

カラマツ属の成木シュート頂と成熟胚からの苗条原基誘導

錦 織 正 智 *

Induction of cell clumpus of multiple shoot primordia from shoot apexes of adult trees and mature embryos in *Larix gmelinii* × *L. leptolepis* and *L. gmelinii*

Masatomo NISHIKOORI

要 旨

グイマツ雑種 F1 成木 (*Larix gmelinii* × *L. leptolepis*) から苗条原基の誘導を目的に、外植体の採取時期と培地組成を検討し、同時に誘導した苗条原基の長期継代の可能性について調査をおこなった。苗条原基の誘導には品種グリーンを用い、当年枝のシュート頂を外植体とした。材料の採取は 1995 年 12 月から 1996 年 12 月まで毎月おこなった。誘導条件は温度 25℃、連続照明下での回転培養 (5 rpm) とし、Schenk and Hildebrandt (SH) 液体培地を基本培地に用い、培地中の 6-Benzylaminopurine (BA) と Naphthalenencetic Acid (NAA) の組み合わせを変えた。その結果、12~2 月に採取した外植体から、BA 0.2 mg/l のみの条件で効率よく苗条原基を誘導することができ、800 日以上継代を維持した。

また苗条原基誘導と外植体の齢との関係を明らかにすることを目的に、グイマツ接木クローン (*L. gmelinii*) 系統を対象に、成木シュート頂と成熟胚から苗条原基の誘導を試みた。シュート頂と成熟胚の両者から誘導できたのは 1 系統で、残りは何れか一方でのみ誘導することができた。またシュート頂に由来する苗条原基から分化させた不定芽は、成熟胚からのものに比べて発根までに長期間を要した。

キーワード：グイマツ雑種 F1 グイマツ 外植体 苗条原基 齢 継代期間

はじめに

永年性植物の固有の形質の多くは成熟期に達してから現れるため、林木においても個体の特性や性質を評価するには、一定の齢を重ねた成木を対象にする必要がある (岡 1993)。造林樹種の場合、永年の検定を経て選抜した個体を直接クローン増殖に利用し、優れた遺伝子型で構成する次世代集団をつくることできれば、精英樹から採種した実生集団以上に単位時間あたりの遺伝獲得量を得ることができる。またクローン増殖は、雑種強勢や優性のような非相加的遺伝様式に支配されている形質を固定することができるため、実生繁殖に伴う遺伝的な分離が生じない点からも有効な繁殖手法といえる。

組織培養によるクローンの増殖系には、シュート頂培養のほか、不定芽や不定胚など様々な系があるが、それぞれに増殖率や遺伝的安定性の違いがあるために、種苗生産や育種の利用といった目的別に使い分けられている (Shimonishi et al. 1995)。不定芽の系については、Tanaka and Ikeda (1983) が *Hoplopappus gracilis* を用いて、シュート頂を回転培養することにより誘導した苗条原基は染色体レベルでは遺伝的に安定な培養体であることを明らかにした。そして田中 (1983) は、この苗条原基法が雑種強勢、F1 雑種などの遺伝子型を維持していくことが困難な植物を長期にわたり大量増殖する場合に有効であることを示唆した。その後、キク科を中心に多くの植物で苗条原基の誘導が試みられ、*Eucalyptus* 属 2 種と *Populus sieboldii* の木本類を含む 5 2 種で誘導が報告されている (谷口ら 1988)。

成木を対象に組織培養をおこなうことは上記のような利点があるにも拘わらず、針葉樹の場合、不定芽や再生植物体を得ることができるのは、多くの樹種で未成熟胚から実生までの若齢な材料から摘出した外植体の培養に限られている (Bonga 1991)。この理由として、頂端分裂組織で生じる幼若相から成熟相への漸進

* 北海道立林業試験場 Hokkaido Forestry Research Institute, Bibai, Hokkaido 079-0198

的な変化が(Kozlowski 1971,Hackett 1980,Hackett et al. 1992)、生理的にも分子レベルでも生じ(Bonga 1982)、これらに起因して分化全能性が低下することが考えられている。

本報では、グイマツ雑種 F1 の成木シュート頂からの苗条原基の誘導条件、および外植体の採取時期と長期継代の可能性との関係について検討した。さらに苗条原基の誘導の成否に及ぼす外植体の齢の影響をグイマツ接木クローンからシュート頂と成熟胚を採取して検討した。

材料および方法

1. グイマツ雑種 F I 成木からの苗条原基誘導

(1) 成木からの苗条原基誘導に及ぼす培地組成と外植体の採取時期の検討

供試材料には、グイマツ雑種 F1 (Larix gmelinii × L.leptolepis.cv. グリーム、1974 年道立林試構内植栽) を用い、1995 年 12 月から 1996 年 12 月まで毎月中～下旬に樹冠下部の当年枝を採取した。この当年枝先端を 1cm 程度の植物片に切りそろえ、中性洗剤 500 倍液で 30 分間攪拌洗浄し、これらを 70%エチルアルコールに数秒間浸漬し、続いて次亜塩素酸ナトリウム(有効塩素濃度 1%) で 15 分間殺菌し、その後滅菌水で各 5 分間ずつ 3 回洗浄した。

外植体には、植物片から頂端部位を約 0.2 ~ 0.5 mm の大きさに摘出したものを用いた。これを 6 - Benzylaminopurine (BA) 0 ~ 4mg/l と -Naphtharenacetic Acid (NAA) 0 と 0.02mg/l の計 8 通りの組み合わせに調整した SH 液体培地 (Sucrose 20 g / l pH5.75 表-1、Schenk and Hildebrandt 1972) に置床し、径 45cm の小型傾斜回転培養機 (径 15.8mm の試験管 150 本架、1 本の試験管に液体培地 5mm l を使用) を用いて毎分 5 回転で回転培養した。培養温度は 25 °C、光条件は蛍光灯による連続照射とした。また供試数は 4 個/処理区とした。

表 -1 グイマツ雑種 F I の苗条原基を誘導することができた外植体の採種時期と成長調節物質濃度組成

	BA(mg/l)				
	NAA(mg/l)	0	0.2	2.0	4.0
0		95.12	96.1	96.1	
		96.1, 2	6,7	8,9	10,12
	0.02	95.12	96.1		
		96.2,6			

(2) 苗条原基の継代と継代に伴う形態的变化

継代は培養開始後 1 週間目から開始し、1 週間の継代間隔で誘導時に用いた同様の培地に移植をおこなった。培養開始時から苗条原基の枯死に至るまでの形態的变化を観察し、同時に材料の採取時期別に継代期間を調査した。

(3) 苗条原基に由来する不定芽の分化

不定芽の分化能は、回転培養中の苗条原基を改変 Woody Plant 寒天培地 (改変 WP 寒天培地、表 - 2) に移植して、16/8 h (明期/暗期時間) 25 °C の培養条件下で不定芽分化の有無を観察した。苗条原基 1 個あたりから分化する不定芽数は、培養開始から 180 日目の苗条原基を無作為に 3 個選び、各苗条原基が産する 1 次不定芽数の合計から平均不定芽数を求めた。また改変 WP 培地への移植後は、3 週間の継代間隔で同一培地に継代をおこなった。

2. グイマツ成木および成熟胚からの苗条原基誘導

(1) 苗条原基誘導と外植体の齢の関係

供試材料には、6 系統のグイマツ接木クローン (L.gmelinii 1973 年道立林試構内植栽) を用い、同一クローンから当年枝と種子を採取した。当年枝は 1995 年 10 月に採取し、I - (1) と同様の方法で調整した頂端部

位を加齢した外植体とした。種子は1995年9月に採取し、風乾後、11月に当年枝と同様の方法で滅菌し、種皮と内胚乳を除去した成熟胚を若齢の外植体とした。

基本培地はSH液体培地 (Sucrose 20g/l PH5.75) とし、シュート頂にはBA 0.2mg/l を、成熟胚にはBA 2.0mg/lをそれぞれ添加したものをを用いた。その他の培養方法と条件はI - (1)と同様におこなった。また供試数はシュート頂と成熟胚のそれぞれについて2個/系統とした。

(2) 不定芽の発根に及ぼす外植体の齢と光周期の影響

苗条原基から不定芽をI - (3)と同様の条件下で分化させ、同一の苗条原基に出来る多数の不定芽をほぼ三等分にし、それぞれを2/1、6/2、16/8hの光条件下(25℃)で培養し、発根させた。また不定芽が発根に要する日数は、苗条原基を改変WP寒天培地に置床した時点から起算して不定芽が発根までに至る期間とした。

結 果

I. グイマツ雑種F1成木からの苗条原基誘導

(1) 成木からの苗条原基の誘導に及ぼす培地組成と外植体の採取時期の検討

BAとNAAを組み合わせた8種類の培地のうち、5種類の培地で培養開始から6~8週間後に苗条原基が誘導できた(表-1)。これらは後述する不定芽の分化を確認した上で苗条原基といえるものであると判断した。なかでもBA0.2mg/l区は、材料の採取期間13ヵ月の内、9ヵ月に誘導することができ、他の処理区では誘導できた時期が冬季間に集中しているのに比べて広範な採取時期に誘導することができた。

またシュート頂植付け1週間後(初代培養時)のシュート頂生存率は、12~3月に採取したものは生存率が80%を超えるのに対して、最も低い生存率は

5月採取のもので12.5%であった(図-1)。苗条原基誘導の過程における外植体(シュート頂)の経時的形態変化についてさらに詳細に検討したところ、次のような4つのタイプに分類できた。

すなわち シュート頂が凹凸様に突起を有した組織に肥大するもの、シュート頂が肥大しても、表面は平滑なもの、葉原基のみが肥大伸長するもの、カルスまたはビトリフィケーション状のカルスになるものである。これらのうちのみが苗条原基となった。しかし培養初期の過程においては、将来苗条原基になる緑色組織とカルスの増殖が並行し、両者の競合を避けるために、選択的に緑色組織のみをピンセットで分割して培養する必要があった。また のなかには改変WP寒天培地に置床すると早生

表-2 改変Woody Plant 培地の組成

		(mg/l)	
無機栄養素	主要要素	NH ₄ NO ₃	1,200
		Ca(HO ₃) ₂ · 4H ₂ O	556
		MgSO ₄ · 7H ₂ O	370
		KH ₂ PO ₄	340
		K ₂ SO ₄	990
		CaCl ₂ · 2H ₂ O	96
	微量元素	MnSO ₄ · H ₂ O	22.3
		H ₃ BO ₃	6.2
		ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8.6
		CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.25
	NaMoO · 4H ₂ O	0.25	
	FeSO ₄ · 7H ₂ O	27.8	
	Na ₂ EDTA	37.3	
有機栄養素	ビタミン	Thiamine HCl	1.0
		Nicotinic acid	0.5
		Prydoxine HCl	0.5
	アミノ酸	Glycine	2.0
	myo-Inositol	100	
	サッカロース	20,000	
固形化剤	寒天	7,500	
	活性酸素	4,000	
	pH	5.75	

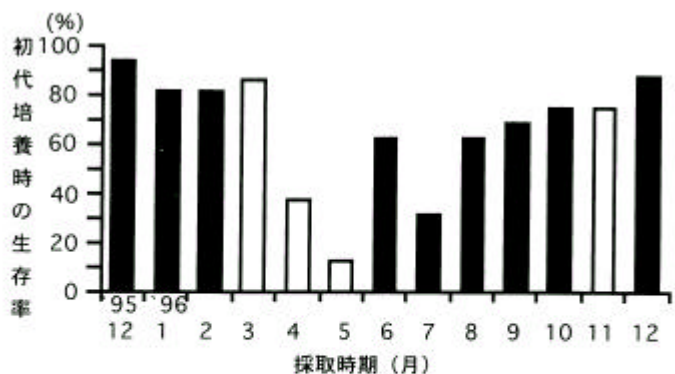


図-1 グイマツ雑種F1における材料の採取時期の違いによる初代培養時のシュート頂の生存率と苗条原基誘導の成否との関係
 ■：苗条原基を誘導できた。
 □：苗条原基を誘導できなかった。

分枝になるものがあったが、これから分化した不定芽はビトリフィケーションを生じ、正常に分化することはなかった。また、

何れの培養体も体積の増加は苗条原基に比べて盛んで、1週間の継代期間中に肥大した培養体は試験管の内壁に固定し、液体培地中での回転を停止した。その後まもなく培養体は褐変を生じて枯死に至った。

また実験当初、NAAの2.0と4.0mg/l濃度区を加えて設定していたが、これらの処理区は、BAの濃度に関係なくすべての組み合わせでカルスのみが生じ、苗条原基の分化が望めないことから、実験途中で検討から除いた。

(2) 苗条原基の継代と継代に伴う形態的变化

継代培地は、誘導培地と同じ組成の培地が苗条原基として維持し、継代することに適していた。継代間隔についてみると、1週間間隔は苗条原基をコンパクトな状態で保つことができたが、10日以上の間隔になるとコンパクトさが失われ、褐変し、枯死するものが多くなった。

培養開始から苗条原基が枯死に至るまでの期間は、シュート頂植付け1週間後(初代培養時)のシュート頂生存率が高い時期に誘導したもののほど長くなる傾向があった(図-2)

培養開始から継代を経て枯死に至るまでの形態的变化は、次のとおりであった。培養を開始するとシュート頂は、体積のみを増加し、これらは6~8週間目に苗条原基へ分化し、さらに進むと小集塊へと分割を開始した。この分割は、一次苗条原基の外側に二次苗条原基を形成し、その部分が肥大してもとの苗条原基から自然に分離していくという形態をとっていた。この体積の増加と小集塊への分割が並行するステージに入った苗条原基の1週間の継代間隔当たりの増殖・分割の進度は、1本の試験管の苗条原基が試験管2~3本分に増加する速度で安定していた。このステージが進むと、やがて苗条原基の表面組織に硬化がはじまり、続いて分割を停止した。次に内部に新たな細胞の分裂と増殖が起こらなくなり、これに起因して内部の空洞化が進み、やがて細胞塊が崩壊し、この細胞片は増殖することなく枯死に至った。

また形態的变化と同時に、苗条原基の色にも変化が生じた。継代開始時から、苗条原基への分化と分割を維持している過程までは淡緑色を呈し、分割する能力が低下すると濃緑色になり、内部の空洞化が始まると暗緑色へと変化し、枯死する時点では褐変した。

これらの変化は不可逆的で、分割を停止したものが再度、増殖・分割ステージに戻ることはなかった。

3) 苗条原基に由来する不定芽の分化

苗条原基を改変 WP 寒天培地に置床すると、2~3週間目から苗条原基表層の凹凸様の組織表面上で、葉

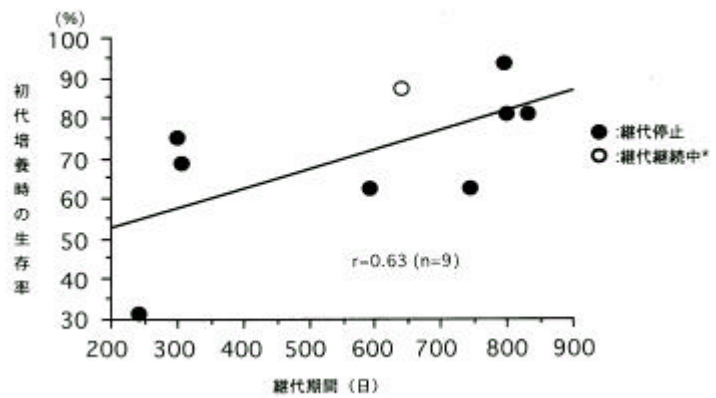


図-2 ギイマツ雑種F1における初代培養時のシュート頂の生存率と苗条原基の継代期間の関係

*: 1998年9月4日現在

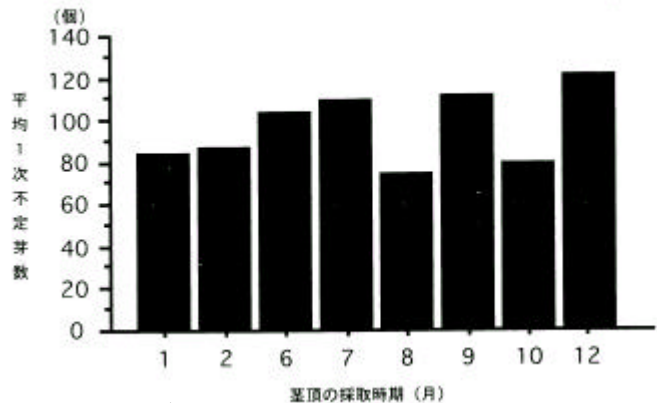


図-3 ギイマツ雑種F1におけるシュート頂の採取時期を異にする苗条原基が産する平均1次不定芽数

原基へと発達する細胞の隆起が生じ、これらは伸長を経て針葉を形成した。さらに進んで約 10 週目頃になると、隣り合う針葉のいくつかが集まり不定芽を形成した。針葉の分化と伸長の初期ステージでは、針葉の基部は堅固に苗条原基表面で結びつき乖離することはないが、不定芽の形成が終了すると、基部組織の壊死が始まり、不定芽は個々に独立し、容易に分割することができた。また 1 次不定芽の分化に遅れて、苗条原基の深部では 2 次・3 次不定芽の分化が始まるが、不定芽の分割時におけるこれらの大きさは 1 次不定芽に比べて半分以下しかなく、容易に識別することができた。



図 - 4 ギイマツ雑種F1 成木シュート頂由来の再生植物体

シュート頂を採取して苗条原基を誘導した時期と苗条原基が産する 1 次不定芽数の関係を調査し、分散分

析をおこなったところ、採取時期と 1 次不定芽数の間に関係を認めることはできなかつた(F 値 0.227 図 - 3)

また改変 WP 寒天培地での継代を続けた結果、一部の不定芽は発根した後にシュートの伸長を開始し、再生植物体を得ることができた。しかし、この再生植物体は順化後に主軸を傾けて伸長する生育習性を呈し、この傾斜重力屈性様の伸長が垂直方向へ向かうことはなかつた(図 - 4)

・ ギイマツ成木および成熟胚からの苗条原基誘導

(1) 苗条原基誘導と外植体の齢との関係

シュート頂と成熟胚の両者から誘導することができたのは 6 系統のうち樺岡 194 のみで、シュート頂のみから誘導することができたのは 2 系統、成熟胚のみから誘導することができたのは 3 系統であった(表 - 3)。樺岡 194 のシュート頂と成熟胚由来の苗条原基における継代期間は、それぞれ 107 日と 126 日であった。

表 - 3 ギイマツの成熟胚とシュート頂における苗条基誘導の成否と苗条原基由来の不定芽に観察した発根個体数

家系	成熟胚*			シュート頂			合計
	16/8 h**	6/2 h	2/1 h	16/8 h	6/2 h	2/1 h	
樺岡 194	32***	44	21	17	26	27	167
V545	-	-	-	227	4	2	233
樺岡 376	-	-	-	3	2	0	5
沼川 118	32	16	15	-	-	-	63
豊岡 111	14	5	3	-	-	-	22
留辺蕊 5	43	17	10	-	-	-	70
合計	121	82	49	247	32	29	560

- : 苗条原基を誘導ができなかつた処理区

* : 外植体

** : 不定芽を培養した光条件(明期/暗期時間)

*** : 苗条原基由来の不定芽に観察した発根個体数(調査期間 : 1996 年 6 月 - 1988 年 4 月)

また最も長期間継代できたのは、シュート頂由来の苗条原基では V545 の 162 日で、成熟胚由来のものは沼川 118 と豊岡 111 で 1,060 日以上継代を維持している（1998 年 9 月現在）。

シュート頂が苗条原基に至るまでの経時的形態変化は前述のグイマツ雑種 F 1（グリーン）の場合と同様であった。一方、成熟胚が苗条原基に至る過程は次のとおりであった。成熟胚は液体培地に置床する時点では乳白色であったが、培養開始から 2～3 日中に淡緑色へ変化し、胚軸上部（シュート頂付近）の肥大が始まる。この部位は後に苗条原基になるが、このステージでは同時に胚軸下方（根端部）にビトリフィケーション状の赤色カルスが生じるため、数回に渡る継代期間中、ピンセットで選択的に緑色部位を取り出し、純粋な緑色細胞塊にする必要があった。成熟胚が苗条原基に分化し、増殖・分割期に至るまでの培養期間は、シュート頂と比べると若干早いものの大差はなかった。シュート頂と成熟胚の両者から得た苗条原基に外観の違いはなく、分化させた不定芽の間にも差異を見つけることはできなかった（図 - 5）。

また苗条原基に分化しなかった成熟胚は、以下のタイプに分類することができた。すなわち、子葉の伸長や肥大に続いて、組織が硬化するもの、表面の緑色組織の内部の 2 次組織が形成されないために、細胞塊の空洞化が進み、表面のみの扁平な組織片を形成し、やがて増殖が停止するもの、ビトリフィケーション状の緑色カルスになるもの、変化が生じず、胚のまま枯死するものである。またシュート頂の培養の際に観察した早生分枝への分化は成熟胚の場合にはなかった。

(2) 不定芽の発根に及ぼす外植体の年齢と光周期の影響

全系統の苗条原基において、分化させた不定芽の一部に発根を認めた（表-3）しかし、発根までに長期を要したことから、継代期間中に雑菌による汚染や枯死が生じ、不定芽の発根率を明らかにすることはでき

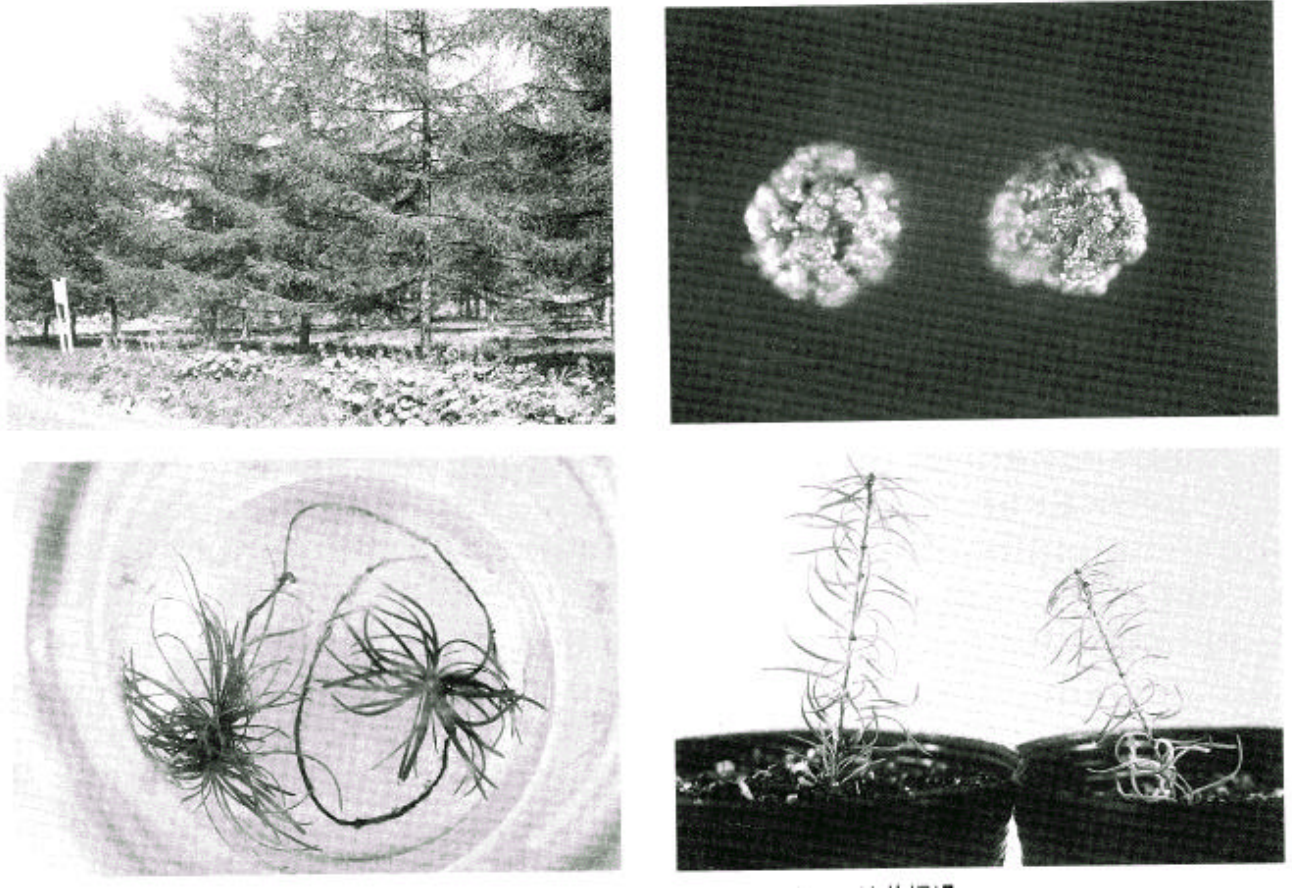


図 - 5 榿岡194 の成木シュート頂と成熟胚の培養経過

上段左：提供木 上段右：苗条原基(左：成木シュート頂由来 右：成熟胚由来)

下段左：不定芽(左：成木シュート頂由来 右：成熟胚由来)

下段右：再生植物体(左：成木シュート頂由来 右：成熟胚由来)

表 - 4

樺岡194 の不定芽に要した日数と発根に及ぼす外植体と光周期の影響

外植体	光周期	観察数	発根に要した日数				中央値
			平均	標準偏差	最小値	最大値	
成熟胚	16/8 h	32	291.2	99.6	138.0	516.0	245.0
	6/2 h	44	302.3	108.3	168.0	603.0	300.5
	2/1 h	26	411.1	220.5	187.0	709.0	266.0
シュート頂	16/8 h	17	447.5	152.8	224.0	776.0	504.0
	6/2 h	26	380.5	107.3	215.0	652.0	366.0
	2/1 h	27	381.4	120.1	238.0	749.0	344.0
合計		172	355.3	144.7	138.0	776.0	321.5
変動因	自由度	平方和	平均平方	F 値	p 値		
外植体	1	184872.732	184872.732	10.018	0.0018		
光周期	2	88459.503	44229.751	2.397	0.0942		
外植体 × 光周期	2	213970.758	106985.379	5.798	0.0037		
誤差	166	3063285.689	18453.528				

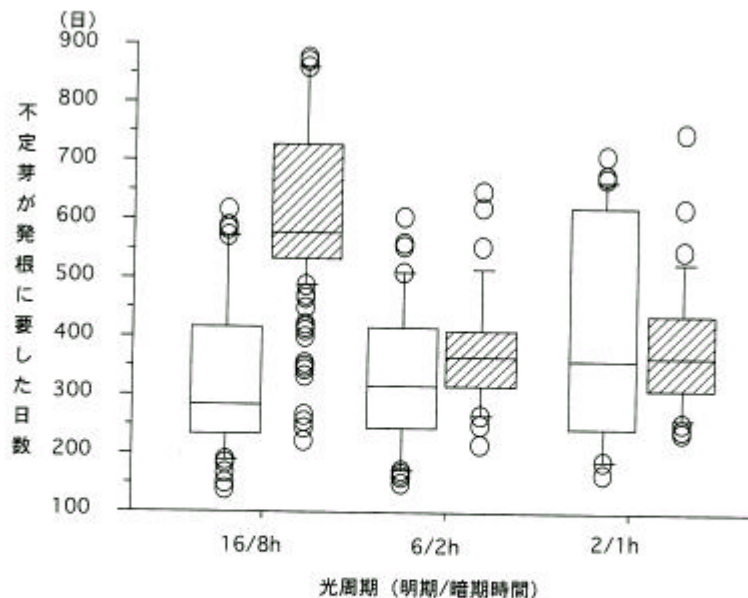


図 - 6 ギイマツ 6 家系の不定芽が発根に要した日数に及ぼす外植体と光周期の影響

○ 成熟胚由来の不定芽
 ◐ シュート頂由来の不定芽

なかった。ただし、不定芽の発根率は極めて低かった。

シュート頂と成熟胚の両者に苗条原基を誘導することができた樺岡194における不定芽の発根に及ぼす外植体の齢と光周期の影響は表 - 4のとおりである。すべての処理区においてシュート頂由来の不定芽が発根に要した日数は、最小・最大値と中央値で成熟胚由来のものよりも高い値を呈した。光周期が短くなるほど、シュート頂由来の不定芽は発根までに要する期間が短くなり、逆に成熟胚由来のものは長くなる傾向があった。この傾向は全6系統の結果を統合した場合においても、認めることができた(図 - 6)。

樺岡194のシュート頂と成熟胚の両者から再生植物体を得ることができたが、これらの間に外観から差異を見つけることはできなかった(図 - 5)。

考 察

約 25 年生のグイマツ雑種 F 1 から採取した当年枝の頂端組織（シュート頂）を培養することにより苗条原基を誘導することが可能であった。苗条原基の誘導には BA が不可欠であったが、NAA 添加の有効性は明らかではなかった。細胞の分化能には内生植物ホルモンと施用する成長調節物質が相互に作用していると考えられる（笹本 1998）。そしてこの内生植物ホルモンは質・量ともに季節の推移に応じて変化している（酒井・吉田 1983）。しかし苗条原基の誘導に最適な成長調節物質の季節的濃度を認めることはできず、BA 0.2mg/l 濃度の単一濃度区にのみ 3～5 月を除きほぼ通年誘導することができた。したがって、成木から苗条原基を誘導する際に成長調節物質の最適濃度を検索するには、数種類の濃度組合せの中で数回の繰り返しをおこない、同様の結果が得られれば外植体の内生状態（採取時期）に関わらず適用できる施用濃度と考えることができる。

苗条原基の状態では長期間にわたり維持・増殖することができれば大量増殖などをおこなう際には好都合である。しかし *Larix* 属に関しては、苗条原基法を含め、他の培養方法においても継代期間（増殖体の寿命）についての報告はない。また材料の採取時期と継代期間の関係についてもこれまでに検討されてはいない。グイマツ雑種 F 1 の場合、苗条原基を 800 日以上で長期間に渡り維持できることが明らかになり、植え付けたシュート頂の初代培養時の生存率が高い時期に誘導した苗条原基ほど長期継代を維持できる傾向を認めた。このシュート頂の生存率の推移は、耐凍性程度やそれに関連した生理的变化と類似の季節的变化を示し（酒井 1957, Yoshida and Sakai 1973, Yoshida 1974, Siminovitch et al. 1968）、培養時に生じるストレスに耐える抵抗力に耐凍性獲得と同様の生理機構が大きく関係している可能性を考えることができる。また生存率と継代期間に正の相関傾向が認められることから、採取時の外植体の生理状態は苗条原基へと分化した以降にも関与する要因であると推測することができる。しかし苗条原基が産する不定芽数においては、材料の採取時期の影響を認めることはできなかった。

上記のことから、成木のシュート頂から効率的に苗条原基を誘導し、多くの不定芽を得るためには、シュート頂の初代培養時の生存率が高い 12～2 月が材料採取の適期で、BA 0.2mg/l を添加した培地が最適であると考えられる。

苗条原基の誘導に及ぼす外植体の年齢の影響については、6 系統のグイマツを用い、同一クローンから採取したシュート頂（加齢）と成熟胚（若齢）を培養した結果、両外植体から苗条原基を誘導できたのは 1 家系のみで、シュート頂からは 2 家系、成熟胚からは 3 家系で誘導することができた。このことから外植体の年齢は苗条原基誘導の成否を決定する要因ではないと考えることができる。また分化させた苗条原基・不定芽・再生植物体の外部形態は、シュート頂と成熟胚のそれぞれに由来するものとの間に差異はなく、形態形成への外植体の年齢の関与も確認できなかった。しかし、シュート頂に由来する苗条原基は成熟胚に由来するものに比べて継代期間が短く、外植体の年齢は分化後の苗条原基の寿命に関与することが推察できた。また不定芽が発根する際、シュート頂から誘導した不定芽は成熟胚に由来するものとは異なり長期を要し、両外植体は光周期に異なる反応を示したことから外植体の加齢は器官分化にも影響していると考えられる。

またグイマツ雑種 F 1 とグイマツの苗条原基は一次苗条原基の外側に二次苗条原基を形成し、回転培養中の刺激で自然に分離し増殖した。これは *Hoplopappus gracilis* (谷口 1990) の苗条原基と同様であったが、メロン (Shimonishi et al. 1993) の場合は、自ら分離しないために継代時にピンセットにより人為的に分割する増殖形態をとっていた。このように苗条原基の増殖形態については植物種により多様であることが示唆された。

苗条原基は多くの植物種で誘導されているが、増殖率、苗条原基としての維持や再分化などの点で問題のあるものも多いとされている（谷口 1990）。グイマツ雑種 F 1 とグイマツの場合、長期の継代を維持し、不定芽を分化させることができたが、不定芽の発根率は極めて低く、再生植物体はすべて主軸を傾斜させて

伸長する生育習性を呈した。しかし、同様の傾斜屈性は *Larix eurolepis* (Nicole et al.1996,Bonga and Pond 1991) の成木由来の再生機物体で観察されており、胚を用いた *Pinus taeda*(McKeand 1985)や胚軸に由来する *Sequoia sempervirens*(Ritchie and Long 1986)の再生植物体でも報告されている。このような生育習性は広葉樹や草本類では報告されていないことから、針葉樹だけに見られる現象であり、外植体に用いる組織の種類や外植体の年齢、培養法に起因するものではないことが推測できる。

以上のように、グイマツ雑種 F 1 とグイマツにおいて、苗条原基の誘導条件および異なる年齢の外植体に由来する不定芽の特性について新たな知見を得ることができた。成木から苗条原基を経由して大量の不定芽の分化が可能であり、外機体の年齢は苗条原基の誘導の成否には重要な要因ではないが、苗条原基の継代期間と不定芽の発根に影響することがわかった。

引用文献

- 1 岡成美 1993 組織培養による木本植物の大量増殖育種におけるバイオサイエンス(蓬原雄三編著) 養賢堂 265-276
- 2 Bonga ,J.M.1982 Vgetative propagation in relation to juvenility, maturity and rejuvenation. In tissue culture in forestry.Edited by J.M.Bonga andD.J.Durzan.Martinus Bihhoff,Dordercht,Netherlands.241- 253
- 3 Bonga,J. M. and S. E. Pond 1991 Adventitious shoot formation in cultures of 30-year-old *Larix decidua*,*L.leptolepis*,*L.eurolepis*,and *L.laricina* trees. Plant Ce11 Tiss.Org. Cult. 26:45-51
- 4 Bonga,JM.1991 In vitro propagation of conifer: fidelity of the clonal offspring. Woody Plant Biotechnology. Edited by M. R. Ahuja Plenum Press, New York 13-21
- 5 Hackett, W.P. 1980 Control of phase change in woody plants.InControl of Shoot Growth inTrees.Proceedings of the Joint Workshop of IUFRO Working Parties on Xylem Physiology and Shoot Growth Physiol- ogy,20-24 Fredericton, N.B. Edited by C.H.A. Little. 257_272
- 6 Hackett,W.P.,Murlray,J.R.,and Smith,A. 1992 Control of maturation in woody species. In Proceedings of the Symposium for Mass Production Technology for Genetically Improved Fast Growing Forest Tree Species,14-18 Sept. 1992, Bordeaux. AFOCEL,Nangis,France. 45-50
- 7 Kozlowski,T.T. 1971 Maturation or phase change. In Growth and development of trees. Vo1.,Academic Press,New York. 94-116
- 8 MCKeand,S.E 1985 Expression of mature characteristics by tissue culture plantlets derived from embryos of loblolly pine.J.Amer.Soc.Hort.Sci. 110:619-623
- 9 Brassard,N.,Brissette,L.,Lord,D. and Laliberte,S.1996 Elongation, rooting and acclimatization of micropropagated shoots from mature material of hybrid larch. Plant Ce11 Tiss. Org. Cult. 44:37-44
- 10 Ritchie GA &Long AJ1986 Field performance of micropropagated Douglas fir. New Zeal. J For.Res.25:1103-1112
- 11 酒井昭 1957 木本類の耐凍性増大と糖類及び水溶性蛋白質との関係 (1) 低温科学、生物篇 15 : 17-29
- 12 酒井昭・吉田静夫 1983 植物と低温 東京大学出版会 31-44
- 13 Schenk,R.V. and Hildebrandt,A.C.1972 Medium and techniques for induction and growth of monocotyledon-ous and dicotyledonous plant cell culture. Can. J..Bot.50:199-204
- 14 Siminovitsh,D· ,B. Rheume, K. Pomeroy and M. Lepage 1968 Phospholid, protein, and nucleic acid increase in protoplasm and membrane structures associated with development of extreme freezing resistance in black

locust tree cell. Cryobiology, T:F202-225

- 15 Shimonishi, K., T. Nagai, Y. Nomura, K. Yoshioka and K. Oosawa 1995 Induction of Melon Shoot Primordia and Maintenance of Their High Regeneration Potential. Plant Tissue Culture Lett., 10(1), 17-24
- 16 笹本浜子 1998 林木における細胞・組織培養と植物ホルモン 植物の化学調節 Vo1.33, No1
- 17 Tanaka, R and Ikeda, H 1985 Perennial maintenance of annual *Haplopappus gracilis* (2n = 4) by shoot tip cloning. Jpn. J. Genet., 58:65-70
- 18 田中隆荘 1983 有用一年生植物のクローン化「種苗産業と育種新技術」シーエムシー東京 171 - 197
- 19 谷口研至 田中隆荘 1988 苗条原基利用による種苗の大量増殖法 農業および園芸 63:1279-1283
- 20 谷口研至 1990 苗条原基 植物細胞工学 2 : 249-255
- 21 Yoshida, S. and A. Sakai 1973 Phospholipid changes associated with the cold hardiness of cortical cells from poplar stem. Plant & cell Physiol., 14:353-559
- 22 Yoshida, S. 1974 Studies on lipid changes associated with frost hardiness in cortex in woody plants. Contr. Inst. Low Temp. Sci. B, 18: 1 -43

Summary

Branches were collected Dec . 1995 to Dec . 1996 from an about 25-year-old hybrid larch, *Larix gmelinii* × *L. leptolepis*. Shoot apices of these were excised and used for induction of cell clumps of multiple shoot primordia . They were cultured on SH liquid media variously supplemented with of BA and NAA by slanting rotary culture (5rpm) under condition of continuous light at 25 . Maximum formation of multiple shoot primordium was obtained in the presence of BA 0.2mg/ 1 . The higher viabilities of explants were obtained with materials collected in December to February. Shoot primordia were easily subcultured in SH liquid medium under the same conditions as initial culture at an inter-val of one week , They had continued to propagate for over 800 days . They easily developed adventitious buds on modified WP medium and some of them developed into plantlets.

The effects of age of explants were examined for formation of multiple shoot primordia and rooting of adventitious bud using shoot apices of adult trees and mature embryos of *L. gmelinii*. As multiple shoot primordium were developed from both explants , there was no reason to think that age of explant was major effect on formation of multiple shoot primordia . However , adventitious buds from shoot apices needed a longer term until rooting than that from embryos.

Key Word : *Larix gmelinii* × *L. leptolepis* , *L. gmelinii* explant , multiple shoot primordia , age , subculture term