

## ケヤキの葉外植体からの不定芽形成

富田正徳・近藤禎二

関東林木育種場

〒310 茨城県水戸市笠原町 978

(1990年8月3日受付)

(1990年9月7日受理)

ケヤキ (*Zelkova serrata* (Thunb.) Makino) は日本の代表的な広葉樹であり、建築材、家具材としての利用価値が非常に高い。なかでも材色の赤いアカケヤキは従来から高値で取り引きされており、現在その増殖および保存が期待されている。しかし、ケヤキはさし木などによる栄養繁殖が困難で<sup>1)</sup>、種子の豊凶差も激しいため、組織培養技術を利用した優良木の大量増殖法や、育種法の開発が望まれている。既に、成木の新梢や丸太萌芽枝由来の腋芽<sup>2)3)</sup>、あるいは冬芽<sup>4)</sup>などを用いた培養の報告はみられるものの、組織培養を用いた育種の前提条件となる、体細胞組織からの植物体形成の報告はない<sup>5)</sup>。そこで、*in vitro* 培養シュートの葉切片を供試材料として実験を行った。

**【材料及び方法】** 関東林木育種場構内のケヤキ (約10年生、樹高4m) から、1990年5月初旬に当年生枝を採取し、MS培地<sup>6)</sup>の構成成分を半分にし、ショ糖30g/l、寒天8g/l、6-benzylaminopurine (BAP)  $2.5 \times 10^{-6}$  Mを加え、pH 5.7に調整した培地で1ヶ月間腋芽培養を行い、伸長したシュートの展開葉上位1~3葉までを切り取り、実験に用いた。この葉を、葉柄を含まないように5mm角に調整した後、葉の表面を上にして培地20mlを分注した深さ20mm、径90mmのシャーレに1シャーレ当たり6外植体(1区4シャーレ、計24外植体)植え込んだ。

培地は、MS培地にショ糖30g/l、寒天8g/lを加えたものを基本組成とし、これにBAPあるいはフェニル尿素系化合物 N-(2-chloro-4-pyridyl)-N'-phenylurea (CPPU) の濃度を  $10^{-6}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-4}$  Mと変えてそれぞれ単独、あるいは2,4-D  $10^{-6}$ 、 $10^{-5}$  Mと組合せて添加したものをを用いた (pH 5.7)。

培養は16時間日長、 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 、3000 luxの人工照明室内で8週間行った。なお、培養4週間目に同じ組成の新鮮な培地に植え継いだ。

**【結果及び考察】** いずれの区においても、培養2週間目頃からすべての外植体で葉の切断面に沿って黄緑色のカルスの発生が認められた。BAP添加区では、実験期間内にはカルスは発生したが、器官分化は認められなかった (Data省略)。これに対し、CPPU添加区では、

2,4-Dと組合せて添加した区では、カルスしか生じなかったものの、CPPU単独添加区では培養3週間目に不定芽の形成が認められた (Fig. 1)。Table 1にCPPU添加区における不定芽の形成率と平均形成数およびカルスの生育を示した。CPPU  $10^{-6}$  M単独添加区は、継代培養を行った培養4週間目には、不定芽の形成率(25%)、平均形成数(5:0)ともに不定芽を形成した3区中最も高かったものの、6週間目を過ぎると外植体が褐変し始め、8週間目の時点では全て枯死していた。これに対し、CPPU  $10^{-5}$  M、 $10^{-4}$  M添加区では、4週間目の調査では  $10^{-6}$  M添加区よりも不定芽の形成率、平均形成数ともに劣っていたものの、不定芽の増殖がその後

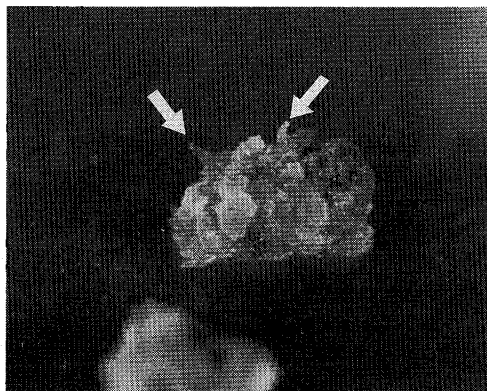


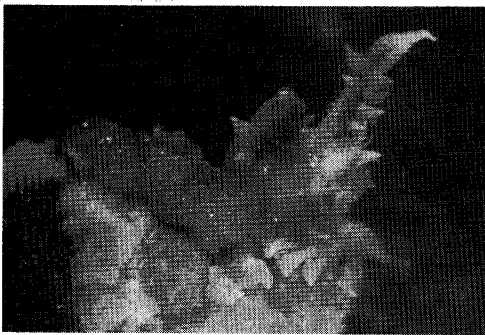
Fig. 1 Adventitious buds growing on leaf explant of *Zelkova serrata* culturing on MS medium containing  $10^{-5}$  M CPPU.

**Table 1.** Effect of CPPU and 2, 4-D on formation of adventitious buds and calli from *Zelkova serrata* leaf explants.

CPPU (M)	2, 4-D (M)	Bud formation rate (%)		Mean No. of buds per explants		Callus* (8 weeks)
		4 weeks	8 weeks	4 weeks	8 weeks	
10 <sup>-6</sup>	0	25.0	**	5.0	**	(+)
10 <sup>-5</sup>	0	8.3	12.5	3.0	7.7	++
10 <sup>-4</sup>	0	4.2	12.5	5.0	5.7	++
10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-6</sup>	0	0	0	0	++
10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	0	0	0	0	+++
10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-6</sup>	0	0	0	0	+++
10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-5</sup>	0	0	0	0	++
10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-5</sup>	0	0	0	0	++
10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	0	0	0	0	++

\* Callus was rated on a scale of poor (+) to best (+++) growth.

\*\* All the cultures died.



**Fig. 2** Germination occurred after 8 weeks culturing on MS medium containing 10<sup>-4</sup> M CPPU.

も継続し、10<sup>-4</sup> M 添加区では培養 8 週間目には一部の不定芽が生長した (Fig. 2)。Fig. 2 に示した不定芽を、徒手切片を作成して観察したところ、この不定芽はカキ<sup>11)</sup>のように肥厚した葉組織とカルスとの境界付近より発生していた。このほかの、生長しなかった不定芽をもつ外植体を、同組成の新鮮な培地に継代培養したが、不定芽の増殖・生長は認められず、徐々に褐変し、10 週間目までにすべて枯死した。

フェニル尿素系化合物 CPPU (4PU) は、高サイトカイニン活性を有していることが知られており<sup>7)</sup>、単でタバコ<sup>8)</sup>やキウイフルーツ<sup>9)</sup>のカルスからシュートを形成する。本実験の結果より、ケヤキにおいても CPPU を用いることで葉外植体から不定芽を形成させることが可能であることが明らかとなった。リングなど

の葉外植体からの不定芽形成率の向上には、高濃度のサイトカイニンと低濃度のオーキシンの組合せが有効と報告されているが<sup>10)</sup>、本実験のケヤキの場合は、2, 4-D の添加は不定芽の形成を抑制した。添加するオーキシンの種類と濃度については、さらに検討する必要がある。今後、培養条件を検討して不定芽形成率の向上、継代・増殖条件の確立を図るとともに、組織の観察を行い、不定芽の発生の過程についても明らかにしてゆく予定である。

#### 文 献

- 1) 森下義郎, 大山浪雄, 1973. 造園木の手引/さし木の理論と実際 (訂正 2 刷), p. 315, 地球出版, 東京.
- 2) 近藤禎二, 鈴木賢一, 九島宏道, 1987. 39 回日林関東支論, p. 101-102.
- 3) 引田裕之, 1989. 41 回日林関東支論, p. 63-64.
- 4) 吉川 章, 1988. 39 回日林関西支論, p. 221-224.
- 5) 大山勝之, 1990. BRAIN テクノニュース, 18 : 23-30.
- 6) Murashige, T., F. Skoog, 1962. *Physiol. Plant.*, 15 : 437-497.
- 7) Fellman, C. D., P. E. Read, and M. A. Hosier, 1987. *Hort Science* 22 : 1197-1200.
- 8) Isogai, Y., K. Shudo, and T. Okamoto, 1976. *Plant Cell Physiol.* 17 : 591-600.
- 9) 志村 勲, 樋口幸男, 石川駿二, 1990. 園学雑, 58 : 841-847.
- 10) 増田哲男, 吉田義雄, 別所英男, 1987. 果樹試報 C, 14 : 1-10.
- 11) 福井博一, 野崎国芳, 中村三夫, 1989. 園学雑 58 別 2, p. 58-59.

## Summary

Adventitious Bud Formation from Leaf Explant of *zelkova serrata* Makino.

Masanori TOMITA and Teiji KONDO

Kanto Forest Tree Breeding Institute, 978, Kasahara, Mito, Ibaraki, 310 Japan

Organ differentiation from leaf explants of *Zelkova serrata* Makino was investigated. Leaf explants were cut from axillary shoot cultured *in vitro*.

Adventitious buds were formed on MS medium containing  $10^{-6}$ - $10^{-4}$  M CPPU (4PU). BAP was ineffective, and 2, 4-D inhibited the organ differentiation. After 8 weeks of culture, germination occurred on the medium containing  $10^{-4}$  M CPPU.