教授鈴木和夫博士、林業試験場造林部育種科長勝田柁博士に厚くお礼申し上げます。

本研究を行うにあたり終始ご指導いただくとともに本稿の校閲を賜った林業試験場造林部組織培養研究室長斎藤明博士、ご指導ご助言をいただいた同主任研究官佐藤亨博士に対し深く感謝する。

また、本研究の遂行に対し終始ご指導ご鞭撻を賜った、静岡県林業試験場場長井草五郎氏、同前場長鈴木正氏、同研究主幹縣富美夫氏、同研究主幹伊藤守夫博士に対し厚くお礼申し上げます。

さらに、実験に供した種子を提供していただいた山梨県林業技術センター試験研究部清藤城宏氏および実験やとりまとめに際しご協力いただいた静岡県林業試験場の職員の方々に深く感謝する。

引用文献

- Bajaj, Y.P.S. 1985. 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.), pp. 1-23, Springer Verlag, Berlin
- Bonga, J.M. 1982a. Tissue culture techniques. In "Tissue culture in forestry" (Eds. Bonga, J.M. and Durzan, D.J.), pp. 4-35, Martinus Nijhoff/Dr W. Junk Publishers, Dordrecht
- Bonga, J.M. 1982b. 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.), pp. 373-377, Martinus Nijhoff/Dr W. Junk Publishers, Dordrecht
- Chalupa, V. 1984. In vitro propagation of oak (Quercus robur L.) and linden (Tilia cordata Mill.). Biologia Plantarum (Praha), 26:374-377
- Chevere, A.M., Gill, S.S., Mouras, A. and Salesses, G. 1983. In vitro vegetative multiplication of chestnut. J.Hort.

Sci., 58:23-29

David, A. 1982. In vitro propagation of gymnosperms.

In "Tissue culture in forestry" (Eds. Bonga, J.M. and Durzan, D.J.), pp. 72-108, Martinus Nijhoff/Dr W. Junk Publishers, Dordrecht

Durzan, D.J. 1982. Cell and tissue culture in forest industry. In "Tissue culture in forestry" (Eds. Bonga, J.M. and Durzan, D.J.), pp. 36-71, Martinus Nijhoff/Dr W. Junk Publishers, Dordrecht

Gautheret, R. 1934. Culture du tissue cambial. C. R. Acad. Sci., 198:2195-2196

畑野健一 1982. カンバの優良系統の選定と生産力の評価. "生物資源の効率的利用技術の開発に関する研究 (バイオマス変換計画) 昭和56年度委託事業報告書" 5pp., 東京大学農学部附属北海道演習林

畑野健一 1983. カンバ類の多収穫技術. "農林水産省大型別枠研究バイオマス変換計画 昭和57年度委託事業報告書" 16pp., 東京大学農学部附属北海道演習林

畑野健一 1984. カンバ類の多収穫技術. "農林水産省大型別枠研究バイオマス変換計画 昭和58年度委託事業報告書" 35pp.,

東京大学農学部附属北海道演習林

畑野健一 1985. カンバ類の短伐期収穫による多収穫技術. “農林水

産省大型別枠研究バイオマス変換計画 昭和59年度委託事業

報告書”30pp., 東京大学農学部附属北海道演習林

本多静六 1911. 本多造林学本論ノ四 接木及び挿木造林法 p.850,

三浦書店, 東京

Huhtinen, O. and Yahyaoglu, Z. 1974. Das frühe Blühen von

aus kalluskulturen herangezogenen Pflänzchen bei der

Birke (Betula pendula Roth.). *Silvae Genet.*, 23:32-34

Huhtinen, O. 1978. Callus and plantlet regeneration from

anther culture of Betula pendula Roth. In “Fourth intl.

cong. plant tissue and cell culture” (Ed. Thorpe,

T.A.), p.169, Calgary

石原愛也 1979. 果樹その他木本植物の増殖. “新植物組織培養”

(竹内正幸、中島哲夫、古谷力 編集), pp. 229-247, 朝倉書店,

東京

井出雄二・斎藤明 1985. クヌギの組織培養による試験管内増殖の

試み. 96回日林論, 347-348

Libby, W.J. 1969. Some possibilities of the clones in forest

genetics research. In “Genetic lectures” (Ed. Bogart,

- R.), pp. 121-136, Oregon State Univ. Press
- Libby, W.J. 1983. The clonal option 32pp., Norwegian forest
research institute
- Lloyd, G. and McCown, B. 1981. Commercially feasible micro-
propagation of mountain laurel (*Kalmia latifolia*) by
use of shoot tip culture. Proc. Int. Plant Prop. Soc.,
30:421-427
- McCown, B. and Amos, R. 1979. Initial trials with
commercial micropropagation of birch selections. Inter.
Plant Prop. Soc., 29:387-393
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid
growth and bioassays with tobacco tissue cultures.
Physiol. Plantarum, 15:437-497
- 新関宏夫・島田多喜子 1985. 穀類. “クローン植物大量生産の実際
技術” (田中隆荘 監修), pp. 95-101, シーエムシー, 東京
- 小野一 1979. 染色体の変異. “新植物組織培養” (竹内正幸、中島哲
夫、古谷力 編集), pp. 80-88, 朝倉書店, 東京
- 斎藤明 1983. 組織培養による無性繁殖の一事例－剥皮枝条の試験
管内のサシキ－. 林木の育種 129:12-18
- 斎藤明 1984. 林木における組織培養－細胞融合による育種技術開

- 発の現状と問題点ー．“昭和59年度日本農学大会シンポジウム講演要旨 農業におけるバイオテクノロジー Part 2”，pp. 15-24，日本農学会
- 斎藤明 1985. 林木育種とバイオテクノロジー．農業および園芸 60:193-199
- 斎藤明 1986a. 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”（農林水産省林業試験場バイオテクノロジー 研究会編）pp.20-29，林業科学技術振興所，東京
- 斎藤明 1986b. 細胞操作による林木の育種．“林業におけるバイオテクノロジー”（農林水産省林業試験場バイオテクノロジー 研究会編）pp. 30-38，林業科学技術振興所，東京
- San-Jose, M.C., Vieitez, A.M. and Vieitez, E. 1984. *In vitro* regeneration from adventitious buds of chestnut. J.Hort.Sci., 59:359-365
- 佐々木恵彦 1984. 新しい資源の開発．“森林資源の新しい利用 上巻 資源編”（蜂谷欣二 他），pp. 57-103，林業科学技術振興所，東京
- Schmidt, A. 1924. Ueber die Chlorophyllbild im Koniferenembryo. Botan. Arch., 5:260-282

- 高山真策 1984. 液体振とう培養による種苗生産の効率化. 植物組織培養 1:8-13
- 田中隆荘 1983. 有用1年生植物のクローン化. “種苗産業と育種新技術”, pp. 171-197, シーエムシー, 東京
- Tanaka, R. and Ikeda, H. 1983. Perennial maintenance of annual *Haplopappus gracilis* ($2n=4$) by shoot tip cloning. *Jpn. J. Gent.*, 58:65-70
- 田中隆荘・谷口研二 1985. 苗条原基のクローン増殖への応用. “昭和58年度技術調査報告書 急速大量増殖及びクローン増殖における組織培養技術の応用－種苗及び育種・採種母本の増殖分野での展開－”, pp. 36-47, 日本種苗協会, 東京
- 谷口研二 1985. クローン増殖技術と遺伝的安定性. “クローン植物大量生産の実際技術” (田中隆荘 監修), pp. 4-12, シーエムシー, 東京
- Tukey, H.B. 1933. Artificial culture of sweet cherry embryos. *J. Hered.*, 24:1-12
- Vieitez, A.M., Ballester, A., Vieitez, M.L. and Vieitez, E. 1983. In vitro plantlet regeneration of mature chestnut. *J. Hort. Sci.*, 58:457-463
- Vieitez, A.M., San-Jose, M.C. and Vieitez E. 1985. In vitro

plantlet regeneration from juvenile and mature Quercus
robur L. J.Hort.Sci., 60:99-106

脇塚巧 1986. シコクビエの “Giant dome culture” について.

植物組織培養, 3:42-43

渡辺定元 1986. カンバ類の集約的超短伐期栽培法の確立. “農林水

産省大型別枠研究バイオマス変換計画 昭和60年度委託事業

報告書”30pp., 東京大学農学部附属北海道演習林

Winton, L.L. 1968. Plantlets from aspen tissue cultures.

Science, 160:1234-1235

Winton, L.L. and Huhtinen, O. 1976. Tissue culture of trees.

In “Modern methods in forest genetics” (Ed. Miksche,

J.P.), pp. 243-264, Springer Verlag, Berlin

Wolter, K. and Skoog, F. 1966. Nutritional requirements of

Fraxinus callus cultures. Am.J.Bot., 53:263-269

Wolter, K. 1968. Root and shoot initiation in aspen callus

cultures. Nature, 219:509-510

Zobel, B., Campinhos, E. and Ikemori, Y. 1983. Selecting and

breeding for desirable wood. Tappi Journal, 66:70-74