

## ケヤキ茎頂培養に及ぼすサイトカイニンの種類と濃度の影響

富田正徳

弘前大学農学部

(〒036 青森県弘前市文京町3)

(1992年7月8日受付)

(1992年12月24日受理)

ケヤキは実生による増殖がおこなわれているが、年によっては全く開花結実しないなど種子の豊凶差が著しく、隔年結果の傾向がある<sup>1,2)</sup>。さらに種子を2年以上長期保存するのは困難である<sup>1-3)</sup>ことから、種苗の安定した供給方法は確立されていない。このことから、優良母樹由来の少数種子からの種苗の大量増殖法として組織培養が有効であると考えられる。

大量増殖法の確立のためには、効率的な増殖条件を決定する必要があるが、これまでケヤキ実生組織の培養をおこなった例は、Wangら<sup>3)</sup>の完熟胚ならびに無菌実生の胚軸と子葉を供試した報告のみである。しかし種子の internal bacteria による汚染が著しく、供試外植体数当りの得苗率は胚軸で50%、子葉で56%程度であったと報告されており<sup>3)</sup>、大量増殖手段としては、得苗率の点で問題があると考えられる。そこで、大量増殖法確立のための基礎的知見を得る目的で、種子の汚染による影響を回避するために温室内で発芽させたケヤキ実生茎頂を材料とし、茎頂培養における数種のサイトカイニンのシュート形成に及ぼす効果の検討をおこなった。

温室内で育成した発芽後7週目の、初生葉が4枚出た段階のケヤキ実生の茎頂を供試材料とした。実生から葉柄と上胚軸部分を5mm程度残した茎頂部分を切り取り、70%エタノールで1分間殺菌した後、さらに有効塩素0.5%の次亜塩素酸ナトリウム溶液で5分間殺菌した。滅菌水で3回洗浄の後、クリーンベンチ内で実体顕微鏡を用いて0.3~0.7mmの茎頂部分を取り出し、培地15mlを分注したガラス培養ビン(25×120mm)に1ビン当たり1茎頂を植え込んだ。1試験区当りの供試茎頂数は40~45とした。

培養は、基本組成として成木丸太の萌芽枝由来の腋芽培養<sup>4)</sup>で好結果が得られた Durzan & Lopushanski 培地<sup>5)</sup>の無機多量要素に Murashige & Skoog (MS) 培地<sup>6)</sup>の無機微量要素および有機物、ショ糖 20 g/l<sup>-1</sup>、寒天 10 g/l<sup>-1</sup>を加えた培地 (DL) を用い、これに BAP, CPPU (*N*-(2-chloro-4-pyridyl)-*N'*-phenylurea), kinetin, または Zeatin のいずれかを 10<sup>-6</sup>, 3.16×10<sup>-6</sup>, 10<sup>-5</sup>, 3.16×10<sup>-5</sup> M の濃度で添加し、pH 5.7 に調整した培地でおこなった。培養は 16 時間日長, 25±2°C, 3,000 lux の人工照明室内でおこなった。4 週毎に同組成の培地へ継代培養をおこない、12 週目に生育調査とシュートの発根試験をおこなった。発根試験は、12 週目の調査時点で 15 mm 以上に伸長していたシュートを切り取り、シュート基部を 2.0×10<sup>-4</sup> M の 3-indolebutyric acid 水溶液に 8 時間浸漬した後、1/2 に希釈した液体 DL 培地 8 ml と、パーミキュライトと鹿沼土の等量混合用土 10 ml を分注した 18×150 mm 試験管に一本ずつ植付け、10 週間培養しておこなった<sup>4)</sup>。

培養後 12 週目における茎頂の生育結果を Table 1 に示した。いずれの供試区でも 1 回目の継代培養 (4 週目) までに褐変枯死する茎頂 (外植体) が認められた。枯死しなかった茎頂は調査時点まで生存し、いずれも茎葉の展開と伸長が認められた。茎頂生存率は、CPPU, kinetin 添加区でやや低かった。BAP 添加区のシュート形成数は等濃度の他のサイトカイニン添加区よりやや多い傾向があり、BAP 10<sup>-5</sup> M 区のシュート形成数は供試区中最大となった。BAP を 10<sup>-5</sup> M 以上添加した区の平均シュート長は短かった。CPPU 添加区では茎頂の基部に形成されるカルスの肥大生長が他区より旺盛で

**Table 1.** Effects of various cytokinins on multiple shoot formation from shoot tips for twelve weeks of culture.

Concentration of cytokinin (mol)		Proportion of surviving explant (%)		No. of shoots per surviving explant	Mean shoot length (mm)	Intensity of callus formation* <sup>1</sup>
BAP	10 <sup>-6</sup>	29/40* <sup>2</sup>	(73)	3.6 <sup>c*3</sup>	17.0 <sup>cd*3</sup>	+
//	3.16×10 <sup>-6</sup>	28/42	(67)	6.0 <sup>bc</sup>	16.8 <sup>cd</sup>	+
//	10 <sup>-5</sup>	25/41	(61)	13.2 <sup>a</sup>	7.4 <sup>e</sup>	++
//	3.16×10 <sup>-5</sup>	26/40	(65)	9.4 <sup>ab</sup>	6.2 <sup>e</sup>	++
CPPU	10 <sup>-6</sup>	22/43	(51)	2.2 <sup>d</sup>	15.5 <sup>c</sup>	++
//	3.16×10 <sup>-6</sup>	24/40	(60)	2.9 <sup>cd</sup>	16.5 <sup>bc</sup>	++
//	10 <sup>-5</sup>	21/42	(50)	4.0 <sup>cd</sup>	12.6 <sup>cd</sup>	+++
//	3.16×10 <sup>-5</sup>	16/41	(39)	3.0 <sup>cd</sup>	7.7 <sup>de</sup>	+++
kinetin	10 <sup>-6</sup>	19/42	(45)	1.5 <sup>de</sup>	20.1 <sup>c</sup>	—
//	3.16×10 <sup>-6</sup>	21/41	(51)	1.2 <sup>e</sup>	20.3 <sup>cd</sup>	—
//	10 <sup>-5</sup>	18/45	(40)	1.3 <sup>de</sup>	14.2 <sup>cd</sup>	—
//	3.16×10 <sup>-5</sup>	11/40	(28)	2.6 <sup>cd</sup>	10.6 <sup>de</sup>	+
zeatin	10 <sup>-6</sup>	28/44	(64)	1.8 <sup>cd<sup>e</sup></sup>	32.5 <sup>a</sup>	—
//	3.16×10 <sup>-6</sup>	29/42	(69)	2.5 <sup>cd</sup>	33.6 <sup>a</sup>	+
//	10 <sup>-5</sup>	26/40	(65)	3.2 <sup>cd</sup>	27.7 <sup>ab</sup>	+
//	3.16×10 <sup>-5</sup>	24/41	(58)	2.2 <sup>d</sup>	12.6 <sup>de</sup>	++

\*<sup>1</sup>—: nil, +: low, ++: moderate, +++: high.

\*<sup>2</sup>No. of surviving explants after twelve weeks of culture / No. of explants examined.

\*<sup>3</sup>Mean separation within column by Duncan's multiple range test at 5% level.

**Table 2.** Root formation from shoots obtained from *Zelkova serrata* shoot tip culture.

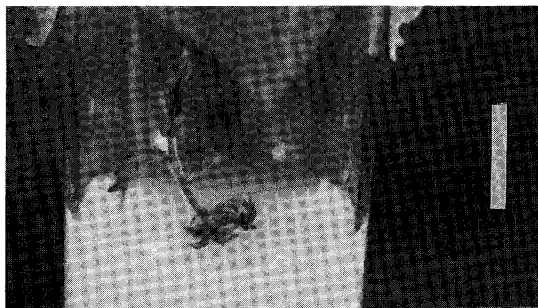
Culture condition of shoot origin		No. of shoots examined	Root formation rate(%)
BAP	10 <sup>-6</sup> (mol)	34	53
//	3.16×10 <sup>-6</sup>	36	56
//	10 <sup>-5</sup>	40	50
//	3.16×10 <sup>-5</sup>	11	36
CPPU	10 <sup>-6</sup>	19	37
//	3.16×10 <sup>-6</sup>	25	32
//	10 <sup>-5</sup>	12	0
//	3.16×10 <sup>-5</sup>	—	—
kinetin	10 <sup>-6</sup>	13	38
//	3.16×10 <sup>-6</sup>	11	36
//	10 <sup>-5</sup>	6	17
//	3.16×10 <sup>-5</sup>	—	—
zeatin	10 <sup>-6</sup>	44	86
//	3.16×10 <sup>-6</sup>	58	83
//	10 <sup>-5</sup>	46	65
//	3.16×10 <sup>-5</sup>	7	43

あり、また 10<sup>-5</sup> M 以上の濃度区で形成されたシュートは全て水浸状を呈した。kinetin 添加区のシュート形成数は少なかった。Zeatin 添加区のシュート形成数は、kinetin 添加区と同様少なかったが、10<sup>-5</sup> M 以下の濃度区では著しくシュートが伸長した (Fig. 1)。

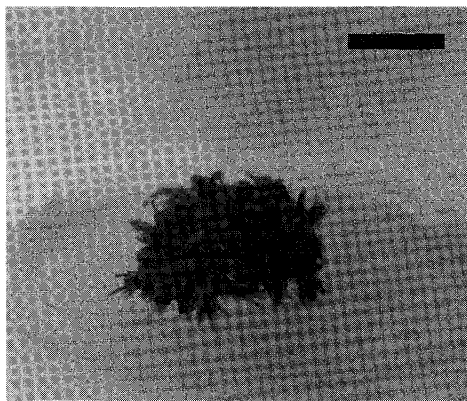
培養 12 週目のシュートを用いた発根試験の結果を

Table 2 に示した。発根率は zeatin 添加区由来のシュートで最も高く、BAP 添加区がこれに次ぎ、CPPU および kinetin 添加区由来のシュートでは低かった。

発根試験に用いなかった茎頂は更に 4 週毎に継代培養をおこなった。BAP 10<sup>-5</sup> M 添加区では新たなシュートの形成が認められ、多芽体を形成したが (Fig. 2)、他



**Fig. 1** Shoot elongation on modified DL medium supplemented with  $10^{-6}$  M zeatin after 12 weeks in culture.  
Bar=10 mm.



**Fig. 2** Multiple shoot formation on modified DL medium supplemented with  $10^{-5}$  M BAP after 24 weeks of culture.  
Bar=10 mm.

濃度の BAP 区および他のサイトカイニン添加区では新たなシュートの形成は認められず、16 週目までにほぼ全てが枯死した。Fig. 2 に示した多芽体を分割し、BAP を除いたホルモンフリー培地、あるいは BAP に代えて NAA  $10^{-7}$ ~ $10^{-6}$  M を添加した培地に移植したが、シュートの伸長、発根は認められなかった (Data 省略)。

以上の結果、ケヤキ茎頂の培養において DL 培地に添加するサイトカイニンの種類と濃度は、茎頂の生存率、シュートの増殖と伸長、およびシュートからの発根に影響を与えることが明らかとなった。供試範囲内では、zeatin  $10^{-6}$ ~ $3.16 \times 10^{-6}$  M 添加区でのシュートがよく伸長し、また成木萌芽枝腋芽の培養の結果と同様<sup>4)</sup>、得られたシュートの発根率も他のサイトカイニン添加区由来のシュートより高かった。Zeatin 添加区で最も供試茎頂当りの得苗数が高かったのは zeatin  $3.16 \times 10^{-6}$  M 添加区で、得苗数は 1.14 本であり、これは Wang らの

報告<sup>3)</sup>を上回った。より効率的な大量増殖方法としては、BAP  $10^{-5}$  M 添加培地で得られる多芽体の培養条件を検討し、シュートの伸長条件を明らかにし、発根率を向上させて得苗率を上げることが考えられる。この点について今後さらに検討する予定である。

#### 文 献

- 1) 石井幸夫, 1978, 日林誌, **60**: 209-212.
- 2) 引田裕之, 金川 侃, 1991. 102 回日林論, p 495-496.
- 3) Wang, Y. N., C. H. Chiang, L. Y. Chang, 1991. Quart. J. Expt. Forest, NTU, **5**: 13-24.
- 4) 冨田正徳, 1992, 植物組織培養, **9**: 34-38.
- 5) Durzan, D. J., S. M. Lopushanski, 1975. Can. J. For. Res., **5**: 273-277.
- 6) Murashige, T., F. Skoog, 1962. Physiol. Plant., **15**: 473-497.

#### Summary

### Effects of Cytokinin's Types and Their Concentrations on Shoot Tip Culture of *Zelkova serrata*

Masanori TOMITA

Faculty of Agriculture, Hirosaki University,  
Hirosaki, 036 Japan

Effects of various cytokinin types and their concentrations on shoot tip culture of *Zelkova serrata* were

investigated.

Shoot growth varied among different cytokinin types and their concentrations on modified Durzan & Lopushanski medium. BAP stimulated shoot multiplication at  $10^{-5}$  M. Zeatin stimulated shoot elongation at  $10^{-6}$ - $3.16 \times 10^{-6}$  M. Root formation varied depending on the cytokinin type supplemented in the shoot culture medium.