

ケヤキ培養苗の発根および順化の諸条件

富田正徳

林木育種センター

(〒310 茨城県水戸市笠原町 978)

(1991年8月30日受付)

(1991年10月11日受理)

組織培養技術を林木の遺伝資源保存や種苗の大量増殖のために利用する場合、育成した植物体を外部環境へ効率よく順化する方法を開発する必要がある。日本の代表的な広葉樹であるケヤキ (*Zelkova serrata* (Thunb.) Makino) についても、組織培養による優良木の保存や大量繁殖法の検討がなされ、既に幾つかの報告例がある^{1,2,3)}が、順化方法が確立されていない³⁾。そこで、ケヤキ成木の水挿し丸太の萌芽枝の腋芽から伸長させたシュートを材料として、発根と順化の最適条件について検討した。

【材料及び方法】 関東林木育種場 (現在: 林木育種センター) 構内の22年生、樹高約10mのケヤキ1株を、1990年9月初旬および11月初旬の2回に分けて伐倒し、40~60cm長の丸太を採取した。丸太は $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 、1,000 luxの室内で水挿しをおこない、発生した萌芽枝の腋芽を順次供試材料とした。材料は有効塩素1%の次亜塩素酸ナトリウム溶液で10分間殺菌の後、滅菌水で3回洗浄し、培地に植え込んだ。

実験1を除き、DURZAN and LOPSHANSKI⁴⁾培地の多量無機塩組成にMS⁵⁾の微量元素、ショ糖 20 g l^{-1} 、寒天 10 g l^{-1} を加え、オートクレーブ前にpH 5.7に調整した培地(DL)を基本培地として用いた。シュートの伸長にはDLにzeatin $1 \mu\text{M}$ を添加した培地を用い、4週間の培養後、伸長したシュートの先端部(25mm, 2~3節を含む)を発根培地に移植した。発根培地の基本組成は1/2 DLとし、寒天、パーミキュライト、パーミキュライトと鹿沼土の等量混合用土(混合用土)のいずれかを培地支持体として用いた。

培養には $18 \times 150 \text{ mm}$ の試験管を用いた。寒天培地は寒天を培地に加えて加熱溶解後、試験管当たり 10 ml の培地を分注した。パーミキュライトおよび混合用土は、ふるいにかけて2~5mmに粒子を揃え、1試験管当たり

10 ml (パーミキュライトで約 2.1 g 、混合用土で約 3.2 g に相当)を加えた後、pHを調整した液体培地を 8 ml 分注した。培養はすべて16時間日長、 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 、 $3,000 \text{ lux}$ の人工照明室内でおこなった。

発根の頻度を調査の後、発根した植物体はすべてパーミキュライトと鹿沼土を等量混合した用土を入れたポットに定植し、灌水の後ビニール袋で被い、2重にした寒冷紗で遮光した室内($3,600 \sim 4,500 \text{ lux}$)に置いた。順化は、1週目よりビニール袋に徐々に穴を空けておこない、2週目より寒冷紗を一重とし($7,000 \sim 9,500 \text{ lux}$)、4週後に袋と寒冷紗を完全に取り去った。この時生存していた個体を順化終了(活着)個体とみなし、順化後の活着率を求めた。

実験1. シュートの伸長条件が発根に及ぼす影響を調べた。腋芽からのシュートの伸長培地として、DL、または多量無機塩組成として窒素成分(NH_4NO_3 および KNO_3)を半分にしたMS(1/2 NMS)ないしはLLOYD and McCOWN⁶⁾(WPM)を用いたものに、それぞれBAPまたはzeatin $1 \mu\text{M}$ を加えた計6区を設定した。発根培地には、サイトカイニンを除いた伸長培地の成分を1/2に希釈し、IBA $5 \mu\text{M}$ を加えた培地(1/2 DL, 1/2 (1/2 NMS), 1/2 WPM)を用いた(**Table 1.**)。1区当りの供試数は15とした。発根の調査は培養6週目におこなった。

実験2. IBAによる発根処理の方法と培地支持体が発根に及ぼす影響を調査した。発根処理には、IBA添加(IBA $5 \mu\text{M}$ を培地に添加)とIBA浸漬(シュート基部5mmをIBA $200 \mu\text{M}$ 溶液に2時間浸漬)の2区を設け、それぞれに培地支持体として寒天、パーミキュライト、混合用土の3種を用いた計6区で発根を比較した。1区当り供試数は30とした。

実験3. IBA浸漬処理法の改善を試みた。混合用土を

Table 1. Effect of nutrient conditions on root formation and acclimatization.

Initial culture medium	Rooting medium	Root formation rate(%)	Proportion of surviving plantlets*
WPM+BAP 1 μ M	1/2 WPM	13	0/2
” ”	1/2 (1/2 NMS)	7	0/1
” ”	1/2 DL	27	1/4
” zeatin 1 μ M	1/2 WPM	27	1/4
” ”	1/2 (1/2NMS)	20	1/3
” ”	1/2 DL	40	1/6
1/2 NMS+BAP 1 μ M	1/2 WPM	13	0/2
” ”	1/2 (1/2 NMS)	0	—
” ”	1/2 DL	13	0/2
” zeatin 1 μ M	1/2 WPM	13	0/2
” ”	1/2 (1/2 NMS)	7	0/1
” ”	1/2 DL	33	1/5
DL+BAP 1 μ M	1/2 WPM	40	1/6
” ”	1/2 (1/2 NMS)	20	0/3
” ”	1/2 DL	47	2/7
” zeatin 1 μ M	1/2 WPM	47	1/7
” ”	1/2 (1/2 NMS)	40	1/6
” ”	1/2 DL	80	2/12

Fifteen shoots were used in each treatment.

* No. of surviving plantlets at completion of the examination/No. of plantlets examined for acclimatiation.

培地支持体として用い、IBA濃度(0, 200, 600, 1, 800 μ M)が発根に及ぼす影響を調査した。1区当り供試数とIBA浸漬時間は実験2と同様とした。

実験4. 発根処理のIBA濃度を200 μ Mとし、処理時間と培養期間を変えて、発根および順化に及ぼす影響を調査した。培地支持体には実験3と同様混合用土を用い、供試数は1区当り80とし、1区1回当り調査数は20とした。

【結果及び考察】 実験1の結果をTable 1.に示した。供試濃度では、zeatin添加区でBAP添加区よりシュートの伸長がやや優る傾向があったものの、いずれのサイトカイニンを添加した区でもシュートは外見上健全に伸長し、処理区間にシュート伸長について有意差は認められなかった(Data省略)。しかし、シュート伸長培地の無機塩組成は発根率に影響した。DL培地で伸長したシュートの発根率が高く、ついでWPM, 1/2 NMSの順で発根率は低下する傾向があった。また、zeatin添加区で伸長したシュートはBAP添加区で伸長したシュートよりも発根率が高くなる傾向があった。発根したシュートの基部は肥大し、緑色ないし白色の柔弱なカルスを生じ、根はすべてこのカルス表面から生じていた。

引田²⁾は、ケヤキの枝を水挿して得た萌芽枝の腋芽を培養し、BAP 0.2 mg/l⁻¹ (0.89 μ M)を添加したDL培地で培養したシュートをIBA 0.3 mg/l⁻¹ (1.99 μ M)

を添加した1/2 WPM培地に移植し、67%の発根率を得ている。本実験においても、引田と類似の条件下で比較的高い発根率を得たが、発根率が最も高かったのはzeatin 1 μ Mを添加したDL培地で伸長したシュートを1/2 DL培地 (IBA 5 μ M添加)に移植した場合だった(発根率80%)。よって、以下の実験ではすべてzeatin 1 μ Mを添加したDL培地で伸長したシュートを用いた。また発根培地の基本組成は1/2に希釈したDLとした。

原口³⁾は、ケヤキの新梢腋芽由来の植物体について順化段階まで検討したが、順化した植物体はすべて枯死したと報告している。実験1で得た発根個体をポットに移植し、順化後の活着率を調査したところ、培養前歴に依らず活着は非常に悪かった(Table 1.)。調査終了時に植物体を掘り上げたところ、枯死したものは全てシュート基部のカルス部分が黒変したり、菌類などの汚染を受け、根が腐り落ちていた。順化が失敗した原因として、シュート基部の肥大したカルスが順化の際にダメージを受けやすいことが考えられた。そこで、順化の障害となるカルス形成を避けるため、培地支持体とIBA処理の方法について検討した。

実験2の結果をTable 2.に示した。またFig. 1に、寒天培地—IBA添加区および混合用土—IBA浸漬区の発根の様子を示した。

IBA添加区では、発根率は培地支持体として寒天を

Table 2. Effects of each supporting material and IBA treatment on root and callus formation, and following acclimatization.

Supporting material	IBA* treatment	Root formation rate(%)	Callus** formation	Proportion of surviving plantlets(%)	
Agar	Supplement	97	+++	4/29#	(14)
Vermiculite	〃	57	+	7/17	(41)
Vermiculite + Porous soil	〃	67	+	6/20	(30)
Agar	Dip	16	++	0/4	(0)
Vermiculite	〃	50	—	10/15	(67)
Vermiculite + Porous soil	〃	63	—	14/19	(74)

Thirty shoots were used in each treatment.

* 'Supplement'; Each medium contained 5.0 μM of IBA.

'Dip'; The basal ends of shoots were dipped in 200 μM IBA solution for 2 hours before transplanting to each IBA free medium.

** Callus was rated on a scale of poor(+) to best(+++), or no(-) growth.

No. of plantlets surviving at completion of the examination/No. of plantlets examined for acclimatization.

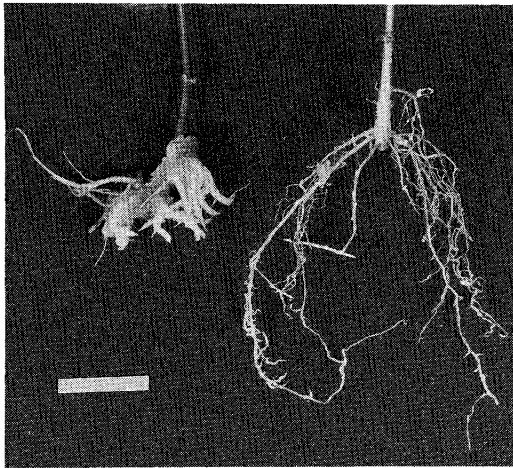


Fig. 1 Comparison of roots after six weeks of culture on different rooting media.

Left : Supporting material was agar (containing 5 μM IBA).

Right : Supporting material was vermiculite plus porous soil, The basal end of shoot was dipped in 200 μM IBA for two hours before transplanting to IBA free rooting medium.

Bar = 10 mm

用いた区で最も高かった。バーミキュライトおよび混合用土を支持体とした培地では、発根率はいずれも寒天培地より劣った。いずれの区もシュートの基部は肥大してカルスを生じ、根はすべてこのカルス表面から生じてい

た。カルスの肥大は寒天区で著しかった。また発根した根は柔軟で切れやすく、細根を欠いていた。

IBA 浸漬区の発根率は、いずれも IBA 添加区の発根率を下回っており、ことに寒天を支持体とした区が発根率は著しく低かった。寒天培地では、IBA 添加区と同様すべてのシュートの基部が肥大してカルスを形成しており、根の形態も異常であったが、バーミキュライトおよび混合用土を支持体とした区ではカルス形成は肉眼ではほとんど認められず、根は IBA 添加区よりも長く、細根を生じていた (Fig. 1)。

IBA 浸漬処理区では、寒天培地を除き、順化後の活着率は高かった。片岡⁷⁾らは、パパイヤの培養による大量増殖で、順化の障害となるカルス形成は、培地支持体としてバーミキュライトを用いることで回避できると報告している。また山本⁸⁾は、クヌギ培養シュートには、発根培地の支持体としてバーミキュライトが適していると報告し、その理由として、通気性がよい点、およびバーミキュライトの吸着力によるオーキシンの局在化による濃度差の影響を示唆している。また鈴木⁹⁾は、ブルーベリーの培養シュートでは、バーミキュライトよりもバーミキュライトと鹿沼土の等量混合用土の方が発根培地の支持体として優れていると報告している。本実験の結果、ケヤキにおいてもバーミキュライト、並びにバーミキュライトと鹿沼土の混合用土は発根支持体として適していることが明らかとなった。

このように IBA 浸漬処理は、発根の状態が優れているにもかかわらず IBA 添加処理と比較してシュートの

Table 3. Effects of IBA concentration on root and callus formation and following acclimatization.

IBA (μM)	Root formation rate (%)	Callus growth	Proportion of surviving plantlets (%)
0	7	—	0/2* (0)
200	57	—	12/17 (71)
600	67	+	9/20 (45)
1800	80	+++	8/24 (33)

Thirty shoots were used in each treatment. Callus was rated on a scale in Table 2.

* No. of plantlets surviving at completion of the examination/No. of plantlets examined for acclimatization.

**Fig. 2** Effects of IBA treatment time and culture period on rooting and following acclimatization.

* Died: Plantlets died under the acclimatization stage.

Survived: Plantlets surviving at completion of the examination.

** IBA treatment time (hours) a: 0, b: 2.7, c: 8, d: 24, e: 72.

発根率が低かった。そこで実験3,4では、バーミキュライトと比較して発根率が高かった混合用土を支持体として用い、IBA浸漬処理の改良による発根率の向上を試みた。

まず、実験3としてIBA濃度の影響を調査した。結果をTable 3.に示した。IBA濃度の上昇にともない発根率は上昇したが、600 μM 以上の濃度区ではシュート基部にカルスが形成され、活着率は高濃度処理区ほど低かった。

そこで、実験4において、IBA濃度をカルス形成が肉眼では認められなかった200 μM とし、浸漬処理時間を延長して発根率の改善を試みると同時に、発根に適し

た培養期間を検討した。結果をFig. 2に要約した。供試した時間内ではIBA浸漬時間の延長によるカルス形成は認められなかった。発根率は、2.7時間の浸漬処理ではやや劣ったものの、8時間以上の処理ではいずれもほぼ同等の結果が得られた。培養期間については、6~8週培養した植物体の活着率は根が未発達なため40%程度であったのに対し、10~12週培養した植物体ではいずれも90%以上が活着した(Fig. 3)。

以上の結果より、ケヤキの成木水挿し丸太の萌芽枝腋芽から効率よく植物体を再生するためには、DL培地にzeatin 1 μM を加えた培地でシュートを伸長させ、シュート基部を200 μM 程度の濃度のIBA溶液に8時間以

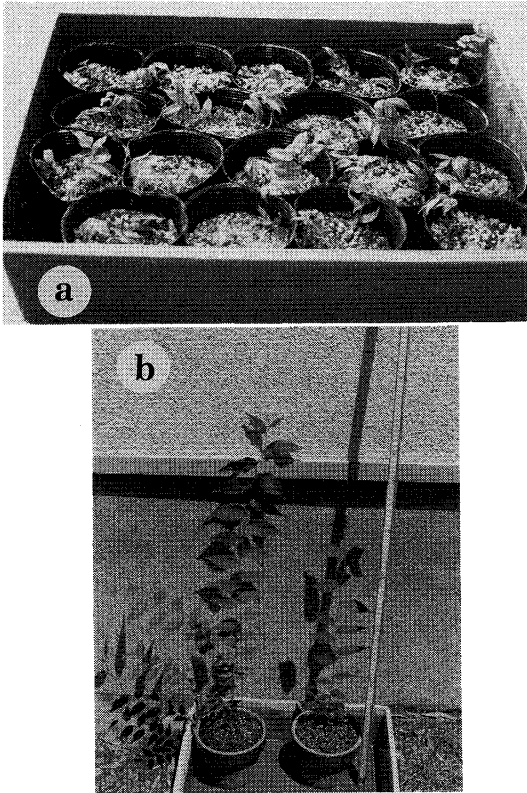


Fig. 3 Acclimated plantlets of *Zelkova serrata*.
 a : At completion of the examination.
 b : Four months after completion of the examination.

上浸漬した後、DLを1/2に希釈して加え、バーミキュライトと鹿沼土の混合用土を支持体とした培地で10～12週間の培養をおこなうのが適当であると考えられた。今後、より高濃度の溶液で短時間処理する方法や、発根と順化を同時に行うなど、さらに簡便な発根と順化の方法について検討していきたい。

本論文を御校閲いただいた関東林木育種場育種第二研究室長（現在：林木育種センター育種部育種第三研究室長）近藤禎二博士に対し、厚くお礼申し上げます。

文 献

- 1) 近藤禎二, 鈴木賢一, 九島宏道, 1987. 39 回日林関東支論, p. 101-102.
- 2) 引田裕之, 1989. 41 回日林関東支論, p. 63-64.
- 3) 原口雅人, 1990. 42 回日林関東支部講演要旨集, p. 15.
- 4) Durzan, D. J., S. M. Lopushanski, 1975. Can. J. For. Res., 5: 273-277.
- 5) Murashige, T., F. Skoog, 1962. Physiol. Plant., 15: 437-497.
- 6) Lloyd, G., B. McCown, 1980. International Propagators Society Combined Proceedings, 30: 421-427.
- 7) 片岡郁雄, 井上 宏, 198. 園学要旨昭62秋, p. 168-169.
- 8) 山本茂弘, 近藤 晃, 井出雄二, 1991. 日林誌, 73: 225-231.
- 9) 鈴木 卓, 神田啓臣, 今川 茂, 八鍬利郎, 1988. 園学要旨昭63春, p. 50-51.

Summary

Several Conditions of Rooting and Acclimatization of *Zelkova serrata*

Masanori TOMITA

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

Factors affecting both rooting and acclimatization of *Zelkova serrata* were investigated.

Elongating shoots from nodal explants on modified Durzan and Lopushanski (DL) medium containing $1 \mu\text{M}$ of zeatin, and dipping the basal end of shoots in $200 \mu\text{M}$ IBA solution for 8 hours, before planting in 1/2 DL medium using vermiculite plus porous soil as a supportig material, gave the most satisfactory result.