

ケヤキ葉外植体からの植物体再生

富田正徳

関東林木育種場

(〒310 茨城県水戸市笠原町 978)

(1991年7月3日受付)

(1991年8月9日受理)

木本植物において葉外植体を材料として植物体を再生した例はいまだ少ない^{1,2,3)}。ケヤキ (*Zelkova serrata* (Thunb.) Makino) の組織培養による育種法の開発のため、原口⁴⁾はケヤキ取り木苗新梢の節間組織を培養し、不定芽の形成を認めている。著者らも新梢由来の *in vitro* 培養シュートの葉切片を供試材料として実験を行い、N-(2-chloro-4-pyridyl)-N'-phenylurea (CPPU) を加えた培地で不定芽の形成を認めたが⁵⁾、いずれも植物体の再生には至っていない。今回、新たにケヤキの丸太を水挿しして得た萌芽枝の展開葉を供試して実験をおこなったところ、再生植物体を得ることができたので報告する。

【材料及び方法】 関東林木育種場構内の一株の二本立ちのケヤキ (22年生, 樹高12m) を1990年9月初旬および11月初旬の2回に分けて一本ずつ地上部50cmより伐倒して丸太を採取した。丸太は25°C恒温室内で水挿しをおこない、発生した萌芽枝の展開葉を供試材料とした。この葉を、70%エタノールで2分間、有効塩素0.5%の次亜塩素酸ナトリウム水溶液で10分間殺菌、

滅菌水で3回水洗の後、5mm角に調製し、葉の裏面を上にして培地40mlを分注した200ml容ガラス培養ビンに一ビン当り5外植体(1区7本, 計35外植体)植え込んだ。

実験1. 無機多量要素として前報⁵⁾で用いた Mura-shige & Skoog (MS)⁶⁾培地に加え、そのKNO₃及びNH₄NO₃の濃度を1/2に希釈した培地(1/2NMS)、引

Table 1. Effect of basal medium on formation of adventitious buds from *Zelkova serrata* leaf explant.

Medium	Developmental index*		Bud formation rate (%) [*] (10 weeks)
	5 weeks	10 weeks	
MS	1.3	1.1 ^{b**}	17.1
1/2NMS	1.5	2.4 ^a	45.7
DL	1.2	1.1 ^b	20.0
WPM	1.3	1.1 ^b	17.1

Each medium supplemented 10⁻⁵M CPPU.

* Developmental index was obtained as a weighted average of the grades given in the text.

** Mean separation within column by Duncan's multiple range test at 5% level.

^{*} (No. of explants which formed adventitious buds/Total no. of explants.) × 100

田⁷⁾がケヤキの腋芽培養で用いた Durzan & Lopushanski (DL)⁸⁾培地, および須田ら²⁾がカルミア葉片の培養で用いた Lloyd & McCown (WPM)⁹⁾培地の4種類の無機塩組成の培地を用い, 不定芽形成に及ぼす影響を調査した. 添加する CPPU 濃度は, 前報⁵⁾で新梢由来シュートの葉からの不定芽形成率が最も高かった 10^{-5} M とした.

実験2. 実験1の結果に基づき, 不定芽形成率の向上およびシュートの伸長を図るため, 培地に添加する CPPU 濃度, およびオーキシンの種類と濃度を変え, これらが不定芽形成に及ぼす影響を調査した. 1/2NMS 培地にシヨ糖 30 g l^{-1} を加えた培地を基本組成とし, CPPU を 10^{-5} , 3.16×10^{-5} , 10^{-4} , 3.16×10^{-4} M の濃度で単独, あるいは IBA ないしは NAA 10^{-6} , 10^{-5} M と組み合わせて添加した培地で培養をおこなった (Table 2).

いずれの培地も MS の微量元素と鉄, および寒天 8 g l^{-1} を添加し, オートクレーブ前に pH を 5.7 に調整した. 培養はすべて 16 時間日長, $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 3,000 lux の人工照明室内で 10 週間行った. なお, 培養 5 週間目に同じ組成の培地に植え継いだ.

実験結果は, 不定芽の形成程度について, 1: カルス上に赤褐色の斑点が認められる, 2: 斑点の一部が肥大する, 3: 斑点が退色して不定芽が認められる, 4: 不定芽が伸長する (15 mm 未満), 5: 不定芽が 15 mm 以上に伸長, の評点を与え, その平均点で生育評価をおこなった. なお, 調査時点でカルスのみ形成していたものや, 形成した不定芽が褐変したり, 再びカルス化したものは評点 0 とした.

15 mm 以上に伸長したシュートは培養 10 週間目に切り取り, 1/2 濃度の DL 培地に寒天 6 g l^{-1} および 3-indolebutyric acid (IBA) を 5×10^{-6} M 添加した培地に移植し, 発根を試みた. 発根した植物体は, オートクレーブで加圧滅菌したパーミキュライトと鹿沼土の等量混合土を入れたポットに移植し, 灌水の後ビニール袋で覆った. 順化は寒冷紗で 50% 遮光した室内でビニール袋に徐々に穴をあけておこなった.

【結果および考察】 実験1の結果を Table 1 に示した.

供試した全ての区で培養 2 週間目頃から葉の切断面に沿って黄緑色のカルスの発生が認められ, さらに 2~3 週間目から赤褐色の斑点がカルス上に生じた. これら赤褐色の斑点の一部が培養 4~5 週間目に肥大・退色して緑色の不定芽を形成した (Fig. 1-a). 傳ら¹⁰⁾は, シラカンパの節間組織からの不定芽形成における詳細な組織の観察から, このような斑点は細胞分裂が旺盛な組織で

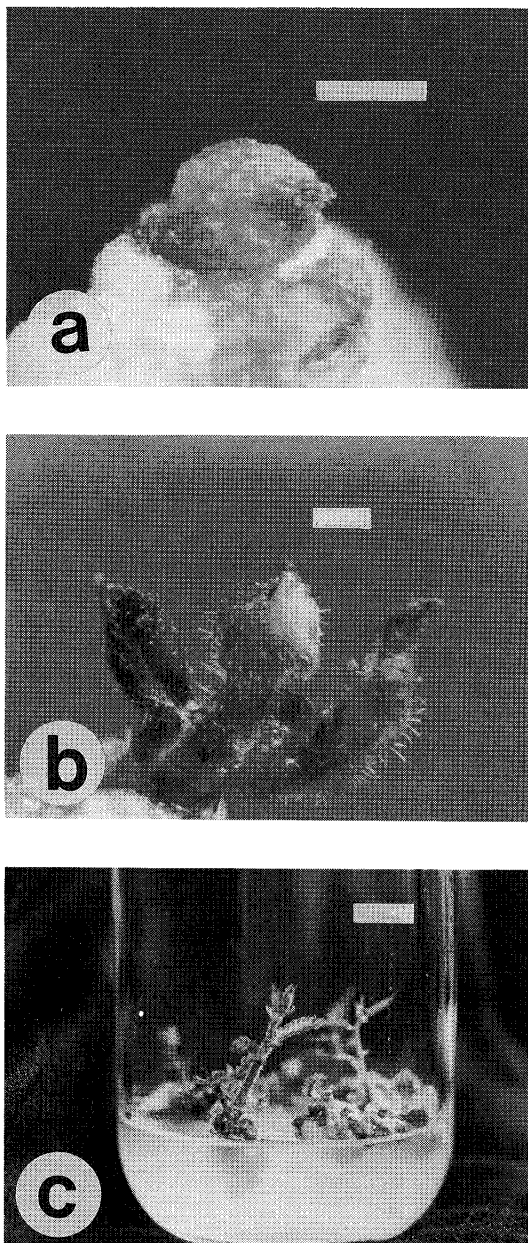


Fig. 1 Adventitious bud formation on leaf explants of *Zelkova serrata*

- (a). Bud formation from a leaf explant 3 weeks in culture. Bar=2 mm
- (b). Sprouting of bud 8 weeks after the beginning of culture. Bar=2 mm
- (c). Shoot formation from a leaf explant after 10 weeks in culture. Bar=10 mm

あり, 不定芽が生じやすいと報告している. 5 週間目では, 無機塩組成の不定芽形成に及ぼす影響は明らかではなかった. しかし, 1 回目の継代の後, 1/2 NMS 培地を除く 3 種類の培地上では, 外植体の多くが斑点の肥

Table 2. Effect of CPPU and auxin on formation of adventitious buds from *Zelkova serrata* leaf explant.

CPPU (M)	IBA (M)	NAA (M)	Developmental index*	Bud formation rate(%) [#]
10 ⁻⁵	0	0	1.8 ^{abc**}	40.0
10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	0	1.3 ^{bc}	28.6
10 ⁻⁵	10 ⁻⁵	0	0.6 ^c	0
10 ⁻⁵	0	10 ⁻⁶	0.8 ^{bc}	0
10 ⁻⁵	0	10 ⁻⁵	0.4 ^c	0
3.16×10 ⁻⁵	0	0	2.1 ^{ab}	45.7
3.16×10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	0	1.6 ^{abc}	31.4
3.16×10 ⁻⁵	10 ⁻⁵	0	1.2 ^{bc}	11.4
3.16×10 ⁻⁵	0	10 ⁻⁶	1.5 ^{bc}	28.6
3.16×10 ⁻⁵	0	10 ⁻⁵	0.9 ^c	0
10 ⁻⁴	0	0	3.3 ^a	57.1
10 ⁻⁴	10 ⁻⁶	0	2.2 ^{ab}	51.4
10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	0	1.5 ^{bc}	37.1
10 ⁻⁴	0	10 ⁻⁶	1.8 ^{abc}	40.0
10 ⁻⁴	0	10 ⁻⁵	1.2 ^{bc}	14.3

Each medium (1/2NMS) supplemented 30 g/l sucrose. Cultured 10 weeks.

* Developmental index was obtained as a weighted average of the grades given in the text.

** Mean separation within column by Duncan's multiple range test at 5% level.

(No. of explants which formed adventitious buds/Total no. of explants.)×100

大から不定芽形成の段階（評点2~3）で成長を停止してしまい、前報⁹⁾と同様、10週間目にはカルスおよび不定芽が徐々に褐変するか、または不定芽がカルス化し、評点が下がった。これに対し、1/2 NMS 培地では培養5週間目以降も不定芽の形成が続き、不定芽の一部はさらに肥大・伸長し、8~10週間目にはシュートを形成した（評点4~5, Fig. 1-b）。このように供試した4種類の無機塩組成を比較すると、1/2 NMS 培地が不定芽形成に最も適していると考えられる。しかし10週間目に外植体を同組成の培地でさらに継代培養をおこなったところ、不定芽の増殖・伸長は停止し、外植体は徐々に褐変・枯死した。

実験2の結果を Table 2 に示した。

CPPU 3.16×10⁻⁴ M 添加区では全ての外植体が5週間目までに褐変枯死した。そこで Table 2 には CPPU 濃度 10⁻⁵~10⁻⁴ M の範囲の結果についてのみ示した。この CPPU 濃度の範囲では、培地に加える CPPU 濃度の上昇は不定芽形成を促進した。CPPU 単独添加区の

評点はオーキシン添加区よりも高く、CPPU 10⁻⁴ M 単独添加区では供試した35外植体のうち9個がシュート伸長段階（評点5）に達して複数のシュートを伸長し（Fig. 1-c）、その他の多くの外植体も不定芽形成段階以上（評点3~4）に達した。

培地に添加したオーキシン（IBA, NAA）は、供試濃度範囲内では CPPU の効果を打ち消した。すなわちこれらオーキシンを添加した区ではいずれもカルスの生育が旺盛で、ほとんどの不定芽が不定芽形成段階（評点3）で成長が停止し、褐変するかカルス化した。さらに、10週間目の調査時点における評点は、添加するオーキシン濃度の上昇に従って下がる傾向があった。またオーキシン存在下では、伸長したシュートはすべて水浸状を呈した。葉外植体からの植物体再生を図る場合、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で不定芽形成率が高まったとの報告もあるが^{2,10)}、シダレカンバの葉片培養において、高濃度のゼアチン添加は不定芽形成を促進したが、培地への NAA 添加は不定芽形成を

Table 3. Root formation of shoots obtained from *Zelkova serrata* leaf explant culture.

Culture condition of shoot origin			Root formation*
CPPU (M)	IBA (M)	NAA (M)	
10^{-5}	0	0	0/5
10^{-5}	10^{-6}	0	0/4
10^{-5}	10^{-5}	0	—
10^{-5}	0	10^{-6}	—
10^{-5}	0	10^{-5}	—
3.16×10^{-5}	0	0	2/8
3.16×10^{-5}	10^{-5}	0	0/6
3.16×10^{-5}	10^{-5}	0	—
3.16×10^{-5}	0	10^{-6}	0/2
3.16×10^{-5}	0	10^{-5}	—
10^{-4}	0	0	6/14
10^{-4}	10^{-6}	0	0/6
10^{-4}	10^{-5}	0	0/2
10^{-4}	0	10^{-6}	0/7
10^{-4}	0	10^{-5}	0/3

* Number of shoots which formed roots/Number of shoots examined.

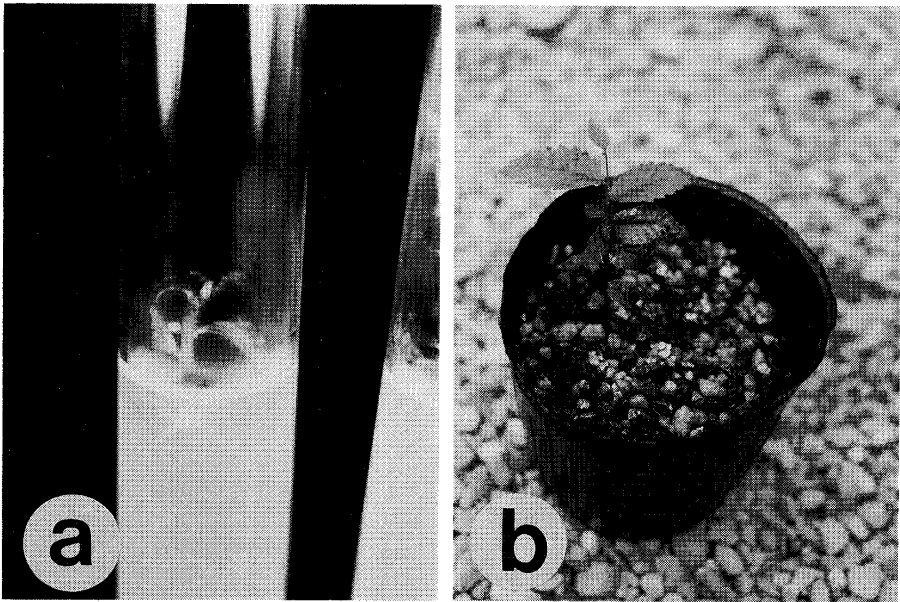


Fig. 2 Plantlet regeneration and acclimatization of *Zelkova serrata*.

- (a). Rooting of the shoot after 4 weeks of culture on rooting medium. Diameter of the test tube is 18 mm.
- (b). An established plant (6 weeks after acclimatization).

抑制したとの報告もある¹¹⁾。ケヤキもシダレカンバと同様、高濃度のサイトカイニン (CPPU) 単独添加が葉外植体からの不定芽形成に有効であった。前報で供試した

新梢由来 *in vitro* シュートの葉⁵⁾では、2,4-Dの添加は不定芽形成を抑制したことに加え、今回供試した萌芽枝葉においても NAA や IBA の添加は CPPU の効果を抑制

した。このことから、オーキシンはCPPUによるケヤキの葉からの不定芽形成を抑制すると考えられる。

培養10週間目に15mm以上に伸長したシュートをカルスから切り取り、発根培地に移植した。移植4週間後の結果をTable 3に示した。オーキシ添加区で形成された水浸状のシュートは全て褐変枯死したが、CPPU単独 (3.16×10^{-5} , 10^{-4} M) 添加区で伸長したシュートからは発根個体を得ることができた (Fig. 2-a)。ケヤキは順化方法が確立されていないが¹²⁾、本実験では発根した植物体のうち3個体を順化することができた (Fig. 2-b)。

以上の結果から、ケヤキ葉外植体からの不定芽形成とシュートの伸長には、1/2 NMS培地に 10^{-4} MのCPPU添加が有効であることがわかった。また植物体の再生と順化にも成功した。体細胞変異の利用等の細胞工学的育種をケヤキに応用するため、さらに培養条件の検討をおこなう予定である。

関東林木育種場育種第二研究室長近藤禎二博士には本論文御校閲の労をおとりいただいた。また供試したN-(2-chloro-4-pyridyl)-N'-phenylureaは協和発酵工業

株式会社の御好意により提供していただいたものである。ここに厚く感謝の意を表します。

文 献

- 1) 山口 聡, 1986. 農業及び園芸, 61: 599-604, 700-704.
- 2) 須田廣勝, 櫻本末男, 中島阜介, 1989. 植物組織培養, 6: 68-72.
- 3) Song, S. L., K. Suda, K. Ishii, A. Saito., and K. Ohba, 1991. J. Jpn. For. Soc., 73: 60-63.
- 4) 原口雅人, 1990 (a). 42 回日林関東支部講演要旨集, p. 15.
- 5) 富田正徳, 近藤禎二, 1991. 植物組織培養, 8: 28-30.
- 6) Murashige, T., F. Skoog, 1962. Physiol. Plant., 15: 473-497.
- 7) 引田裕之, 1989. 41 回日林関東支論, p. 63-64.
- 8) Durzan, D. J., S. M. Lopushanski, 1975. Can. J. For. Res., 5: 273-277.
- 9) Lloyd, G., B. McCown, 1980. Proc. Intl. Plant Prop. Soc., 30: 421-427.
- 10) 傳 禄敏, 井出雄二, 宝月岱三, 鈴木和夫, 1991. 102 回日林講演要旨集, p. 93.
- 11) Valobra C. P., D. J. James, 1990. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 21: 51-54.
- 12) 原口雅人, 1990 (b). 42 回日林関東支部講演要旨集, p. 15.

Summary

Plantlet Regeneration from Leaf Explant of *Zelkova serrata* Makino

Masanori TOMITA

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

Leaves taken from log sprouts of *Zelkova serrata* were cultured on MS medium containing half strength nitrogenous compounds.

CPPU (10^{-5} ~ 10^{-4} M) induced adventitious buds, but the effect of CPPU was inhibited by NAA or IBA.

Some shoots were rooted on half strength Durzan and Lopushanski medium containing 5×10^{-6} M IBA. Acclimatization of plantlets was successful.