

登録番号  
参照番号

1603

O D C 分類	1	環境因子 生物学	
	6	一般植物学	
質問内容	熱帯降雨林を対象とした育苗技術研究の基本事項 (Kwila等のPNG産有用樹の大量育苗技術の開発)		
プロジェクト	森林研究計画		
地域 : 国名	オセアニア	:	パプアニューギニア
キーワード	種子 苗畑 組織培養 Instia bijuga 発芽促進技術 苗木生産		
参考文献			
質問者	樋口国雄	回答者	石井克明

# 個別技術情報支援のための質問書

1994年1月25日

プロジェクト名: PNG森林研究

専門家名: 樋口国雄

質問技術テーマ: 熱帯降雨林を対象とした育苗技術研究の基本事項  
(Kwila等のPNG産有用樹の大量育苗技術の開発)

## 1. 質問技術テーマの具体的背景、及びそのプロジェクト活動の中での位置付け

パプアニューギニア(PNG)には約200の有用郷土樹種があり、これらの種子、苗畑技術の確立はきわめて重要である。そこでPNG森林研究PLにおいても専門家を配して研究を進めてきた。しかしながらPNGにおける有用広葉樹の開花特性の解明にはまだ相当に時間がかかる。また種子は大型・硬質のものも多く、多くの発芽促進技術が講じられているにもかかわらず発芽が不安定かつ発芽率が低い。例えば、PNGの代表的輸出用銘木、現地名Kwila(*Intsia bijuga*)は種子の直径は約3cm、重さは約3.5g、発芽率は10から47%、発芽日数は18から48日である。このような状態においては造林に必要な大量の育苗は困難であり、新技術の導入が望まれている。

## 2. 質問の具体的内容

上記の研究の困難性を打破するには組織培養等のバイオテクノロジーの技術導入が必要と考えられる。そこでPNGにおけるバイオ技術導入の可能性、必要施設、予算、人員について質問する。

## 3. 期待する回答の範囲

他の熱帯造林用樹種でのバイオテクノロジーの導入例及びこれに関する発表例。またKwila等のPNG産有用樹の大量育苗の可能性・必要施設・予算・専門家等

質問のキーワード; 熱帯、パプアニューギニア、種子、苗畑、組織培養、バイオテクノロジー、*Intsia bijuga*

希望資料名: 熱帯造林用樹種の組織培養の報告例

希望指導委員名;

熱帯降雨林を対象とした育苗技術研究の基本事項  
(Kwila等のPNG産有用樹の大量育苗技術の開発)

回答

① 他の熱帯造林用樹種でのバイテク技術の導入例

タイでチークを組織培養で年間1万本増殖育苗している。  
ブラジルではユーカリ採穂園用の幼若個体の供給に組織培養技術を用いている。  
インドネシアでは泡立て水槽を用いてフタバガキ科の水挿しを行い苗木を供給している。  
(発表例は文献参照)

② Kwila等のPNG産有用樹の大量育苗の可能性

他のマメ科樹種で、たとえばAlbizia等は組織培養ができるので、Kwilaについても組織培養の可能性を試みる価値はあるだろう。種子等の幼若組織からの培養系をまず確立することが必要だが、電気、施設、治安等を考慮すると専門家の指導で培養に適した種子を採集し、培養条件のスクリーニングを日本で行い、手法が確立したら現地で応用するのがよいだろう。組織培養と泡立て水挿し法を複合して用いれば数100倍の苗木増殖が可能となり、大量育苗の可能性がでるだろう。

③ 必要施設

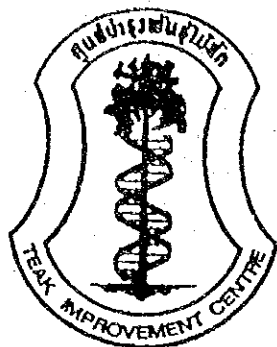
組織培養室、培地調製室、挿し木施設(ミスト装置付き)、自家発電装置、泡立て水槽(50)、照明付きインキュベーター(120)、オートクレーブ(高圧蒸気滅菌器)(80)、クリーンベンチ(120)、蒸留水製造器(80)、電子天秤(30)、乾熱滅菌器(30)

④ 予算

建物以外の機器類の合計	約 500万円 (上記括弧内の総計参照)
培地用薬品や培養フラスコ等消耗品	約 300万円
現地人件費等	約 200万円

⑤ 専門家等

培養材料の吟味等に短期の専門家の派遣が望まれる。



*Royal Forest Department*

# Teak Improvement Centre

Ngao Lampang, Thailand 52110

## Technical Paper No. 44

### Teak Tissue Culture

III: Is it appropriate ?

by

A. Kaosa-ard and P. Apavatjirut

June 1989

TEAK (*Tectona grandis*) TISSUE CULTURE : IS IT APPROPRIATE ?

by

\* \*\*  
A. Kaosa-ard, P. Apavatjirut

\* \*\*  
Royal Forest Department and Chiang Mai University

-----  
ABSTRACT

Teak tissue culture was intensively studied during the period of 1983-1988 in Thailand. The experience indicated that (a) teak can be successfully propagated by using the shoot-tip and/or nodal segment cultures; (b) the rate of shootlet production was 2-3 shoots/culture/45 days; (c) rooting of shootlets can be done easily under glasshouse conditions; (d) teak plantlets can be transplanted successfully either to plastic pots (for containerized plant production) or open nursery beds (for stump production); (e) three years after out-planting, there is no difference in morpho/phenological development between trees planted from seedlings and from tissue culture plants; (f) the cost of plant (stump) production by using the tissue culture technique is 2-3 times higher than that of the routine (genetically unimproved seed/clone) plant (stumps); (g) organo/embryogenesis of teak by means of callus and spread cells is still being observed. In this paper the mass clonal propagation of teak by means of shoot-tip/bud and nodal segment cultures are revealed.

-----  
\* Teak Improvement Centre, Ngao, Lampang,

\*\* Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai

Paper prepared for the "Regional Symposium on Recent Development in Tree Plantations of Humid/Subhumid Tropics of Asia"  
5-9 June 1989, Serdang, Selangor, Malaysia

## TECHNIQUES

A series of laboratory studies on teak tissue culture conducted by a research team from the CMU and RFD was reported regularly during the period of 1985-1988 (Apavatjarut et al, 1988; Kaosa-ard et al, 1987, 1988, Apavatjarut et al, 1987). There are three major steps in the clonal propagation of teak by means of tissue culture technique. These steps include (a) explant and starter preparations, (b) shootlet production, (c) rooting of shootlets and (d) transplanting of plantlets. The processes of these steps are as follows.

### STEP 1            EXPLANT AND STARTER PREPARATIONS :

#### Sources of Explants :

Both fruit/seed and shoot-tips of mature trees can be used as the sources of culture explants in teak tissue culture. The seed used must be from the selected or improved seed sources (e.g. plus trees, seed or breeding orchards and controlled crossing). The shoot-tips used for clonal propagation must be from superior trees and clones selected from the breeding populations.

#### Sterilization :

After collection from the donor sources, the seed and shoot-tips must be sterilized, that is to be free from microorganisms (fungi and bacteria), by chemical treatments before culturing. The process for teak seed and shoot-tips sterilization is as follows:

**Seed Sterilization :**        The healthy (white) seed are carefully extracted from the teak fruit (drupe) by cutting. The seed are then soaked and regularly shaken in the 10 % (v/v) *Chlorox* water solution for 10 minutes and immediately rinsed 3 times with distilled water. The sterilized seed are submerged in distilled water for culturing.

**Shoot-tips Sterilization :** The excised shoot-tips (about 1 cm in length) are washed and carefully dress-cut into small (about 1 cm) sizes. The prepared shoot-tips are surface sterilized by shaking in the 10-20 % (v/v) *Chlorox* water solution for 10 minutes and are rinsed with distilled water 3 times. The dead tissue are then trimmed off under aseptic/stereoscopic conditions and the tips are transferred individually to be cultured in test tubes.

At this sterilization step, it was found that there is seasonal variation in the rate of contamination of the cultured shoot-tips. That is, the contamination rate of shoot-tips collected and cultured during the sprouting or growth flushing season (April-June) is much lower (10-30 %) than those collected and cultured during the dormant season (November-March) (>50 %).

#### **Preparation of Starters :**

The surface sterilized seed are placed individually into test tubes containing the White (1963) agar culture medium (the hormone-free medium) for germination. Forty five days after germination, the sterile seedlings are sub-cultured for shoot multiplication and elongation.

Similarly, the surface sterilized shoot-tips are transferred individually to test tubes containing the T14 culture medium developed for promoting shoot growth and development of teak. The component of the T14 culture medium has been described elsewhere (Kaosa-ard et al, 1987). Forty five days after culturing, the regenerated shoots having 3-4 pairs of leaves are ready for sub-culturing and multiplication.

During the 5-year study period, it was found that there is a seasonal variation in shoot regenerating and growth potential of the cultured explants. That is, shoot-tips collected and cultured during the sprouting or growth flushing period (April - June) are much better in shoot regenerating and growth potential than those collected and cultured during the cool/dormant season (November - February).

Both germinated seedlings and regenerated shoots are at this stage called the starters which are used in the shoot multiplication and production step.

STEP 2 SHOOTLET MULTIPLICATION AND PRODUCTION :

Forty five days after seed germination and/or shoot regeneration, seedlings and shoots which are about 3-5 cm in length (height) are sub-cultured for shoot multiplication and production. They are carefully removed from test tubes. They are cut into nodal segments and shoot-tip segments (3-4 segments per seedling or per shoot). Each nodal segment contains 1 pair of leaves and axillary buds. The prepared segments are then transferred to culture in flasks or jam-bottles containing the T17 culture medium (about 30 segments per bottle). Under favorable growth conditions, the shootlets are developed the axillary buds and the shoot apex of the cultured nodal and shoot tip segments and 2-4 healthy shootlets can be obtained from a cultured segment. The developed shootlets are grown for 45-60 days, to reach the size of 4-5 cm in height, they are then removed and sub-cultured for re-multiplication in the second propagation cycle.

Based on the research scale of 50,000 shoot production, the rate of shoot multiplication and production from one starter shoot can be expressed as follow:

$$Y = 8^X$$

Y is the number of shoots to be produced from a starter shoot, 8 is the multiplication rate per shoot (4 segments/shoot and 2 shootlets/segment) and X is the propagation cycle. The estimated shoot production is shown in the following table.

Table 1 Estimated number of teak shootlets produced per propagation cycle.

Cycle No.	Days	No. Shoots
1	45- 60	8
2	90-120	64
3	135-180	512
4	180-240	4,096
5	225-300	32,768
6	270-360	262,144
7	315-420	2,097,152
8	360-480	16,777,216



For large scale production, this multiplication and production rate is greatly limited by space and time factors. The space factor includes (a) the limit of spacing in the transfer and culture room and (b) the limit of laboratory facilities for large scale production. The time factor includes (a) the increase of workload and/or man-day with progressive propagation cycles and (b) the duration (45-60 days) per propagation cycle.

### STEP 3      ROOTING OF SHOOTLETS :

To produce a complete plantlet, the shootlets are rooted. This process can be done successfully under nursery conditions.

The 45-60 days grown shootlets are removed, separated into single shoots. They are then transplanted for rooting in plastic boxes containing sterile sand. The rooting conditions must be (a) high moisture and humidity, (b) low light intensity and (c) warm and humid condition of 25-30 °C. Under such favorable conditions, the shootlets start rooting within 2 weeks and the rooting/survival percentage of the shootlets can be as high as 90-100 % (Kaosa-ard and Apavatjrut, 1988) . After rooting, they are acclimatized under normal nursery conditions for about 2 weeks before transplanted.

It was found in the rooting study that (a) for better survival, rooting and growth potential the transplanted shootlets should be greater than 3 cm in size (length), (b) the shootlets must be free from agar medium culture otherwise they will be infected by fungi and bacteria, (c) hormonal treatment of shootlets prior to rooting is not necessary, (d) under high moisture and air humidity rooting conditions, the temperature should be maintained below 30 °C to avoid the steaming effect, (e) there is no clear cut seasonal pattern in rooting ability of the transplanted shootlets. The variation in rooting pattern of the study is shown in the following figure.

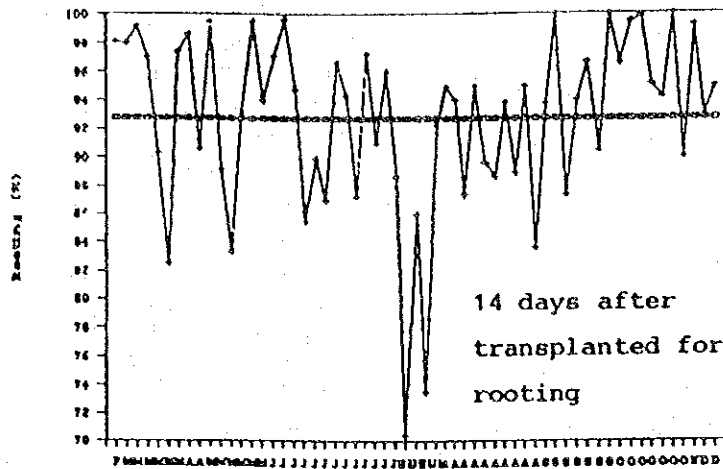


Fig.1a

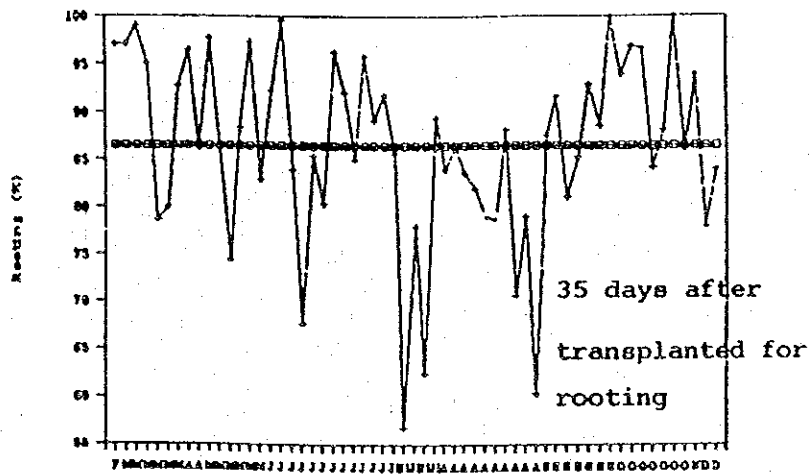


Fig.1b

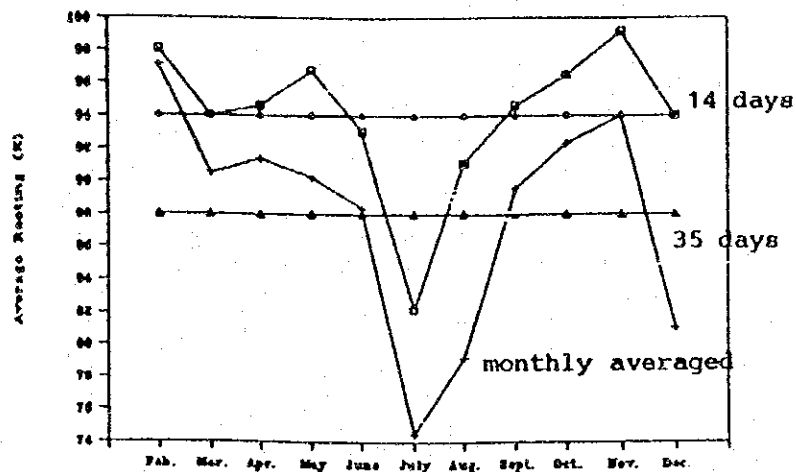


Fig.1c

February - December 1987

Figure 1 Effects of rooting dates on survival/rooting percentage of teak shootlets.

Source : Kaosa-ard and Apavatjirut (1988)

#### STEP 4            TRANSPLANTING OF PLANTLETS :

Generally, there are two types of teak planting stock in the planting method, i.e. container-grown plants (pot plants) and nursery bed-grown plants (stumps). The pot plants are used in the small scale planting programme such as private plantation, road side planting, progeny and clonal tests etc. The stumps are commonly used in the large scale planting programme. Therefore, the production of both pot plants and stumps by using tissue culture produced plantlets were tried.

##### Pot Transplanting :

Teak plantlets can be transplanted successfully into plastic bags containing a mixture of top soil. Under the shade roof and humid conditions, the survival rate of the plantlets is as high as 80-90 % when they are transplanted during the beginning of the rainy season (May-July). However, the survival rate and growth potential will be very poor (30-50 %) if they are transplanted during the dry (cool/dry and hot/dry) season in November-March. This poor rate of survival and growth potential can be improved by transplanting under the glasshouse and mist conditions. Two weeks after transplanting, they are gradually transferred to grow under open nursery conditions.

##### Nursery Bed Transplanting :

To produce stumps (the root/shoot cut plants), the tissue culture plantlets are transplanted in nursery beds. At present, the survival rate of the transplanted plantlets is still very low, about 50 %, and the technique need to be improved.

In that series of study (Kaosa-ard and Apavatjirut, 1988), 25,000 plantlets were carefully removed from the rooting medium and transplanted into nursery beds during the period of May-November 1987. The spacing used was 15 x 15 cm and the bed size was 1.0 x 40.0 m. After transplanting, the beds were shaded with cloth for 5-7 days to protect against the direct sun light and rainfall. It was found that the survival rate of the transplanted plantlets decreased progressively from May (66 %) to November (11 %) (Figure 2). Similarly, height and diameter growth of the survived plants also decreased progressively with transplanting times (Figure 3). To produce planting stock which are suitable for out-planting (>1.0 cm in diameter growth) in the following season, the transplanting of plantlets should not be later than August. There is no difference between the transplanted plants and the seedlings in their shoot/root system.

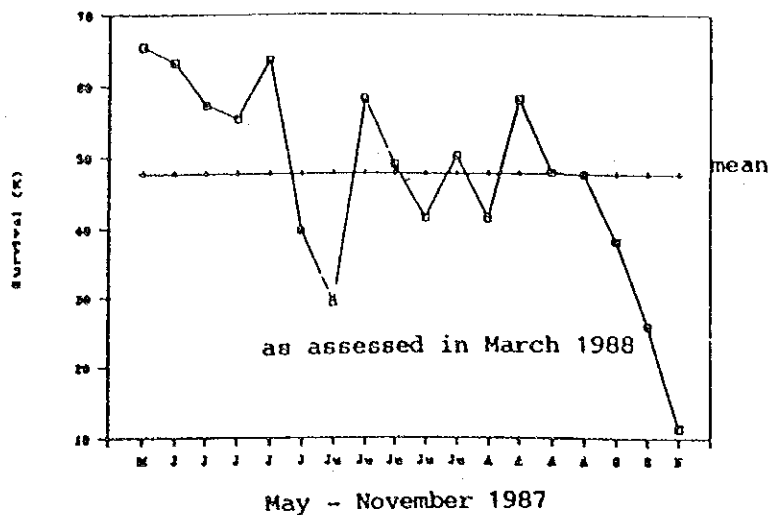


Figure 2 Effect of transplanting dates on survival percentage.

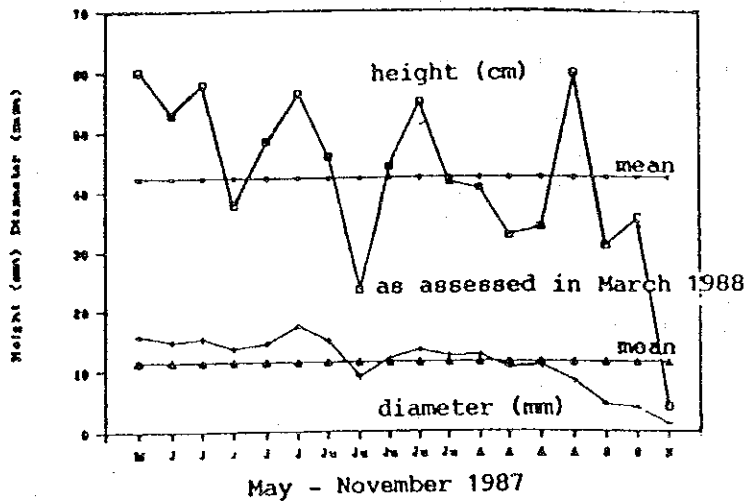


Figure 3 Effect of transplanting date on height and diameter growth of nursery grown planting stock.

Source : Kaosa-ard and Apavatjirut (1988)

Based on my previous study on transplanting techniques (Kaosa-ard, 1982), it is suggested that (a) the transplanting techniques, e.g. the bare-root-transplanting technique, shading techniques, and watering technique, are needed to be improved and (b) the most suitable time for transplanting is in May-June which is the peak of growth flushing period of teak in Thailand.

COST ESTIMATION :

A preliminary study on cost production of teak shootlets by Mingsarn Kaosa-ard (unpublished data) suggests a total unit cost of 0.781 Baht (US \$ 0.030) and 0.432 Baht (US \$ 0.017) for 1- and 2-million-lot per year, respectively. This estimation excludes the cost of rooting and transplanting. The breakdown of the estimated costs is as follows:

Table 2 Estimated costs of shoot production per year.

	Production Capacity per Year	
	1,000,000	2,000,000
-----		
	Cost per Shootlet (Baht)	
-----		
Fixed Costs :		
Office/Lab. Facilities	0.195 (25 %)	0.098 (23 %)
Administration	0.236 (30 %)	0.118 (27 %)
Subtotal	0.431 (55 %)	0.216 (50 %)
Variable Costs (Sub-culture) :		
Culture Medium	0.006 ( 1 %)	0.012 ( 3 %)
Labor	0.300 (38 %)	0.150 (34 %)
Energy	0.024 ( 3 %)	0.029 ( 7 %)
Miscellaneous	0.020 ( 3 %)	0.025 ( 6 %)
Subtotal	0.350 (45 %)	0.216 (50 %)
TOTAL	0.781(100 %)	0.432 (100 %)

25 Baht = 1 US\$

For a complete cost study, the following costs need to be estimated : (a) costs of rooting of shootlets, (b) costs of transplanting of plantlets, (c) costs of seed from the seed orchards and stumps grown from improved seed, (d) costs of stumps grown from tissue culture plantlets.

#### CONCLUSION

On the basis of our five year experience on teak tissue culture, it can be concluded at this stage as follows:

(a) Teak can be propagated successfully by using the tissue culture (the shoot-tip and nodal segment culture) technique.

(b) There are four main components in the developed technique, i.e. starter preparation, shootlet production, rooting of shootlets and transplanting of plantlets.

(c) The starters can be prepared from both seed (sterile seedlings) and shoot-tips/buds of mature trees.

(d) The rate of shootlet multiplication from a single shoot is about 8 folds in 45-60 days after subculturing.

(e) The cost of a shootlet is estimated at 0.78 and 0.43 Baht for 1- and 2-million lot respectively.

(f) The shootlets can be easily rooted under the mist conditions.

(g) The plantlets can be transplanted successfully into pots under the warm and humid conditions.

(h) The current survival rate of the nursery bed transplanted plantlets is only 60 %, the technique need to be improved.

(i) There is no difference between the nursery grown seedlings and the transplanted plants in their shoot/root system.

(j) The cost of stumps grown from the improved seed and those grown from the tissue culture plantlets is being estimated.

## REFERENCES

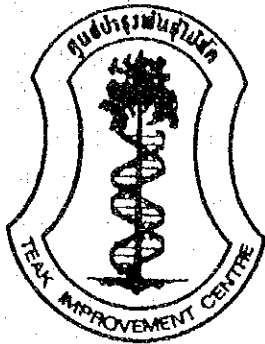
- AFOCEL 1981 Colloque International Sur Las Culture In Vitro Des Essens Foresties. Exposes Proceedings Tagungsberichte, (IUFRO meeting in France September 1981 ) Compiled by the Association Foret-Cellulose (AFOCEL)
- Apavatjirut, P., A. Kaosa-ard and K. Sombun 1985 Teak Tissue Culture : Progress Report for the MOSTE (in Thai) 36 p.
- Apavatjirut, P., A. Kaosa-ard and T. Paratasilpin 1987. Current research on teak (*Tectona grandis* Linn.f) tissue culture in Thailand. A paper presented at Symposium on the Application of Tissue Culture Techniques in Economically Important Trees. Bogor, Indonesia, December 7-9, 1987.
- Bonga, J.M., and D.J. Durzan 1982 Tissue Culture in Forestry. Forestry Science, Dr. W. Junk Publisher 420 p.
- Henke, R. K.W. Hughes, M.J. Constantin and A. Hollaender 1985 Tissue Culture in Forestry and Agriculture. Basic Life Sciences Vol 32. Plenum Press, NY 390 p.
- Kaosa-ard, A. 1982. Seasonal shoot growth in teak (*Tectona grandis* Linn.f.). Teak Improvement Centre Technical Paper No. 25.
- Kaosa-ard, A. 1986. Teak in ASEAN : A Survey Report. ASEAN/CANADA Forest Seed Centre, Muaklek, Thailand 65 pp.
- Kaosa-ard, A., P. Apavatjirut and T. Paratasilpin 1987. Teak (*Tectona grandis* Linn.f.) tissue culture. In Proceedings of His Majesty's Fifth Cycle Commemorative Conference of USAID Science Research Award Grantees, Bangkok, Thailand. p 201-206.
- Kaosa-ard, A., and P. Apavatjirut 1988 Teak (*Tectona grandis* Linn.f.) tissue culture : Rooting and transplanting techniques. Paper presented to the PSTC Conference on Biotechnology for Health and Agriculture held in Washington DC June 6-9, 1988
- NZFRI 1974 New Zealand Journal of Forestry Science Vol 4 No.2 : Special Issue on Vegetative Propagation. New Zealand Forest Research Institute, Rotorua NZ 253-279 pp.
- White, P.R. 1963. The Cultivation of Animal and Plant Cells. The Ronald Press, NY 228 pp.
-

#### ACKNOWLEDGEMENT

This research project has been supported by USAID/PSTC Grant No. 936-5542-G-00-6030-00. Chiang Mai University and the Royal Forest Department have provided facilities for this research project. The supports are highly appreciated.

---





*Royal Forest Department*

# Teak Improvement Centre

Ngao Lampang, Thailand 52110

## Technical Paper No.42

### Teak Tissue Culture

### II: Rooting/Transplanting Techniques

by

A. Kaosa-ard and P. Apavatjirut

June 1988

Teak (*Tectona grandis* Linn.f.) Tissue Culture :

Rooting and Transplanting Techniques

by

\*\*

\*\*\*

A. Kaosa-ard and P. Apavatjirut

---

ABSTRACT

Mass production of teak (*Tectona grandis* Linn. f.) shootlets by means of culturing shoot tips from mature trees and explants from *in vitro*-grown seedlings used in this study has been successfully developed and reported elsewhere.

To prepare nursery stock for plantation establishment, rooting of shootlets and nursery transplanting of the obtained rooted shootlets were intensively studied during 1987-1988.

In rooting study, 46,000 *in vitro*-produced shootlets were transplanted for rooting in sand in plastic boxes at 72 different dates during February - December 1987. By this developed rooting technique, the survival/rooting percentage was as high as 100 % with the overall average of 93 and 87 % at 14 and 35 days respectively. Survival/rooting percentage of the shootlets varied markedly with rooting dates (70-100 and 57-100 % at 14 and 35 days). There was no marked seasonal pattern on survival/rooting ability in this study. When shootlets were hormonal treated with 10 mg/l IBA, 50 mg/l IBA, 25 mg/l NAA, IBA+NAA each at 25 mg/l, Seradix No.1 and distilled water prior to rooting, no significant effects on both rooting percentage (95-100%) and number of the main roots produced (1.95-2.10 roots/shoot) were observed at 35 days after transplanting for rooting. However, more rooting percentage could be observed within 14 days and qualitative difference in rooting behaviour was also observed.

---

\*Paper prepared for the PSTC Conference on Biotechnology for Health and Agriculture held in Washington DC June 6-9, 1988.

\*\*Teak Improvement Centre (Royal Forest Department), Lampang, Thailand

\*\*\*Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand

In transplanting study, 21,345 rooted shootlets were bare root transplanted into nursery beds at 18 different dates during May - November 1987. The effects of transplanting dates, plantlet sizes and shading methods on survival and growth were observed. The overall survival of plantlets after transplanting was relatively low (43.21%). Both survival and growth performance of the transplanted plantlets decreased markedly (from 65.59 to 11.45 % for survival and 60.14 to 4.14 cm in height) with progressive transplanting dates (May-November). Sizes of plantlets as determined by number of leaf pairs appeared to have less effect on both survival and growth of the transplanted plantlets. The average survival rate of the two leaf-pair and the three leaf-pair plantlets were 49.82 and 52.78% respectively. Shading methods showed a marked effect on survival of the transplanted plantlets. The average survival under the cloth shading and the split bamboo shading methods were 63.26 and 48.21 % respectively.

---

#### INTRODUCTION

Research on teak tissue culture by means of shoot-tip culture, callus culture and anther culture have been recently conducted in Thailand. The main purposes of this series of study are to support the breeding programme and to mass clonal propagate this species for plantation development programme. For clonal propagation purpose, the culture media and techniques used for shoot-tip and explants of both sterile seedlings and mature (over 20 year-old) trees have been fully developed for teak shootlet production. The laboratory techniques for teak shootlet production by means of shoot-tip culture have been reported elsewhere (Apavatjirut, et al 1985,1987; Kaosa-ard et al 1987).

To produce nursery stock (stumps) for out-planting, the *in vitro* produced shootlets are necessarily be first treated for rooting. Subsequently, the rooted shootlets (plantlets) are transplanted to nursery beds for 6-12 months. Therefore, two more important steps and/or techniques i.e. rooting of shootlets and transplanting of plantlets, are needed to be developed.

It is well accepted that transferring of the *in vitro*-produced shootlets or plantlets to nursery conditions for rooting and/or transplanting is one of the critical points in micropropagation system through tissue culture as the *in vitro*-produced shootlets or plantlets will be abruptly transferred from the most favorable conditions for their growth and development to more severe outside conditions. This abrupt change, generally, causes low survival of the transferred materials especially when the delicate broad-leaf plants are mass-propagated.

As for teak, previous observations on rooting techniques of shootlets Kaosa-ard *et al* (1987) and Apavatjarut *et al* (1987) reported that the *in vitro*-produced shootlets (3-5 cm in length) can be rooted successfully in sterilized sand under shaded rainproof conditions. The survival/rooting percentage of the shootlets was reported as high as 90-100 % under experimental scale. For a large scale propagation programme, it is necessary to develop suitable techniques for rooting of the *in vitro*-produced shootlets and nursery transplanting of the rooted shootlets for planting stock production.

#### MATERIALS AND METHODS

**Materials :** Teak seeds and shoot-tips of mature trees used in these studies were from the seed orchards and clone bank of the Teak Improvement Centre (TIC) in Ngao, Lampang. The plant materials were cultured for shootlet production in a tissue culture laboratory at Chiang Mai University (CMU) in Chiang Mai. The rooting study was conducted in the CMU rainproof house whereas the transplanting study was conducted in the TIC teak nursery (170 km from CMU).

**Shootlet Production :** Teak seeds and shoot-tips or sprouting buds from the TIC were brought to CMU laboratory at every two weeks during the study period of 1986-1987. The explants were prepared, sterilized and *in vitro* cultured for shootlet production. The *in vitro* culture techniques for rapid shootlet multiplication of teak have been described elsewhere (Kaosa-ard *et al*, 1987; Apavatjarut *et al*, 1987)

**Rooting Study :** Preliminary observation conducted by this research team (Kaosa-ard *et al* 1987) indicated that teak shootlets can be rooted successfully in sand under shaded rainproof conditions within 30-45 days after transplanting and there is no clonal effect on rooting percentage of the transplanted shootlets.

In this study, the effects of rooting dates (rooting season) and hormonal treatments on survival/rooting percentage of the *in vitro*-produced shootlets were investigated. The previously developed rooting technique was improved and employed in this study.

Large quantity of 46,000 shootlets (about 45-day old) were transferred from *in vitro* conditions to root in sterilized sand at 72 different times (rooting dates) throughout the study period (February - December 1987). At each rooting date, the shootlets were removed from culture containers and individually separated from their clumps. The separated shootlets were washed free from culture medium and line-transplanted in plastic boxes (17x24x9 cm WxLxH) containing 3-4 cm-layer of sterilized sand for rooting. There were 100 shootlets per rooting box. After transplanting, the boxes were covered and placed on plastic trays for watering by sub-irrigation system.

In hormonal treatment study, 120 shootlets from clone V 27 were used. Their basal stem portion were quickly dipped in one of the following solutions: (1) 10 mg/l IBA; (2) 50 mg/l IBA; (3) 25 mg/l NAA; (4) 25 mg/l IBA + 25 mg/l NAA; (5) Seradix (commercial rooting powder) No.1; and (6) distilled water. There were 20 shootlets (replicates) per treatment. The treated shootlets were then transplanted for rooting in the rooting boxes.

Survival/rooting percentage for each rooting date and treatment were observed at 14 and 35 days after transplanting.

**Transplanting Study :** At 45 days after rooting, the rooting boxes were transported to the TIC, the plantlets (rooted shootlets) were acclimatized in shaded nursery for 1 week before transplanting into open-nursery beds. In this study, the effects of transplanting dates, shading methods and sizes of plantlets on survival and subsequent growth were observed.

A total of 21,345 plantlets were transplanted into nursery beds at 18 different dates throughout the study period (May - November 1987). At each transplanting date, plantlets were carefully removed from the rooting boxes, divided according to their leaf pairs into two main groups i.e. two-leaf-pair and three-leaf-pair groups. They were then separately transplanted into nursery beds at 15 x 15 cm spacing in the bed size of 1.0 x 40.0 m (WxL). After transplanting, the beds were shaded for 5-7 days by two different methods i.e. cloth shading and split bamboo shading. Watering of nursery beds was required during the short dry spell periods (in June-July). The beds were also kept free of weeds during the growing period.

Growth in terms of height and diameter of the survived plants were assessed during the dry (dormant) season in March 1988. Planting stock derived from *in vitro* cultures were lifted from nursery beds and prepared into stumps for field out-planting in May 1988.

## RESULTS AND DISCUSSIONS

### *Rooting Study:*

*Effects of Rooting Dates :* It is clear that teak shootlets from *in vitro* cultures can be acclimatized and rooted successfully by the developed rooting technique. The survival/rooting percentages were as high as 100 % with overall averages of  $92.77 \pm 0.80$  and  $86.50 \pm 1.26$  at 14 and 35 days after transplanting respectively. The results presented in Figs.1a and 1b showed that there was large variation in survival/rooting percentage of shootlets transplanted for rooting at different rooting dates. The range of survival/rooting percentages throughout the study period (Feb.- Dec. 1987) were 70 - 100 % and 57 - 100 % at 14 and 35 days, respectively. The variation was, however, not clearly to be affected by the rooting dates. When the mean monthly survival/rooting percentage was taken into account, the results presented in Fig. 1c showed that there was a marked seasonal pattern on survival/rooting of teak shootlets. The survival/rooting was relatively high during the February-June and September - November transplanting and relatively low during the July-August and December transplanting.

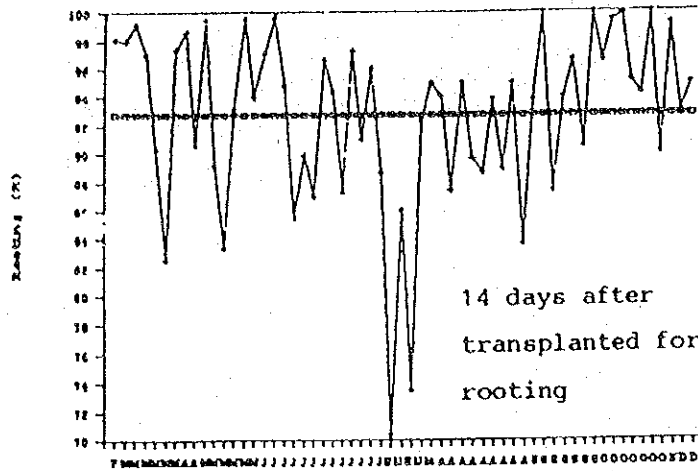


Fig.1a

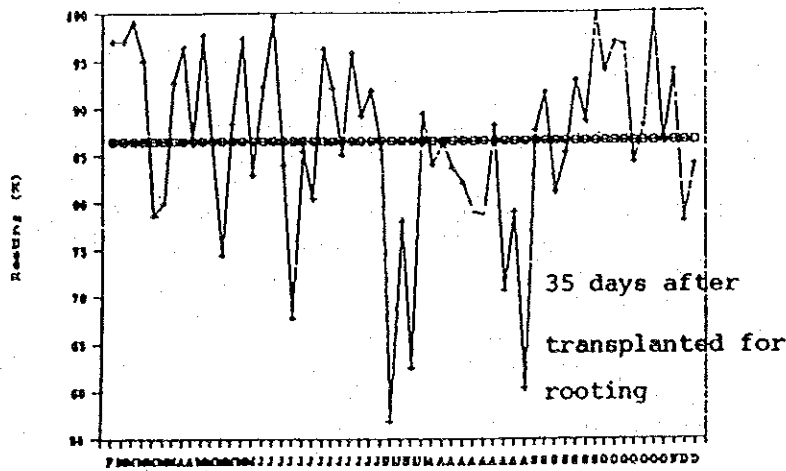


Fig.1b

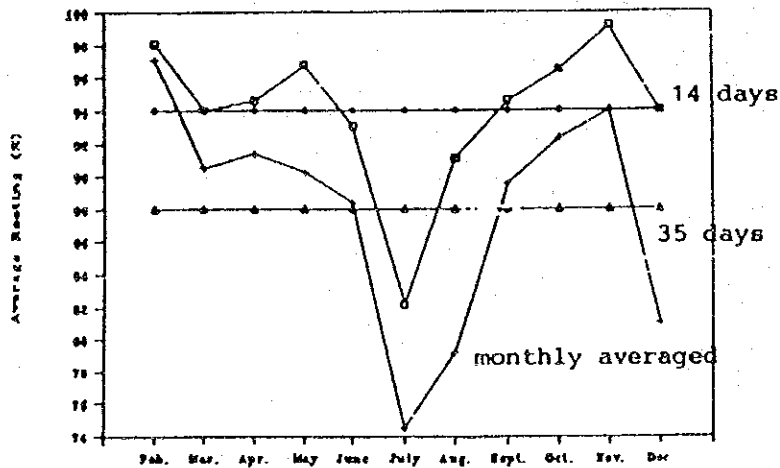


Fig.1c

February - December 1987

Figure 1 Effects of rooting dates on survival/rooting percentage of teak shootlets after transplanted for rooting.

The main causes of lowering in survival/rooting were mainly due to (1) condition of shootlets prior to rooting, (2) 'steaming' effects and (3) low rooting temperature. The condition of shootlets prior to rooting was found to be very important. It was observed that survival/rooting rates of the large (larger than 3.0 cm) and healthy shootlets were much higher (90/100 : 50/70 %) than the small and unhealthy shootlets (succulent or light coloured shootlets). 'Steaming' inside the rooting boxes often occurred during the hot-dry period was also another major causes of dying of the transplanted shootlets. The cause of such condition was due to high temperature and humidity in combination with poor ventilation inside the boxes. To avoid this problem, the rooting boxes must be opened for a few minutes more often during the hot-dry period, especially during the first week after transplanting. In this rooting study, a number of shoot lots (boxes) were attacked by fungi throughout the study period, particularly during the wet (rainy) months in July-August.

*Effects of Hormonal Treatments :* The results summarized in Table 1 showed that there were no significant differences in both rooting percentage between 95 and 100 and number of main roots per plantlet when treated with IBA, NAA, IBA+NAA, Seradix No. 1 (commercial rooting powder) or distilled water at the concentrations studied. Based on this result, it is indicated that hormonal treatment for root promoting of teak shootlets may not be necessary if there is sufficient endogenous level of rooting hormone within the cultured shootlets

Table 1 Effects of hormonal treatments on rooting of teak shootlets. (Based on 20 shootlets/treatment.)

Treatments	Days after Rooting										Total Rooted Shootlets	No. Main Roots	
	14	21	28	35	42	14	21	28	35	42			
	*	**	*	**	*	**	*	**	*	**	*	**	***
	%		%		%		%		%		%		
IBA 10mg/l	75	0	60	35	50	45	35	65	25	75	100	1.9	
IBA 50mg/l	75	0	65	20	50	50	45	55	25	75	100	1.9	
NAA 25mg/l	80	0	45	55	20	80	20	80	15	85	100	2.1	
IBA+NAA(25+25mg/l)	75	0	20	75	35	65	30	65	15	80	95	2.0	
Seradix Nol(Powder)60	0	50	35	10	90	10	90	5	90	95	95	2.1	
Distilled Water	20	0	40	25	50	35	45	55	25	75	100	2.1	

\* % of shootlets having 1 main root/shootlet

\*\* % of shootlets having more than 1 main roots/shootlet.

\*\*\* average number of main roots/shootlet.



### *Transplanting Study :*

*Effects of Transplanting Dates :* The results presented in Fig. 2a showed that transplanting of plantlets into nursery beds is still a major constraint in the production of planting stock from tissue culture technique. Generally, the survival rate of the transplanted plantlets was relatively low i.e. 11.45 - 65.59 % with an overall mean of 48.11 %. The survival rate also varied seasonally with transplanting dates/months. That was the rate of survival decreased progressively with transplanting dates/months from May - December 1987 (Figs. 2a and 2b).

Growth in terms of height and diameter of the survived plants (as measured in March 1988) also varied seasonally with transplanting dates/months (Figs. 3a and 3b). Both height and diameter decreased from May to November transplanting. The decrease in growth rate was largely due to the decrease in age. Teak planting (stump planting method) in Thailand is normally conducted in April-June and the optimal size of the plantable seedlings (one-year-old seedlings) is between 10-20 mm in diameter at the root collar level. When the plantable size of nursery stock is considered, it is suggested that transplanting of plantlets should not be later than August (Figs. 3a and 3b).

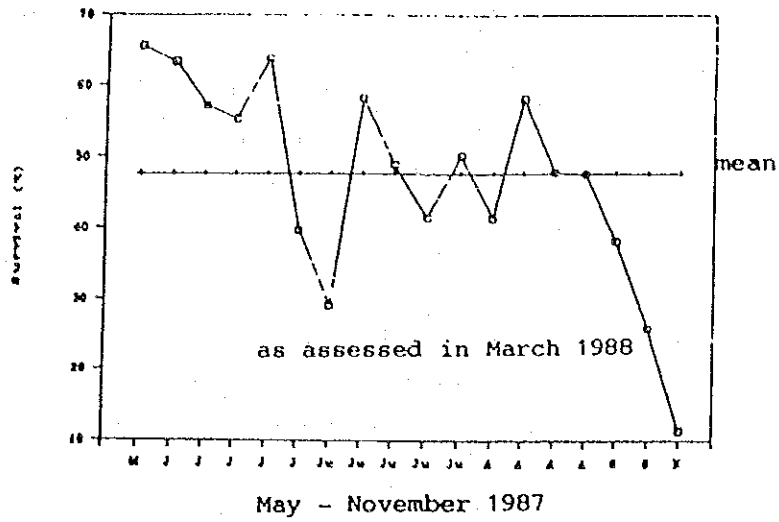


Figure 2a Effect of transplanting dates on survival percentage.

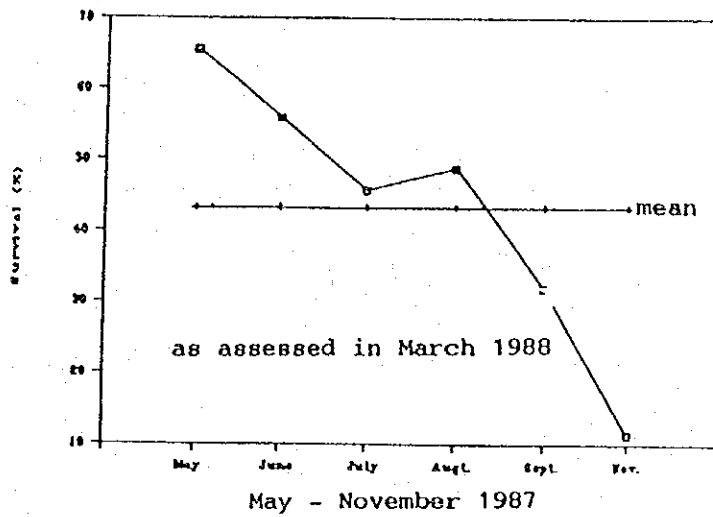


Figure 2b Effect of transplanting month on survival percentage.

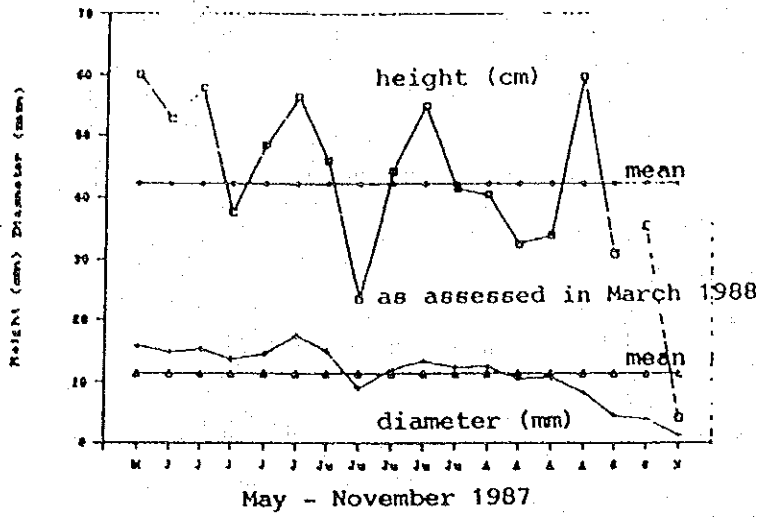


Figure 3a Effect of transplanting date on height and diameter growth of nursery grown planting stock.

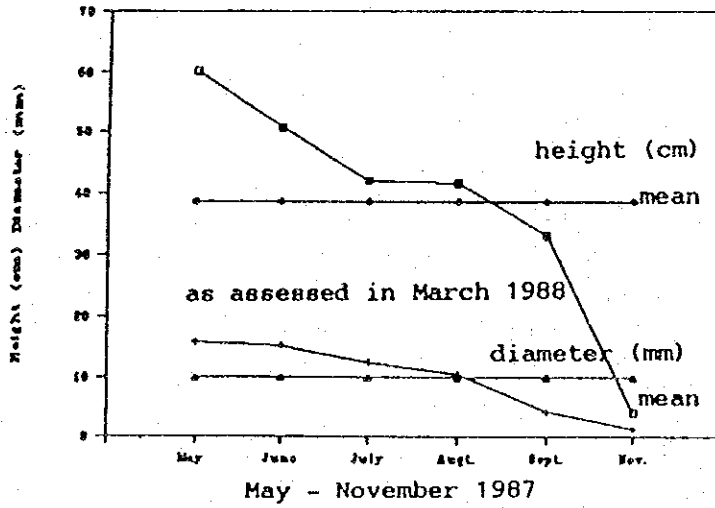


Figure 3b Effect of transplanting month on height and diameter growth of nursery grown planting stock.

*Shading Effects :* The purpose of shading of nursery beds after transplanting was to protect the transplanted plantlets from direct sun light and direct raindrop, especially during the first week after transplanting. The results given in Table 2 showed that the survival rate of shootlets under the cloth shading was significantly higher than that under the split bamboo shading (63.26 : 48.21 %). There were no differences in both height and diameter growth of the survived plants from these two shading treatments.

Table 2 Effects of shading methods on survival and growth of teak plantlets (as measured in March 1988).

Shading Methods	Number	Survival No.	Survival %	Height (cm)	Diameter (cm)
Split Bamboo	4424	2133	48.21	59.13	1.49
Cloth	3274	2071	63.26	54.04	1.56

*Effects of Plantlet Sizes :* The results summarized in Table 3 showed that there was no difference in survival rate and growth in terms of diameter between the two-leaf pair and the three-leaf pair plantlets.

Table 3 Effects of plantlet sizes on survival and growth after transplanting into nursery beds (as measured in March 1988).

Leaf Pair	Number	Survival No.	Survival %	Height (cm)	Diameter (cm)
2	10309	5187	49.82	59.03 ± 4.00	1.35
3	11030	4791	52.78	43.37 ± 11.00	1.21

Based on the results on survival and growth performances of the transplanted shootlets presented above it is indicated that May-June (the beginning of the rainy season) seems to be the most suitable period for transplanting of teak shootlets. This time of the year is also the peak of growth flushing period of teak in Thailand (Kaosa-ard, 1982). Immediately after transplanting into nursery beds, the beds should be shaded at least for 1 week by using the cloth shading method. More studies on transplanting techniques of teak plantlets for large scale nursery production are needed to be improved for both survival and growth rates of the field transplanted plantlets.

#### REFERENCES

- Apavatjirut, P., A. Kaosa-ard and K. Sombun 1985. Teak Tissue Culture. Report for MOSTE Research and Development (in Thai).
- Apavatjirut, P., A. Kaosa-ard and T. Paratasilpin 1987. Current research on teak (*Tectona grandis* Linn.f.) tissue culture in Thailand. A paper presented at Symposium on the Application of Tissue Culture Techniques in Economically Important Trees. Bogor, Indonesia, December 7-9, 1987.
- Kaosa-ard, A. 1982. Seasonal shoot growth in teak (*Tectona grandis* Linn.f.). Teak Improvement Centre Technical Paper No. 25.
- Kaosa-ard, A., P. Apavatjirut and T. Paratasilpin 1987. Teak (*Tectona grandis* Linn.f.) tissue culture. In Proceedings of His Majesty's Fifth Cycle Commemorative Conference of USAID Science Research Award Grantees, Bangkok, Thailand. p 201-206.

---

#### ACKNOWLEDGEMENT

This research project has been supported by USAID/PSTC Grant No. 936-5542-G-00-6030-00. Chiang Mai University and the Royal Forest Department have provided facilities for this research project. The supports are highly appreciated.

---

# BIO-REFOR

*BIOTEchnology assisted REFORestation project*

[バイオ-リ・フォル]  
熱帯林再生研究者連合

## PROCEEDINGS OF TSUKUBA-WORKSHOP

MAY 19-21 1992 TSUKUBA SCIENCE CITY



BIO-REFOR   
IUFRO/SPDC



EARTH YEAR '92

# RESEARCH APPROACHES FOR THE PRODUCTION OF DIPTEROCARP PLANTING STOCK DEVELOPED AT THE WANARISSET RESEARCH STATION

by

Fraiture, A.C. de, Smits, W.T.M. and D. Leppe<sup>1</sup>

## Introduction

The tropical rainforest in Kalimantan consists for an important part of *Dipterocarpaceae*, which can make up some 80 % of the tree population with dbh over 50 cm. Timber of this family, known as meranti, makes up 25 to 30 % of the tropical hardwood timber trade (Ashton, 1980).

Because of various well known reasons a significant decline in forest area has taken place over the last decades. (FAO forestry studies). Besides, enrichment planting in the framework of TPTI (the Indonesian selective felling system) is part of the compulsory silvicultural system to be practised by all concessions after logging to improve the remaining forest stand. For these enrichment plantings and the rehabilitation of degraded lands a considerable amount of Dipterocarp planting stock is needed.

The possibility to produce planting stock from seed on a regular basis is limited. Species of this family flower only once every three to five years some species even more seldom, thus seed production is not reliable. Moreover, the seeds produced remain viable for only a few weeks (Smits et al, 1987).

Much work has been done on vegetative propagation of Dipterocarps and this technique seems to be the best way to overcome above mentioned difficulties (Smits, 1983a). Although big progress is made, there is still a need for further research. Since 1985, research on this topic has been executed at the Wanariset, a research field station of the AFRD (Agency for Forestry Research and Development) in East Kalimantan under a cooperative project between the Ministry of Forestry and the Dutch Agricultural University. In 1987, a new cooperative project started, called the Tropenbos-Kalimantan project (see leaflet). This paper explains the research approaches which have been used and are still used.

## 1. Research approach

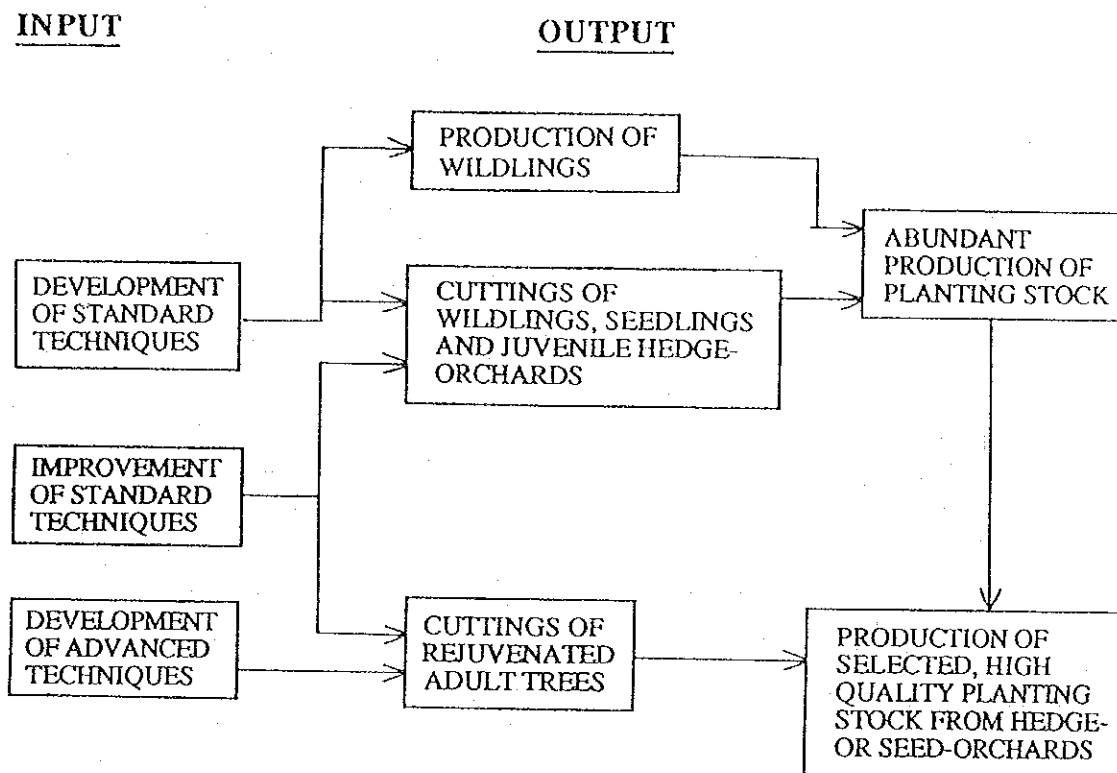
Our research strategy consist of three approaches. The choice of these approaches is based on a practical aspect/basic principle: juvenility. The juvenile or ontogenetic young parts of the plant are not yet fully differentiated and contain the complete set of genetic information of the motherplant (Hartmann et al., 1990; Leppe and Smits, 1988). Juvenile parts still have a strong regeneration capacity, in contrast with the adult parts of the plant. For Dipterocarps, juvenility is crucial for successful vegetative propagation. Cuttings taken from Dipterocarp-trees older than 5 years are extremely difficult to root.

The main aim of our research is to develop practical methods for the production of large amounts of Dipterocarp planting stock of high genetic quality and at low costs.

---

<sup>1</sup>Researchers of the Propagation and Stand Establishment group at the TROPENBOS-Kalimantan project, Wanariset I Samboja, East-kalimantan, Indonesia.

## SCHEME 1. RESEARCH APPROACHES



### 1.1. Development and quick dissemination of the standard techniques

In view of the above mentioned needs there is an urgent need for action to provide methods for planting stock production of Dipterocarps to be used in various planting and rehabilitation schemes. Even if it is not yet fully possible to control the genetic quality of the planting stock, there is an pressing need to disseminate the already available techniques. So far, two different techniques have been developed and disseminated in Indonesia.

The first technique involves the production of wildlings which is now widely most used for the plantations and enrichment plantings of Dipterocarps in East-Kalimantan (e.g. by Inhutani, ITCI, Kiani Lestari and many others (Smits and Leppe, 1991)). The method consists of the collection of seedlings from the natural forest by pulling them out of the soil. This should be done after heavy rainfall in order to decrease the amount of damaged roots and mycorrhizae (Marx and Hatchell, 1986). In the nursery these wildlings are first given an adaption period under high humidity and afterwards hardened off. The disadvantage of this method is that it still depends on the mast-flowering of the mothertrees, although less than is the case when using seeds. The collection of too old wildlings diminishes the survival percentages in the nursery and the growth in the field at least for a number of Dipterocarp species. The technique proved to be technically feasible and economical cost efficient and further research involves mainly optimization of the present standard techniques. These research activities will be discussed elsewhere.

The second technique is the production of cuttings from juvenile material. For this cuttings



are taken from wildlings, seedlings and older rooted cuttings, either directly or after growth and treatment in hedge-orchards younger than 5 years.

TABLE 1. List of priority species

1. <i>Shorea pauciflora</i>	11. <i>Shorea macrophylla</i>
2. <i>Shorea parvifolia</i>	12. <i>Shorea pachyphylla</i>
3. <i>Shorea leprosula</i>	13. <i>Shorea dasyphylla</i>
4. <i>Shorea seminis</i>	14. <i>Shorea faguetiana</i>
5. <i>Shorea johorensis</i>	15. <i>Dryobalanops keithii</i>
6. <i>Shorea smithiana</i>	16. <i>Anisoptera costata</i>
7. <i>Shorea ovalis</i>	17. <i>Shorea selanica</i>
8. <i>Shorea stenoptera</i>	18. <i>Shorea platyclados</i>
9. <i>Shorea polyandra</i>	19. <i>Shorea albida</i>
10. <i>Dryobalanops lanceolata</i>	20. <i>Anisoptera marginata</i>

For most of the 20 priority Dipterocarp species (see table 1) practical aspects of cutting production has been assessed. Cuttings are best taken in the morning and before three o'clock in the afternoon in order to reach best results (Siagan, 1990). Cuttings should be taken of orthotropic shoots with two internodes and three leaves. The leaf surface is generally reduced to improve results. The basal end of the cutting should contain a node. The cuttings are treated with rooting hormone before they are placed in the 'bubble baths', i.e. water tanks aerated by a small compressor and covered to keep air humidity and light intensity on a good level. Rooting occurs usually after 6 weeks, but depends on the species and the age of the material used.

Cuttings can also be put in solid media like vermiculite or washed river sand.

After rooting the cuttings are transplanted to polybags and inoculated e.g. by using topsoil taken from around the mothertree. The pots are put under high humidity conditions for 4 to 6 weeks in order to reduce the transplanting shock. After this period the plants are hardened off and raised in the nursery until they are big enough to plant in the field (for our situation about 30 cm high).

Hedge-orchards are established to ensure continuous supply of large amounts of orthotropic vegetative shoot material. The number of shoots that can be harvested depends upon the condition of the mother plants and the species of Dipterocarp (Smits et al., 1990).

Since 1987 several courses on the collection of wildlings, seedling identification and cuttings techniques have been given to field workers. A series of booklets in the form of instruction manuals have been published in the Indonesian language (Yasman and Smits, 1986; Leppe and Smits, 1988; Smits, 1986a; Smits et al., 1988). A large training nursery has been established at the Wanariset research station under a cooperative project between AFRD and APHI (Association of Indonesian concession holders). The state forestry enterprise INHUTANI I was the first to use Dipterocarp cuttings on a large scale. Other concession holders are following now.

## 1.2 Improvement of the standard techniques

In order to make the production of *Dipterocarp* planting stock more efficient (larger amounts at low costs), research executed concentrates on improvement the standard techniques. Only juvenile cutting material is used. Experiments on a small scale are first established in the greenhouse. The most promising results are then tested on a larger scale in the training and research nursery. Special attention is paid to the efficiency of the improved techniques and cost prices. A large number of parameters are monitored and put in a nursery cost-comparison-model, which has been developed at the station.

Research topics include :

### 1. The physical influences of rooting ability of cuttings of *Dipterocarpaceae*

In this topic the physical properties of the rooting media and rooting environment are studied. It concerns the parameters light, humidity, temperature, aeration and pH. Data on air humidity and temperatures are collected. Air humidity around the cuttings needs to be higher than 90 % and temperatures should be between 20 and 30 °C. Research on the pH of the media and light intensity are still ongoing. The factor light is a very complicated one. Photosynthesis, and thus the endogenous level of carbohydrates, depends on the irradiance level but also on the quality of the light (Hartmann et al., 1990).

### 2. The influence of rooting promoting substances in *Dipterocarpaceae*

Rooting ability depends on the endogenous levels of hormones, nutrients, and carbohydrates. The carbohydrate level of cuttings concerns two levels : the initial stock plant carbohydrate content, which depends amongst others on the stock plant manipulation (see topic 3 and 4), and the carbohydrates produced by photosynthesis during the rooting process. In the past the weight of the cutting has been used as the main parameter for the initial carbohydrate content because of lack of chemical analysis (Fraiture, in press). With upgraded facilities in the very near future, research will now be extended and intensified.

A lot of research has been done on the application methods and optimal concentrations of rooting hormones (auxins). For several *Dipterocarp* species recommendations are given in the booklets (Yasman and Smits, 1987). Additional data from large scale trials are continuously being collected in the training nursery for incorporation in the nursery cost comparison model.

For some difficult-to-root species wounding of the cuttings and the use of hormones mixed with fungicides (Rootone F) are studied. Preliminary results indicate promising outcome for further practical application.

### 3. Topophysical influences of importance for propagation of *Dipterocarpaceae*

Growth habits of seedlings and hedge-orchards are studied. Cuttings are taken from different topophysical positions and differences in rooting ability are assessed. The optimal cutting size, the influence of the presence of basal and top buds, and the optimal leaf surface for the cuttings are determined. An important point is the quality of the formed roots. Not only number and length of the roots but also the root morphology are studied.

As mentioned earlier hedge-orchards can be manipulated in different ways in order to increase the rooting ability. Research related to this involves amongst others the fertilization of the hedge-orchards. Relations are made with the internodal length, the cutting size, leaf area surface, etc..

### 4. Architectural growth habit of *Dipterocarp*.

*Dipterocarps* form orthotropic stems and plagiotropic branches. Cuttings taken from plagiotropic branches will not develop into tree. Stockplants should therefore be pruned to induce orthotropic shoots. These orthotropic shoots also called proleptic reiterations are often more suitable to root (Smits, 1986b). Different techniques are used and compared. Reiterations from the main stem are compared with reiteration from the branches. Branches

are bent to increase the number of shoots. For this bending wire-netting can be used. For all the different techniques the rooting ability of the cuttings is checked.

### 5. Nursery techniques

After rooting the cuttings are transplanted to solid medium in polybags. Inoculation of the rooted cuttings with mycorrhizae is necessary for the survival of the plants. Lots of experiments have been installed to study this aspect in relation to potting mixture, light intensity and humidity.

As the practical application is the final aim of our research, the economic feasibility of the results are studied. The establishment of a large database to serve as the basis for computermodels is an important part of this part of our work.

### 1.3. Advanced techniques : selection and rejuvenation

In the first two steps of our strategy the production of a large amount of planting stock at low costs is being studied. The final and just as important step in our strategy is to produce planting stock of high genetic quality. To achieve this goal a selection is made of the best growing trees of the most important Dipterocarp species from the permanent growth-and-yield and soil-and-site plots which form part of the same research within the TROPENBOS-Kalimantan project. In principle we try to concentrate on those genotypes that have proven to perform well at a broad spectrum of growth sites. Clones of these genotypes can either be planted in seed-orchards or hedge-orchards. The seeds or shoots provided by these orchards will provide us the high quality Dipterocarp planting stock. This initial material can then be distributed to other locations for further multiplication and large scale planting. Smits (1983b) indicated that risks of genetic impoverishment may be less with *Dipterocarpaceae* than other groups of trees.

The following research topics are included :

#### 1. Architectural growth habit of Dipterocarp

The architecture of adult Dipterocarp trees is studied. Special attention is paid to natural rejuvenation.

#### 2. Rejuvenation techniques in *Dipterocarpaceae*

This topic will be the dominant field of research for the near future, and is amongst others part of an ongoing PhD study by one of our researchers. Rejuvenation techniques on adult trees can be mechanically induced, chemically induced or both at the same time (Evers, 1991). Mechanically induced rejuvenation consists of stem- and branch-sectioning, stem- and branch-pruning and girdling. With chemical induction we can try to influence the growth habit : plagiotropic or orthotropic. This has been tried by various ways of applying hormones like GA3/7, BAP, various auxines as well as their mixtures.

The young shoots or shoots resulting from pruning certain branches in the crowns of adult trees are multiplied by using different techniques (see figure 1). Air-layering proved feasible with a number of species, e.g. *Shorea lamellata*, *Shorea ovalis*, *Shorea laevis*, *Dipterocarpus confertus*. This technique is laborious and results in less favorable root system development of the produced plants (Smits, 1987). The material is consequently treated further in the green house to obtain rejuvenated shoots. Grafting is difficult, because of the resin production, but an adapted split graft technique specially developed proves satisfactory for most of the members of the genus *Shorea*.

#### 3. Biotechnology, tissue culture

The main problem for tissue culture is the disinfection of the vegetative material. Both endogenous as exogenous infections are frequent (see also Smits and Struycken, 1983). Motherplants are protected in order to produce clean top shoots. The use of antibiotics in the media is also tried. Somatic embryogenesis will be tested soon.

#### 4. Influence of genotype and physiological age on rooting of Dipterocarpaceae

The differences in rooting percentages between various clones of same juvenility are tested and compared. The growth of the faster rooting clones is also compared with slower rooting ones after outplanting in the field. Large amounts of material have been prepared for this purpose.

## 2. Conclusion

We can conclude that much progress has been made in recent years. This progress in the practical research has already lead to large scale application of Dipterocarp planting in Indonesia. A workshop is planned for November 1992 to show other countries in how far the research results have been applied in a technical and economical feasible way.

Although much has been reached recently there is still a big challenge ahead for the realization of clonal propagation of superior quality material. The research on rejuvenation will not only be important for Dipterocarps but will have wider application as well.

Indonesia is now preparing the establishment of PPPD (Pusat Penelitian dan Pengembangan Dipterocarpaceae) which will be an (international) Dipterocarp research center. It is anticipated that this institute will perform an important role in bringing together all present know-how on Dipterocarp propagation besides all other aspects like silviculture up to harvesting techniques for Dipterocarps.

At the moment many institutions are working on or are planning work on Dipterocarp propagation. It is hoped that this workshop will be a good start for more cooperation between the various institutions.

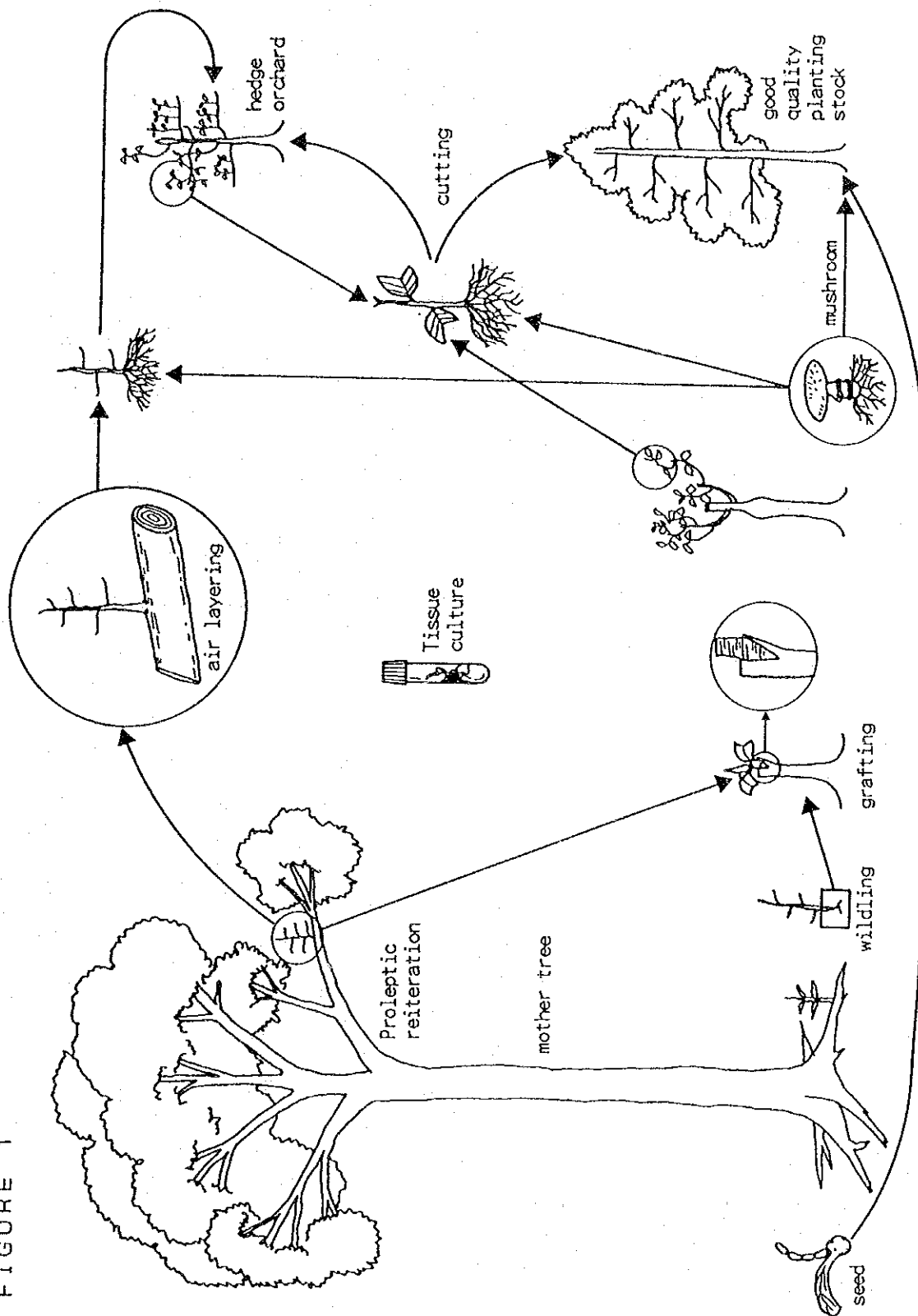
## 3. Literature

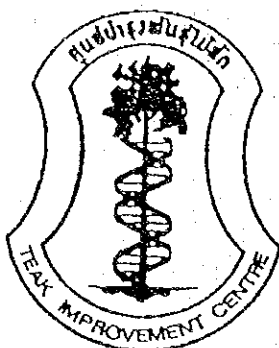
1. Ashton, P.S. (1980). The biological and ecological basis for the utilization of dipterocarps. *Bio-Indonesia* 7: 43-53. (Proc. 8th World Forestry Congress. No. FQL/26-16).
2. Evers, P., (1991), Priority program biotechnology associated with site characteristics. Unpublished. 23 pp.
3. Fraiture, A.C. de, (in press), Influence of the weight of cuttings from *Shorea leprosula* hedge-orchards on the rooting percentage. Tropenbos technical report.
4. Hartmann, H.T., Kester, D.E. and Davies, F.T. (1990). Plant propagation, principles and practices. Fifth edition, Prentice-Hall Int.
5. Leppe, D. and W.T.M. Smits (1988). Petunjuk pembuatan kebun pangkas Dipterocarpaceae. Edisi Khusus Balai Penelitian Kehutanan Samarinda No. 4. 36 pp.
6. Marx, D.H. and Hatchell, G.E. (1986). Root stripping of ectomycorrhizae decreases field performance of loblolly and longleaf pine seedlings. *South. J. Appl. For.* 10: 173-179.
7. Siagian, T. (1991). Pengaruh waktu pemotongan bahan terhadap kecepatan perakaran *S.parvifolia*. FRI Bulletin.
8. Smits, W.T.M. (1983a). Vegetative propagation of *Shorea cf. obtusa* and *Agathis danmara* by means of leaf-cuttings and stem-cuttings *The Malaysian forester* vol 26 no. 2, 175-185.
9. Smits, W.T.M. (1983b). Dipterocarps and mycorrhiza, an ecological adaptation and a factor in forest regeneration. *Flora Malesiana Bulletin* 36: 3926-3937
10. Smits, W.T.M. (1986a). Pedoman sistem cabutan bibit Dipterocarpaceae. Edisi khusus

no. 2, AFRD, Samarinda

11. Smits, W.T.M. (1986b). Vegetative propagation and possibilities for its use with *Dipterocarpaceae*. Diskusi Terbatas Beberapa aspek pembangunan hutan, Pt. Inhutani I.
12. Smits, W.T.M. (1987). Forestry research activities at the Wanariset I Samboja. Proceedings of the second international Tropenbos seminar, Amsterdam.
13. Smits, W.T.M. and struycken, B. (1983), Some preliminary results of experiments with in-vitro culture of Dipterocarps. *Netherlands Journal of Agricultural Science*, 31, 233-238.
14. Smits, W.T.M., R.A.A. Oldeman and T. Limonard (1987). Mycorrhizae and Dipterocarpaceae in East-Kalimantan rain forests. WOTRO-report for the year 1986. p. 67-78.
15. Smits, W.T.M., Leppe, D. and Noor, M., 1988, Metode inokulasi untuk persemaian Dipterocarpaceae. Edisi khusus no. 5, AFRD, Samarinda.
16. Smits, W.T.M., Yasman, I., Leppe, D. and Noor, M., 1990, Summary of the results concerning vegetative propagation of Dipterocarpaceae in Kalimantan/Indonesia. In : Breeding of tropical trees : Population structure and genetic improvement strategies in clonal and seedling forestry. Proceedings of IUFRO conference in Thailand.
17. Smits, W.T.M. and D. Leppe (1991). Prospek penanaman Jenis Pohon Dipterocarpaceae melalui peranan kerjasama penelitian dan pengembangan. *Rimba Indonesia*, Vol. XXV No. 1-2, pp. 50-52.
18. Yasman, I and Smits, W.T.M., 1986, Metoda pembuatan stek Dipterocarpaceae. Edisi khusus no. 3, AFRD, Samarinda.

FIGURE 1





*Royal Forest Department*

# Teak Improvement Centre

Ngao Lampang, Thailand 52110

## Technical Paper No.41

### Teak Tissue Culture

#### I : Laboratory Techniques

by

A. Kaosa-ard, P. Apavatjirut

and

T. Paratasilpin

July 1987





1.

## INTRODUCTION

At present, the remaining teak natural forest area and the total teak planting area in Thailand are 25, 000 sq. km and 133,000 ha, respectively (Kaosa-ard, 1986). To accelerate the planting programme, the Teak Improvement Centre (TIC) was set up by the Royal Forest Department (RFD) in 1965. The objectives are to operate the breeding programme, to produce genetically improved seed for the planting programme and to conduct research supporting the improvement and planting programme of this species.

Due to the low production of improved seed in the seed orchards in combination with the poor germination behaviour of the seed, the supply of seed and planting stumps for the large scale planting programme is insufficient. Various propagation techniques, e.g. cuttings and tissue culture, of this species have, then, been explored.

A series of studies on teak tissue culture in Thailand was first conducted in 1983-1985 by a research team from the RFD and the Chiang Mai University (CMU) (Kaosa-ard, Apavatjirut and Sombun, 1985). It is indicated that there is a high potential for developing techniques of tissue culture of this species for mass propagation. The scope of the project has been enlarged with the support of the USAID/PSTC programme for 3 years (May 1986-April 1989). The research team of this extended project consists of researchers from the TIC, the Faculty of Agriculture CMU and the faculty of Science CMU.

2.

## OBJECTIVES

1. To develop tissue culture techniques of teak for commercial mass propagation.
2. To develop techniques of callus and anther cultures for the improvement programme.
3. To observe field performance of plants derived from the developed culture techniques.
4. To estimate cost of production of planting stumps from the developed methods as compared with the conventional methods when the improved materials (seed and clones) are used.

### 3.

#### MATERIALS

3.1 *Plant Materials* : Teak fruit, shoot-tips/buds, and flower buds, used in this research project were the genetically improved materials from the TIC, Ngao , Lampang.

3.2 *Laboratories* : Laboratory studies were conducted at the Faculty of Agriculture and the Faculty of Science (CMU).

3.3 *Nursery* : Nursery operation for plant production and field testing were conducted at the TIC.

### 4.

#### METHODS

There are four main components in this series of studies. These components include :

1. *in vitro* culture of seed;
2. *in vitro* culture of shoot-tips/buds of mature trees;
3. *in vitro* culture of callus;
4. *in vitro* culture of anther.

#### 4.1 *In Vitro Culture of Seed* :

Teak fruit from TIC seed orchards were cut. Their white seed were removed. The seed were sterilized by shaking in the 10 % (v/v) *chlorox* solution for 10 minutes and rinsed 3 times with distilled water. The treated seed were placed individually into test tubes containing the White (1963) culture medium (without hormone) for germination.

After germination, the sterile seedlings (3-5 cm in height) were removed, cut into nodal segments and transferred to culture in flasks containing various tested culture media for promoting axillary shoot regeneration. 4.2 *In Vitro Culture of Shoot-tips/Buds* :

Shoot-tips and buds (about 5 cm in length) of mature trees (22-year-old) were taken from the TIC clone bank at monthly intervals. They were placed in ice boxes and transported (about 150 km) to the laboratory.

In the laboratory, the shoot-tips/buds were washed, shaped into small (1 cm) pieces and sterilized by shaking in the 10-20 % (v/v) *chlorox* solution for 10 minutes and rinsed 3 times. They were, then, trimmed into 0.5 cm pieces and transferred singly to culture in test tubes containing culture media for promoting shoot growth and development. After shooting, the shootlets (3-5 cm in height) were removed, cut into nodal segments and cultured for shoot multiplication in the freshly prepared culture media.

#### 4.3 *In Vitro Culture of Callus :*

Basal callus from the cultured explants in 4.1 and 4.2 were trimmed and used as callus sources for the study. The prepared callus were sub-cultured for their growth and development in various modified culture media under different environmental conditions, e.g. light and temperature combination.

#### 4.4 *In Vitro Culture of Anther :*

Teak flower inflorescences were taken from the TIC breeding orchard and kept in plastic bags in ice boxes for transportation to the CMU. The flower buds of different sizes or developmental stages were histologically studied for their anther development. The suitable buds for the anther culture study were selected, shaken in the 10 % (v/v) *chlorox* solution for 10 minutes and rinsed 3 times. They were, then, dissected and their anthers were transferred to culture in the tested culture media for promoting their growth and development.

## 5.

## RESULTS

5.1 *In Vitro Culture of Seed :*

Teak seed can be sterilized safely by using the technique described in 4.1. After culturing, the seed start germinating within 2 weeks.

After germination (about 45 days), seedlings of size 3-5 cm in height or with 3-4 pairs of leaves appear to be the most suitable size for nodal segment cultures.

The culture medium which is most suitable for axillary shoot regeneration and multiplication of teak nodal segments culture is the T17 medium. The composition of the developed T17 culture medium is as follows:

## Composition of the T17 Culture Medium

1/2 SH Macronutrients (Schenk and Hildebrandt, 1972)  
MS Micronutrients and Iron (Murashige and Skoog 1962)

<i>Organic Components</i>		
Glycine	2.0	mg/l
Nicotinic Acid	0.25	"
Pyridoxine HCl	0.25	"
Thiamine HCl	0.25	"
<i>Hormones</i>		
IBA	0.3	"
BAP	1.0	"
Sucrose	30.0	g/l
Agar	10.0	"
pH	5.7-5.8	

Under favorable growth conditions, the multiplication rate and cycle is about 2-4 shootlets/cultured explant/ 45 days. That is, the regenerated shootlets can be removed for re-multiplication or for rooting about 45 days after culturing.

To remultiply, the removed shootlets are cut into nodal segments and transferred to culture in the freshly prepared T17 culture medium.

To produce plantlets, the shootlets of size >3.0 cm in length which are the most suitable size for rooting are selected. Culture medium must be thoroughly removed from shootlets through rinsing. They are line-planted in plastic containers covered with lids. The sterile fine sand is used as the rooting medium. During the rooting period (2-3 weeks), the moisture and humidity inside the containers are kept at near saturating point. The light intensity must be low or under heavy shading condition. The temperature is 25-30 C. The planted shootlets must be shortly (3-5 minutes) ventilated 3 times a day. Under these suitable conditions, the shootlets will regenerate their roots within 3 weeks. The rooting percentage can be as high as 90-100 %. After rooting, the containers are transferred to the warm and humid conditions (in glasshouse) for 2 weeks for further growth and development of plantlets before they are transplanted in soil.

## 5.2 *In Vitro Culture of Shoot-tips/Buds :*

The results obtained in this series study can be summarized as follows:

***Sterilization Techniques :*** There is a marked seasonal variation in contamination rate of cultured explants. With the 10 % (v/v) *chlorox* solution for 10 minutes, the lowest (10-30 %) contamination rate is in the shoot/bud sprouting season (April-June) whereas the highest (80-100 %) is in the shoot/bud dormant season (November-March). During the dormant season, the contamination rate can be slightly improved by sterilizing explants with the 20 % (v/v) *chlorox* solution for 10-20 minutes or with the 0.1 % (w/v) *mercuric chloride* solution for 10-20 minutes. The high contamination rate during this period is mainly due to the embeded microorganism in the shoot/bud tissue.

***Culture Medium for Shoot Growth :*** The culture medium suitable for shoot growth and development of cultured shoot-tips/buds from mature trees is also the T17 medium as mentioned in 5.1.

***Shoot Growth and Development :*** There are marked seasonal and clonal variations in growth and development of cultured explants (shoot-tips/buds). Explants excised during the sprouting season (April-June) have a higher shooting potential than those excised during the dormant season (November-March). By contrast, the

basal callus of the cultured dormant explants is much larger than that of the cultured sprouting explants. Within culture season, the rate of shoot and basal callus development in cultured explants also varies from clone to clone. More study is required to clarify the degree of clonal variation.

*Multiplication* : The shoots (about 5 cm in height) are removed, cut into nodal segments and transferred to culture for axillary shoot multiplication in the freshly prepared T17 culture medium. The culture procedures for shootlet production are similar to those mentioned in 5.1.

*Plantlet Production* : About 45 days after subculture, the shootlets are removed, individually separated from their cultured explants and rooted under the developed conditions in 5.1.

*Nursery Lining* : The plantlets (>3.0 cm in height) can be line-transplanted in nursery beds safely for future planting stump production. Under the observed conditions in May-June (1987) it was found that the survival rate of the transplanted plantlets was as high as 80 % (i.e. transplanting during the raining period and the beds were shaded with cloth and/or split bamboo. Growth and development of the transplanted plantlets are being observed.

### 5.3 *In Vitro Culture of Callus* :

Basal callus derived from cultured explants in 5.1 and 5.2 are multiplied in the modified T17 culture medium (IBA deleted and BAP added up to 6 mg/l) and placed under continuous light supplied. The multiplied callus are being cultured and treated for morpho/embryogeneses.

### 5.4 *In Vitro Culture of Anther* :

*Flower Buds Selection* : The result of histological study indicated that the suitable flower buds of which their yellow/jelly anthers contain the uninucleate microspores, are the 1.5-2.0 mm-diameter buds. The smaller buds usually contain green/jelly anthers in which the sporocytes are in the meiosis stage, whereas the anthers of the bigger buds are usually yellow/dense and contain the binucleate pollen grains. The flower buds can be stored safely for 3-5 days in the refrigerator before being used as sources of explants for anther culture.

*Sterilization* : The selected flower buds can be sterilized safely (> 65 %) with the 10 % (v/v) *chlorox* solution for 1 minutes and rinsed for 3 times with distilled water.

*Culture Medium* : There are four types of modified media which are found to be suitable for promoting pollen growth and callus formation of the cultured anthers. These culture media are as follows:

Compositions of culture media suitable for teak anther culture.

- (1) MS basal medium (Murashige and Skoog, 1962)  
+ 0.1 K + 2.0 pCPA (mg/l)
- (2) MS basal medium (Murashige and Skoog, 1962)  
+ 0.1 K + 0.5 2,4-D (mg/l)
- (3) B5 basal medium (Gamborg and Wetter, 1968)  
+ 0.1 K + 2.0 pCPA (mg/l)
- (4) SH basal medium (Schenk and Hildebrandt, 1972)  
+ 0.1 BAP + 2.0 pCPA (mg/l)

*Cytological Study* : Under suitable growth conditions, the division of uninucleate microspores in the cultured anthers can develop. The chromosome number ( $n = 16$ ) of the growing callus derived from the cultures is very similar to that of the sporocytes in the anthers of selected flower buds. That is, the regenerated callus is the haploid callus.

*Treatments for Morpho/Embryogeneses* : The derived callus is being cultured and treated for its morpho/embryogeneses. Different concentrations and types of particularly hormones and vitamins in combination with environmental treatments are being tested for inducing morpho/embryogeneses in the cultured callus.

6.

REFERENCES

- Bourgin, J.P. and P.J. Nitsch 1967. Obtention de *Nicotiana* haploids a partir d'etamines cultivees *in vitro*. Ann. Physiol. Veg., 9: 377-382
- Kaosa-ard, A. 1986. Teak in ASEAN : A Survey Report. ASEAN/CANADA Forest Seed Centre, Muaklek, Thailand 65 pp.
- Kaosa-ard, A., P. Apavatjrut and K. Sombun 1985. Teak Tissue Culture : A 3 Year Report. Silv.Res. Subdiv. RFD 37 pp. (in Thai)
- Murashige, T and F. Skoog 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497
- Schenk, R.V. and A.C. Hildebrandt 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. Can. Jour. Bot 50: 199-204
- White, P.R. 1963. The Cultivation of Animal and Plant Cells. The Ronald Press, NY 228 pp.
-



SHITA REPORT No.5

地球環境問題と植物工場

主催：日本植物工場学会、日本工業新聞社  
9.9 植物工場シンポジウム講演予稿集  
平成6年 4月21日 中央大学駿河台記念館

日本植物工場学会

熱帯雨林樹木の苗木生産と森林再生

森林総合研究所 石井克明

熱帯雨林は遺伝子の宝庫とされ、種の多様性が最も豊かな生態系である。だが、1990年のFAO(国連食糧農業機関)の統計によれば、毎年1700万haの熱帯林が減少していると言われている。熱帯林の大規模で急激な減少・劣化は洪水や濁水などを引き起こし、砂漠化を加速し、林産物の供給を減少させ発展途上国の生活環境を悪化させている。そして、地球規模でも、炭酸ガス吸収・固定能の減少による地球温暖化の加速、野生生物種の絶滅による遺伝子資源の減少、気候変動などの様々な問題に関係している。

拡大する熱帯林の損失を食い止めるためには、生態系の保護を声高に唱えるだけでなく、積極的に造林を行うことが求められている。必要造林面積の予測には様々なものがあるが、減少を止めるだけでも毎年約2000万haの植林が必要と推察される。ここでは、熱帯林の再生を図るために必要な苗木の生産技術について、最近の取り組みについて触れながら概説してみたい。

1. 樹種を選択

造林の目的や、立地条件によって樹種を選択することになる。バルブ材や製材用材を目的とした産業造林では広葉樹のユーカリ類、アカシア類、マホガニー、チークや針葉樹の熱帯性マツ類、イトスギ類、南洋スギ類が植林される。社会林業と言われている、地域住民の利用する薪や飼料、小丸木の生産のための造林としては、ユーカリ類、ヤマネ、モクマオウ類、マメ科のギンネム、タガヤサン、シッソーやモクマオウ類が用いられる。材は薪になり、葉は飼料に、実は食用にといった多目的樹種(NPIS: multipurpose tree species)が主に中心となる。環境を保全するための環境造林として多用される樹種としては、やせた土地でもよく育つ莖葉固着性を持つマメ科の早生樹木や、在来樹種が選択される。外来樹種を導入する場合は特に、土壌の酸さ、肥沃度、pH、年間降水量、海抜等に注意して適した樹種を選択する必要がある。

2. 苗木の生産

熱帯林を再生させるには、天然更新法と人工造林がある。天然更新の場合でも苗木の補植が必要な場合に、人工造林では、全面的に苗木の生産が重要なポイントとなる。多くの樹種では、普通、種からの実生苗が育苗されている。熱帯樹種の中にはそのままでは発芽し難いものもあり、それらの発芽促進法について表-1に示した。

表-1 熱帯産樹木難発芽種子の発芽促進方法

樹種	処理方法
<i>Acacia albida</i>	濃硫酸 20-30分
<i>A. auriculiformis</i>	濃硫酸 20-30分 または 沸騰水に漬けてそのまま冷却
<i>A. mangium</i>	沸騰水に3-5分間漬ける または 熱湯80℃で15分
<i>A. nilotica</i>	濃硫酸 5-15分 または 沸騰水に漬けてそのまま冷却
<i>Albizia falcatia</i>	沸騰水に漬けてそのまま冷却

<i>Cassia siamea</i>	濃硫酸 5-15分 または 沸騰水に漬けてそのまま冷却
<i>Casuarina equisetifolia</i>	水に浸漬12時間
<i>Dalbergia sisso</i>	濃硫酸 45-60分
<i>Eucalyptus camaldulensis</i>	水に浸漬12時間
<i>Gmelina arborea</i>	濃硫酸 45-60分
<i>Grevillea robusta</i>	水に浸漬24時間
<i>Leucaena leucocephala</i>	熱湯(50℃)に12時間浸漬
<i>Parkia biglobosa</i>	濃硫酸 5-15分
<i>Pinus caribaea</i>	水に浸漬15時間
<i>Prosopis africana</i>	濃硫酸 30分
<i>P. juliflora</i>	種皮に傷つけ
<i>Pterocarpus indicus</i>	熱湯(50℃)に12時間浸漬 または 濃硫酸 30分
<i>Tamarindus indica</i>	沸騰水に3-5分間漬ける または 濃硫酸 30分
<i>Tecoma grandis</i>	吸水と日光乾燥の繰り返し
<i>Terminalia ivorensis</i>	水浸漬と乾燥の繰り返し

浅川(1992)より改変抜粋

ラワン類のように開花結実周期が長く種子の採取が難しくかつ保存ができないものについては、苗圃での発芽育苗が困難なので、結実年に自然に散布され、林内で育った稚樹(山引き苗)を利用することがある。フタバガキ科のカブール等ではこの方法で多くの苗木が準備された。天然林の再生では特にこの方法で苗木をそろえることが多い。

同様に、種の得にくい樹種や、優良個体の増殖方法として、挿し木苗が用いられている。タイではヤマモクマオウ *Casuarina junghuhiana*の小枝の挿し木による育苗が行われている。また、ブラジルやコンゴでは選抜されたユーカリの萌芽枝からの挿し木による苗木の生産が事業的に行われている。インドネシアのTROPENBOS-カリマンタン・プロジェクトでは、フタバガキ科樹種数十種の山引き苗や萌芽枝から通気水耕方式による挿し木(写真-1)を行っている。

近年注目を集めている苗木の増殖法に組織培養を用いたものがある。タイではチークの実生や精製粉からの組織培養による苗木生産(写真-2)が年間1万本の規模で進行中である。また、ブラジルではユーカリを年間10万本以上組織培養で増殖しており、挿し木の採用の木の幼若化にも利用されている。東南アジアの在来種のフタバガキ科についても *Dipterocarps intricatus*, *Anisoptera thurifera*, *Shorea robusta* 等で芽や節からの個体再生や増殖に実験室レベルでは成功している。その他、南米のセドロ(写真-3)やハカランダ等でも組織培養による増殖技術は可能であり、今後は苗木の生産コストを下げるための努力が必要となる。そのためには、アルギン酸のゲル等でも組織片を包埋してそのまますべての人工種子の技術(写真-4)や、培養の自動化等の分野の開発研究の進展が望まれる。そして、多様な熱帯林を保全するためには、単純な林分は好ましくないの、挿し木や組織培養でクローン増殖された苗木は多種類を混植するように植林計画をたてる

ことが必要である。

さて、増殖された苗木は、植栽時に根を痛めないように、一本ずつポットで育てる(写真一五)のが普通である。ポットの材質はポリエチレンフィルム、塩化ビニル、ベニヤ、竹、紙などが多く用いられている。ポット苗では、底のついたポットを用いると、根がポットの内面にそって巻くことが多いので、移植する時に根切りをする場合がある。底なしのポットを用いる場合は根が地中に伸びないように、ピニルシートを敷くことがある。ポット苗では、多量のポット用土が必要でかつ苗木の運搬が重労働になる欠点がある。

熱帯においてポット苗を育苗する時には、適度な灌水、寒冷紗やチガヤなどの日覆い、除草、病虫害防除、肥培管理が大事である。また、マツやタブバガキ科等の苗木では、菌根菌を接種しないと、著しく成長が遅くなることが多い。

日本のスギ・ヒノキの造林では植栽する場合は普通、裸根苗が用いられている。植栽現場が良好な場合は熱帯でもこの方が苗木の運搬は楽である。オーストラリアでのカリビヤマツの裸根苗での植栽などの例がある。また、タイではチークの植林において裸根苗の地上部を切り詰め、主根も約20cmに切り、側根をそぎおとしたスタンプ苗(根株苗)が用いられる。これは、保存がきき、育成が容易で持ち運びも容易で、メリナ、バンヤ、インドセダン、アフリカマホガニー、シタン類等でも適用できるとされている。

今後は、植工場によるプラグ苗の生産が熱帯樹木でも活用されることが期待される。特に、乾期の長い熱帯モンスーン地帯での植林用のプラグ苗では、保水能等も考慮した熱帯用の工夫が必要である。

## 2. 植林

熱帯の荒廃地の造林では、事前に土壌の物理性をよくすることが必要である。このために、時にはリッパやアスクハローを用いて等高線にそって耕転する。そして、苗木を植栽し易いように地表植生を取り除き、散乱している枯葉や切り屑等と共に片寄せする。このような一連の作業を、地寄せと呼んでいる。全面的に耕転しない場合は、十分大きな30-45cm位の植え穴を掘る。乾期が長くて乾燥が予想されるところでは、等高線にそって土の隆起を作りテラス状にしたリ(ステピック法)、平坦な土地に敷立てをして、低い場所の一角に穴をつくり植栽(トルカナ法)したりする。ちなみに、乾燥地では、底に小さな穴をあけた並やパイプを、植栽木のそばに埋め込み、水が徐々にしみ出るようにした特殊な方法もある。前期が始まり表層30cmに降水が浸透する位の降雨量に達したら、植栽を開始できる。ポット苗の場合は、普通は植栽直前にポットを取り外し、根糸を崩さないように移植する。森林の復元のための緑化植林では、除間伐を行わないので、植栽密度は600-1000本/ha位と比較的低密度とする。荒廃地の植林では、土壌の肥沃化をはかるために、まず、楕円を形成し空中窒素を固定する肥料木や覆せ地に強い木をまず植栽し、数年してから目的の樹種を植え込み、先行植栽とよばれる方法がある。また、はじめから目的樹種と肥料木と一緒に植栽する連植法もある。熱帯においては、大面積の一斉単純造林は病虫害の被害に遭い易いので、植生を様々な幅に帯状に帯状に伐開した後列状に植栽することが多く、ラインプランティング(line planting, 筋植え、列状植栽)と呼ばれる。植栽の時に直射日光に弱いタブバガキ科等の優相樹種の植林では、まず樹下植栽を行って、その後生育するにつれて、前生樹を刈り込みかきしていき、光環境を調節する方法がとられる。

育苗の手間のかからない方法として、林地に直接種子をヘリコプターで空中から散布し

たり、地上で埋め込みんだり、ばらまいたりすることがある。スーダンのナイール川流域でのセネガルアカシア、バキスタンのインダス川流域でのアラビアゴムモドキ、ブラジルでのメリナ等で限られた成功例がある。

産業造林では、2度目からの森林再生に萌芽更新法が用いられることがある。これは、伐採したあとの切株から生じる萌芽枝を育てて次代の森林を造成する。萌芽性の高い広葉樹のアカシア類、ネムノキ類、ユーカリ類などで多く行われている。木が生育期に入る直前に、ほぼ地面の高さから20cmの間で伐採する。そして、1年半後に萌芽枝を2-3本に間引く。ユーカリでは7-12年の伐期で、3-10回の更新、収穫がされた例がある。

熱帯に植林した場合、地域の住民の利益を考慮しないと、森林の維持に失敗することがある。そのような反省から、近年、社会林業の考え方が普及してきた。農業と林業の調和を図る、アグロフォレストリーはその代表的な形態である。なかでも、タウンヤ法(Taung ya system)は、樹木の植え付け時における未開墾の空き地に農作物を栽培する方式で、最初に1856年にミャンマーのチーク植林で行われた。樹木の間に、陸稲、トウモロコシ、キャッサバ等の作物を栽培し、樹冠が閉鎖し、照度不足で作物の栽培ができなくなると、樹木の保育のみを行う。この方式は、インドネシア、インド、ナイジェリアなどでも実行されて良い結果がでてきている。

## 3. 保育

熱帯では雑草木の生育も盛んなため、苗木をうまく育てるには下層の雑草木を刈払う下刈と呼ばれる作業が必要となる。初めの2,3年は1成長期に1-5回の下刈を行う。また、年1回位は、造林樹木に食い込み、覆いつる植物を除去する、つるの切りを行う。荒廃地の緑化の場合には行われぬが、産業造林の場合は、不用な萌芽枝、病虫害被害木、被圧木、形質不良木等を間引く間伐を行うことが多い。同様に植林木の材質を高めるために、枝打ちを行い、節の少ない木材を生産する。ただ、ユーカリ類やカラバンバヤ等は自然落枝するので、枝打ちは必要ない。植林地が成林するまでには、火入れ、病虫害、風害、家畜の糞害、乾燥害、冠水害、不法耕作、盗伐等から森林を護ることが必要になる。これには、社会的な要因が大きく関係しているが、技術的に解決しなければならぬ点も多い。特に火災は一瞬にしてそれまでの労力が無駄になるので、対策を講じておかなければならない。常時見張りをつけるとか、防火帯を尾根筋に設ける必要がある。耐火性樹種の導入も有効である。

## 4. 天然更新法

東南アジアの熱帯雨林では、森林を持続させながら、有用な大径木を択伐し、林床の有用樹の稚樹を後継樹として更新を図る方法は択伐天然更新と称される。だが、有用樹の稚樹の発生がみられない場合は、苗畑で養育した苗木を択伐跡地へ一定間隔で植え、更新補助作業(エンリッチメント, enrichment)を行う必要がある。また、択伐法の一つで、フトバガキ科の優占する森林で、経済的価値の少ない樹木や損傷木等を重硫酸で枯死させ、後継樹の生育をさせるマラヤン・ユニフォームシステム(Malayan uniform system)があったが、多様な樹種構成の森林では有効ではなかった。その他、フィリピンではケシアマツ林で伐採時にhaあたり18-20本の母樹を残し、それらからの種子の飛散で更新させるSTS (Seed Tree System)法がとられている。

5、熱帯林再生研究

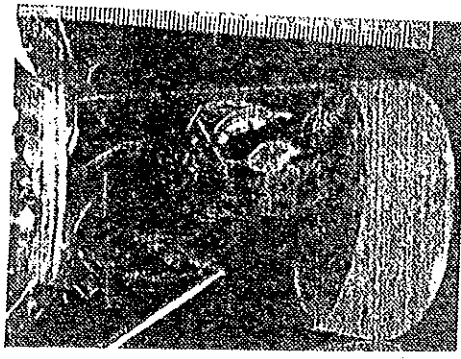
途上国を対象とした森林関係の国際研究機関として、本年多国間の協力によって、CIFOR (Center for International Forestry Research) がインドネシアのポゴールに設立される。そこでは、人工林の効率的な管理やバイオテクノロジーが研究領域に入っている。国内では、10月につくば市に、農水省の国際農林水産業開発研究センターが設立され、森林育成技術の高齢化も課題となる予定である。林野庁の補助金による、熱帯林再生技術研究組合では大手10社が参画しての、再生研究が進行中で成果が上がってきた。JICA (国際協力事業団) も、アジア、アフリカ、南米での熱帯林の再生プロジェクトに力を入れている。NGO組織の熱帯林再生研究者連合 (Bio-Refor) は、9月にインドネシアのジョグジャカルタで第2回のワークショップを開催する。このように、熱帯の森林再生とその研究に対する日本の役割は益々大きくなってきている。

参考文献

- 浅川遼彦；熱帯の造林技術、pp117, 国際緑化推進センター, 1992
- 石井克明；樹木の組織培養と熱帯雨林の再生、第1回樹木分子生物学シンポジウム—樹木のバイオテクノロジーと地球環境—講演要旨集、24-29, 1991
- 川名 明 他；造林学—三訂版—, pp200, 明倉書店, 1992
- 桜井尚武；熱帯アジアの人工造林、森林科学 6、19-27, 1992
- 佐藤 明；アグロフォレストリーによる熱帯林の再生、森林科学 6、27-33, 1992
- 村上公久；バイオ・リフォレスト (熱帯林再生研究者連合) Proceedings of Tsukuba-workshop p. pp207, 1993
- 林野庁監修・国際林業協会編；ザ・熱帯林—緑の地球経営の突現に向けて—, pp210, 日本林業調査会, 1990



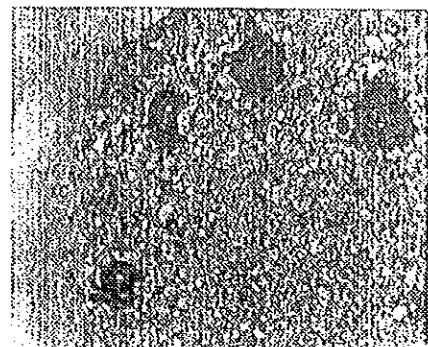
写真一2、組織培養で再生されたチークの苗木



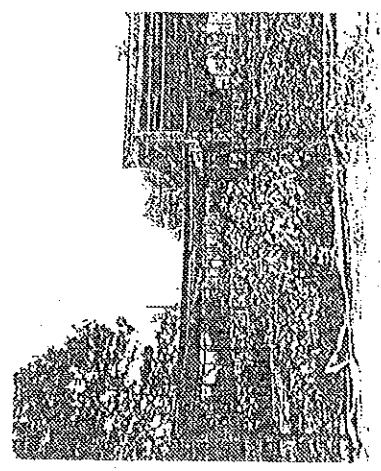
写真一3、セドロの組織培養



写真一1、通気水耕方式によるフタバガキ科の挿し木増殖



写真一4、林木の人工種子の発芽



写真一5、フタバガキ科の大畑のポット面 (ブルネイ森林センター)

## ペルー・アマゾン産樹木の組織培養

—セドロを中心にして

Tissue Culture of Peru-Amazon Forest Trees  
with Particular Emphasis on *Cedrela odorata*

石井 克明\*

## はじめに

近年、熱帯林に関する関心が、地球環境保護との関連で高まっている。FAOとUNEP(国連環境計画)はTPAP(熱帯林行動計画)を策定し、熱帯林の利用と保全について行動を開始した。熱帯林は、東南アジア、アフリカ、中南米に分布するが、南米のペルー国では1982年より「ペルー国アマゾン林業開発現地実証調査」のプロジェクトが、日本の国際協力事業団により行われ、現地生態系を保全するための、人工更新の試みが行われてきた<sup>1)</sup>。スイス、ベルギー、アメリカ合衆国、西ドイツの協力による造林関係の開発試験もペルー各地で進行中である。また、1987年4月には、熱帯林行動計画樹立ミッションが日本を含む世界各国の協力で行われた<sup>2)</sup>。

現在、ペルー・アマゾン地域での在来樹種の中で有用なものとしてカオバ(*Svetenia macrophylla*)、セドロ(*Cedrela odorata*)、トルネージョ(*Cedrelinga catenaeformis*)がある。これら樹種は、100年前から有良木の抜き伐りが盛んで、減少の一途をたどっている。そして、これら樹種の種子の飛散距離は小さく、いったん伐採されると、その地域に自然に再生することはほとんどない。

一般に熱帯林樹種は、採種や種子の貯蔵が困難なものが多く、そのうえ、カオバやセドロはヤノガニーメイガ(*Hypsiptera*)による虫害で、成林させるのがむずかしい状況にある。そこで、虫害抵抗性個体の探索が行われている。今後、こうした優良個体をクローン増殖して健全な熱帯林の育成がはかられる可能性がある。

これまで、熱帯樹木の組織培養増殖の研究は、

\* Katsuaki Ishii: 森林総合研究所 Forestry and Forest Products Research Inst.

主に果樹やコーヒー、ココアなどに限られており、林業、林産資源用の樹種を扱ったものは少なかった。このほどペルー・アマゾン産の熱帯林樹種の組織培養を行う機会を得たので話題として提供させていただく。

## 1. 試みた樹種と実験方法

供試材料は、ペルー国アルカカのアレクサンダー・フォン・フンボルト国有林にて採取した11樹種 *Cedrela odorata* (Cedro), *Cedrelinga catenaeformis* (Tornillo), *Copaijara officinalis* (Copaiba), *Guazuma crinita* (Bolaina blanca), *Guazuma ulmiifolia* (Bolaina negra), *Hübertodendron swietenoides* (Aguano masba), *Hymenaea oblongifolia* (Azucar huaya), *Myrzylon balsatum* (Estoraque), *Parkia oppositifolia* (Goma huayo pashaco), *Svetenia humilis* (Mahogany), *Svetenia macrophylla* (Caoba) を用いた。表面殺菌は、種子の場合70%エタノールで1~5分間処理した後、5%過酸化水素水で15分間、または0.1%昇汞水で10~15分間殺菌処理し、滅菌水で3回洗浄した。そして種皮を除去したものを外植体として用いた。

一方、種子をバーミキュライトで発芽させて得た苗木の茎頂や茎節の殺菌は、70%エタノールの処理時間を1分間とした。主な基本培地としては、BTM<sup>3)</sup>、WPM<sup>4)</sup>、WS<sup>5)</sup>を用い、培養は約5000ルクス蛍光灯の16時間日長で、25°C恒温条件下で行った。以下、3樹種での実験結果を記す。

2. セドロの茎頂培養による増殖<sup>6)</sup>

苗齢5か月のセドロの苗木の茎頂を含む部分を2~3cmの長さに切り取り、エタノールと昇汞水で表面殺菌の後、1.5~2cmの長さに切りつめて、BAPを0.2~20mg/l含有するWPM培

表1 セドロの初代培養でのBAP濃度の影響(WPM培地)

Concentrations of BAP (mg/l)	Explants that formed shoots (%)**	Numbers of shoots per explant		Maximum lengths of shoots (cm)	
		Mean	Range	Mean	Range
0.2	100	3.5	2~5	5.1	2.2~7.3
2.0	100	3.9	2~6	2.9	1.6~5.0
20.0	80	1.3	1~2	1.8	1.5~2.1

\* Data were taken after one month of culturing.

\*\* Percentages were calculated from 10 cultured shoot-tips for each concentration of BAP.

表2 セドロのシュートからの発根へのオーキシンの影響(1/2 WPM培地)

IBA and NAA concentrations (mg/l)	Explants that formed roots (%)**	Numbers of roots per explant		Maximum lengths of roots (cm)	
		Mean	Range	Mean	Range
IBA 0.05	55	3.7	1~10	6.1	0.3~11.5
IBA 0.5	73	3.4	1~9	5.6	1.0~11.8
IBA 3.0	59	3.5	1~9	1.8	0.2~5.5
IBA 0.5+NAA 0.05	90	4.2	2~7	1.3	0.6~2.2
IBA 3.0+NAA 0.5	12	7.0	5~10	0.4	0.1~1.0

\* Data were taken after 30 days of culturing.

\*\* Percentages were calculated from 10 to 25 cultured shoots.

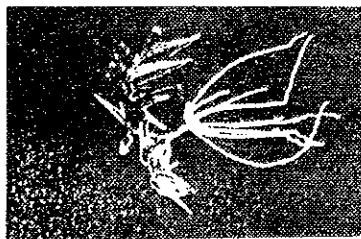


図1 セドロのシュートから発根

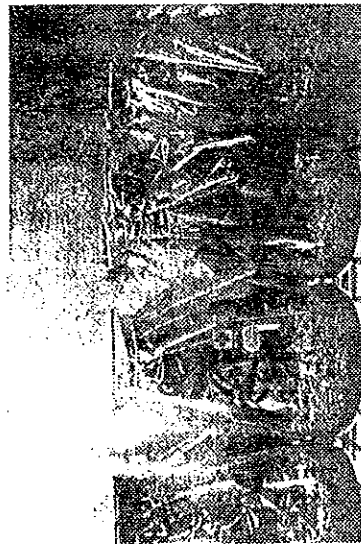


図2 セドロの再生個体のパターライト土壌への根付け

地に固定した。初代培養において2 mg/lのBAPを含む培地で、6週後に平均4本のマルチアルシュートが誘導された(表1)。以後の継代培養におけるシュートの増殖と伸長には、0.2 mg/lのBAPを含む培地を用いた。このようにして増殖させたシュートのうち、長さ1 cm以上のものを表2に示すような発根培地で試験したところ、1か月後にIBAを0.5 mg/l、NAAを0.05 mg/l含有する、半分の無炭酸培地のWPM培地において、90%の率で発根させることができた(写真1)。

こうして発根させた再生個体は、ハイボネック

ス1000倍希釈液を含んだパーライト土で苗木として生育させることができた(写真2)。このように、今後、マホガニメーイが抵抗性個体からの大規模に組織培養を適用する見通しがあった。

### 3. カオバの莖節からのマルチアルシュートの誘導

苗齢5か月のカオバの莖節を含む部分を2 cmの長さで切り取り、エタノールと過酸化水素水で表面殺菌した後、1~1.5 cmの長さで切りつめて、BAPを2.0 mg/l含有したBTM培地に固定したところ、1か月後マルチアルシュートが得られた。しかし、マルチアルシュートからの発根はみられなかった。

### 4. トルニージョの芽ばえからのマルチアルシュートの誘導とカルス培養

トルニージョは別名ペルマツと呼ばれ、20年で胸高直径が30 cmくらいにまで生育する経済的に重要な樹種である。しかし、年により種子生に重要な樹種である。種子貯蔵が困難であり、苗畑での無性繁殖がむずかしいために、これまで人工造林地はほとんど存在しなかった。こうした樹種への組織培養の応用の期待は高い。

トルニージョの種子をエタノールと過酸化水素水が昇水で表面殺菌し、滅菌水で洗浄した後、寒天培地で無菌的に発芽させた。発芽1か月後、1~1.5 cmの莖節を含む部分を、BAP 2.25 mg/l、またはゼアチン 2.2 mg/l含有のWS培地に固定した。培養1か月後、切り口にカルスを形成した外植体をホルモン無添加のWPM培地に移植したところ、1か月後1つの莖節から平均4本のマルチアルシュートが得られた。シュートの発根については、現在最適条件を探索中である。

トルニージョのカルスはNAAや2,4-Dを含む有したWPM培地で比較的容易に継代培養が可能であった。カルスを2.25 mg/lのBAPを含む有したWS培地に移植したところ、シュートを分化するものがあつた。

### 5. 今後の展望

地球環境での砂漠化の進行や異常気象の原因として熱帯林の減少が人口に脅かしている。いまの

ままの速度でいけば、21世紀には現在の40%が消失するといわれている。熱帯林を活用することは途上国の人々にとっても重要であり、そのためには原生林をただ保護するのみでなく、再生可能盤を利用し、有用樹種を加えて、付加価値をあげていくという視点を忘れてはならない。

日本は伐採された熱帯材の50%近くを毎年輸入し、マンガロープ林を伐採して達成した養殖場からのエビを大盤に輸入するなど、植物の豊饒である熱帯林の消失に大いに関与しており、これからの熱帯林の再生、保全、高度活用の分野でますますの協力が望まれている。

現在、ライオンブランディング、樹下電線、天然下種更新、萌芽更新など、あらゆるこれまでの林業技術を用いた熱帯林再生および質的向上のための研究が行われているが、組織培養による増殖や遺伝資源保全の技術開発に向けたアプローチの方向も忘れてはいけないだろう。特にセドロが属する熱帯性センダン科の樹木は、中南米、南アジア、アフリカに多いが、いずれも植林地でのマホガニメーイガの被害が大きくな問題になっており、育種的な対応が必要であり、抵抗性苗木の効率的な増殖における組織培養の役割は大きいと思われる。

### 又 献

- 1) 岡田明彦: 森林総合研究所研究報告No. 2 "熱帯・亜熱帯林の消失", 57-59, 1989
- 2) 藤森隆郎・阿久津雄三: ヘルベルト・アルバン, エミリオ・マルヤマ, 熱帯林業, 15: 2-11, 1989
- 3) Chalupa, V.: Biologia Plantarum(Praha), 26: 374-377, 1984
- 4) Lloyd, G. and McCown, B.: Comb. Proc. Intern. Plant Prop. Soc., 30: 421-427, 1980
- 5) Wolter, K. E. and Skoog, F.: Am. J. Bot., 53: 263-269, 1966
- 6) Maruyama, E., Ishii, K., Saito, A. and Migita, K.: J. Jpn. For. Soc., 71: 329-331

# 第1回樹木分子生物学シンポジウム (東京)

—樹木のバイオテクノロジーと地球環境—

主催：Japan wood biotechnology 談話会  
共催：「樹木の分子育種、共同研究プロジェクト」  
(代表、東京農工大学教授 諾延紀幸)  
共催：東京農工大学共同研究開発センター

1991年9月12日(木)  
10:00~16:40

東京農工大学農学部講義棟  
4F 視聴覚教室  
(東京都府中市幸町3-5-8)

### 3 樹木の組織培養と熱帯雨林の再生

(農水省・森林総合研究所) 石井 克明

#### 1. はじめに

世界で40億haといわれる森林の中で、熱帯林は17億haであり、およそ半分を占めている。これは、熱帯アメリカ、熱帯アジアに分布し、豊富な遺伝子資源を有し、地球規模の気候変動の緩和作用や途上国での水土保全機能など、測り知れない恩恵をもたらしている。しかし、近年、毎年1000万ha以上の熱帯雨林の減少が生じており、これに對する、熱帯地域における造林面積は、その1/10の毎年110万haと推計されている。その主な原因は、過度の焼き畑移動耕作、過剰伐採、人口圧からくる農地転用の拡大等によるものである。一方、日本は世界最大の熱帯木材消費国で、1960年代より、フィリピン、インドネシア、タイといった東南アジアの各国で、優良な熱帯樹種を伐採しつつ、今、マレーシア、パプアニューギニアから大量に原木を輸入している。このような情勢から、今後も熱帯雨林再生へ向けた日本の取り組みの強化が望まれている。

これまでの熱帯での植林は、土壌改良用のアカシアや、荒地に強い早生樹のユーカリなどの外来樹種を中心に用いてきた。だが、これらの林は、元の森林とは違い、単純で、病気や害虫の大発生が多いたる。だが、熱帯の多くの樹種については、着花結実習性が明らかでなく、調査されたものの多くは、結実周期が長く、15年に一度しか種にならない樹種すらある。その上、東南アジアの有用在来種の代表である、フタバギキ科等は種子の寿命が数週間という風に、極めて短命であり、貯蔵が難しい。それでは、挿し木や芽ぎ木といった無性繁殖はどうかというと、これもまた一般に大変難しい。そこで、組織培養の技術を用いて、在来有用熱帯樹種を増殖することを目的とした研究がはじまっている。ここでは、まず、これまでの熱帯在来種の組織培養について簡単に概括し、次に、森林給研での取り組みを述べ、最後に、熱帯雨林再生へ向けた最近の組織培養関連の2、3の動きについて述べる。

#### 2. これまでの海外での熱帯樹種での組織培養

組織培養技術が最もうまく応用された熱帯樹木は、おそらくチーク (*Tectona grandis*) であろう。実生や、100年生の精英樹からの組織培養による増殖が行われている<sup>1)</sup>。タイのチーク改良センターでは、年間1万本の組織培養苗が仕上げられている<sup>2)</sup>。だが、その他の樹種では、アカシアやユーカリといった導入樹種を別とすれば、実用化されたものは少ない。ユーカリの場合は、採種圃用に個体を幼若化させる目的でも組織培養が用いられている。東南アジアで在来樹種として重要なフタバギキ科の樹木では、研究レベルの域を出ないのが現状である。1983年にSmitsらが、*Shorea curtisii*, *S. obtusa*, *Dipterocarpus grandiflorus* の葉脈を培養し、カルスの形成や発根を頼るのが最初である<sup>3)</sup>。Shorea *torbangkii* では液体培養を行ったが、個体の再生条件は見いだせなかった<sup>4)</sup>。近年、形質の明かな成木の材料の組織培養による幼若化の試みが、フタバギキ科で行われた<sup>5)</sup>。

これは、水耕挿し木法に供する幼若化した材料を得るためにに行っているものである。また、同じフタバギキ科の樹種でも、比較的種子が乾燥に強い、*Dipterocarpus intricatus* では、芽生えを修正WPM培地で培養し、子葉節外植体より胚芽を得て、試験管内での個体再生に成功した<sup>6)</sup>。種子寿命の短い、*Shorea leprosula* や *S. parvifolia* については、BAPや2iPをホルモンとして利用して実生の節より胚芽を誘導した<sup>6)</sup>。このように、いまだ少数ではあるが、熱帯雨林再生へ向けた組織培養研究が行われてきた。

#### 3. 森林総合研究所での研究

##### 3.1 ペルー産樹木の組織培養<sup>7)</sup>

##### 3.1.1 実験方法

ペルー国プカルカのアレクサンダー・ブオン・フンボルト国有林にて採取した11樹種を用いた。*Cedrela odorata*(Cedro), *Cedrelinga catenaeformis*, *Copaifera officinalis*, *Guazuma crinata*, *Guazuma ulmifolia*, *Huberodendron swietenoides*, *Hymenae oblongifolia*, *Myroxylon balsamum*, *Parikia oppositifolia*, *Suietenia humilis*, *Suietenia macrophylla* の種子である。種子の割合は、70%エタノールで1-5分間処理し、次に、5%濃酸化水素水で15分間あるいは、0.1%昇水素水で10-15分間表面殺菌処理し、滅菌水で3回洗浄したのちから綴皮を除去し外植体とした。パーミキュライトで発芽させて得た苗木の莖頂や莖節の場合は、70%エタノールの処理時間を1分間とした。

培地は、B1M, WPM, MSなどを用い、培養条件は5000 lux の蛍光灯光、16時間日長で、25℃恒温条件下で行った。

##### 3.1.2 結果と考察

実験に用いた11種の内、*G. officinalis*, *P. oppositifolia*, *M. balsamum* では、2 mg/l のBAP含有のWPM培地において、莖節片よりシュートの伸長がみられた。*G. ulmifolia* では、ホルモン無添加のB1M培地で莖節片よりシュートの伸長がみられた。

昔暦5カ月の *Cedrela odorata* の苗木の莖頂を含む部分を2-3 cmの長さで切り取り、表面殺菌後、1.5-2 cmの長さで切り詰めて、BAPを0.2-20 mg/l含有するWPM培地に置床した結果を表1に示す。初代培養において2 mg/lのBAPを含む培地で、6週間

表1 マドモの初代培養でのBAP濃度の影響 (WPM培地)

Concentrations of BAP (mg/l)	Explants that formed shoots (%)**	Numbers of shoots per explant		Maximum lengths of shoots (cm)	
		Mean	Range	Mean	Range
0.2	100	3.5	2-5	5.1	2.2-7.3
2.0	100	3.9	2-6	2.9	1.6-5.0
20.0	80	1.3	1-2	1.8	1.5-2.1

表2 マドモのシュートからの発根へのオキシンの影響 (1/2 WPM培地)

IBA and NAA concentrations (mg/l)	Explants that formed roots (%)**	Numbers of roots per explant		Maximum lengths of roots (cm)	
		Mean	Range	Mean	Range
IBA 0.05	55	3.7	1-10	6.1	0.3-11.5
IBA 0.5	73	3.4	1-9	5.6	1.0-11.8
IBA 3.0	59	3.5	1-9	1.8	0.2-5.5
IBA 0.5+NAA 0.05	90	4.2	2-7	1.3	0.5-2.2
IBA 3.0+NAA 0.5	12	7.0	5-10	0.4	0.1-1.0



後に平均4本のマルチブルシユートが誘導された。以後の継代培養におけるシユートの増殖と伸長には、0.2 mg/l の BAP を含む WPM 培地を用いた。増殖したシユートの内、長さが1 cm 以上のものを表2に示す種々のIBAとNAA濃度の1/2 WPM 培地で培養したところ、1カ月後に、0.5 mg/l のIBAと0.05 mg/l のNAAを含有する培地で、90%の発根がみられ、個体の増殖・再生に成功した。こうして、増殖した個体は、ハイポネックス1000培養を含んだパーライト土で生育させた後に鉢出しし、順化させた(写真1)。



写真1. 組織培養で増殖させ順化したセドロ

現在、Cedro はマホガニーメイガの被害が激しく、人工造林地の成林が難しいが、選抜虫害抵抗性個体の増殖や、虫害耐性遺伝子組換え体において組織培養技術が活用できると考えられる。

*Cedrelinga catenaeformis* (Tornillo) の種子を表面殺菌し、寒天培地で無菌的に発芽させ、1ヶ月後、1-1.5 cm の莖頂を含む部分を2.25 mg/l のBAPまたは2.2 mg/l のゼアチンを含むWS培地に置床した。培養1カ月後、切口にカルスを形成した外植体を、ホルモン無添加のWPM培地に移植したところ、1カ月後、1つの莖頂から平均4本のマルチブルシユートが得られた。Tornillo のカルスはNAAや2,4-Dを含有したWPM培地で継代培養が可能で、そのカルスを、2.25 mg/l のBAPを含有したWS培地に移植したところ、シユートを分化した。Tornillo は年により種子生産が不良で、種子貯蔵が困難であり、在来の無性繁殖も難しかった。組織培養によるクローニン増殖が強く望まれる樹種である。

*Sieteinia macrophylla* (Caoba) の発芽5カ月の苗木の莖部部分を2 cm の長さに切り取り、表面殺菌後、1-1.5 cm の長さに切り詰め、2 mg/l のBAP含有したBTM培地に置床したところ、1カ月後にマルチブルシユートが得られた。

以上のように、樹種により進風の差はあるが、ペルー・アマゾン産熱帯樹木への組織培養技術の応用は、可能であった。

### 3. 2 インドネシア産フタバギキ科の組織培養<sup>2)</sup>

#### 3. 2. 1 材料と方法

インドネシア東カリマンタン、サマリダ市のムラワルマン大学構内にある熱帯降雨林センター(PUSREHUT)で採種し、養育した苗木(1年生以下)、構内に植栽されてい

た苗木(5-10年生)、および、サマリダ市の南方60kmにあるプキット・スハルト保護林と、バリクパパン市の北方38 kmにある、サンゴジャの林で採種した種子を試した。

*Anisostera costata*, *Syobalanops lanceolata*, *Hopea sangal*, *Shorea lanellata*, *S. leprosa*, *S. leptoclados*, *S. parvifolia*, *S. pauciflora* の実生苗の葉柄付き莖片を2-3 cm の長さに切り、70%エタノール、5%過酸化水素水、0.3%昇水水を用いて種々の表面殺菌法と初代培養を試みた。

1988年1-2月に採種した *D. lanceolata* と *S. smithiana* を10% Clorox で10分間、0.3%昇水水で7分間殺菌した後、滅菌水で3回洗浄後種皮を除去し、胚を試した。

5年生の *S. laevis* と10年生の *D. lanceolata* の当年生枝を採取し、70%エタノールで表面殺菌して、そのままクローニンベンチ内で風乾させ、剥皮枝条を約2 cmの長さで切り分けて供試した。

培地は、MS、半分の濃度のMS(1/2MS)、半分の濃度の Gamborg (1/2G) の培地を用いた。培養は、16 mm x 180 mm の試験管や、マゼンタのプラスチックの培養容器を用いて、2000-5000 lux の蛍光灯連続照明下で30℃恒温で行った。

#### 3. 2. 2 結果と考察

葉柄付き莖片を外植体とした場合、70%エタノールと5%過酸化水素水の組合せでは、カビ等の雑菌の外植体からの発生が多く、かつ発根枯死した。一方、0.3%昇水水で殺菌した場合、90%の外植体で無菌となり生存した。しかし、一部、葉害と思われる発根化が観察された。10% Clorox と0.3%昇水水の組合せでも良い結果を得る場合があった。しかし、全体としては、外植体をいためない効果的な殺菌は難しい場合が多かった。

種子の滅菌は、10% Clorox と0.3%昇水水との組合せで可能であった。

葉柄付き莖片で無菌化に成功したものは、*A. costata*, *D. lanceolata*, *S. leptoclados*, *S. parvifolia*, *S. pauciflora* であった。このうち、1 mg/l のBAP含有の1/2G培地で、*A. costata* の葉腋より芽の形成と、そのシユートへの伸長が観察された。0.2-5 mg/l のBAPと0.5 mg/l のIAAを含有した1/2G培地において、*D. lanceolata* の莖片の切断面よりカルスが生じた。1 mg/l のBAP含有の1/2G培地において、*S. leptoclados* の莖片の切断面よりカルスが得られた。また、BAPを1-5 mg/l, IAAを0.2-5 mg/l 含有の1/2G培地において、*S. parvifolia* と *S. pauciflora* の莖片の切断面よりカルスが生じた。

1 mg/l のBAPを含有した3種の培地(MS, 1/2MS, 1/2G)に *S. pauciflora* の莖片を培養したところ、MS培地より、1/2G培地の方が、組織培養に適していた。

種子胚の培養においては、1 mg/l のBAP含有の1/2MS培地で、*D. lanceolata* の胚からシユートが伸長し、発根した。*S. smithiana* の剥皮枝条からの不定芽形成条件は不明だった。

以上、フタバギキ科の組織培養では、外植体の表面殺菌を0.3%昇水水で行い、初代培養で1/2MSや1/2G培地が適していることがわかった。これは、フタバギキ科苗木の試験管内保存や、マイクロプロパゲーションの可能性を示すものである。

### 3. 3 熱帯アジア原産 *Narra* (*Pterocarpus indicus*) の組織培養<sup>3)</sup>

#### 3. 3. 1 材料と方法

フリピンで採取した Narra の種子を 70% エタノールで 1 日間、1% 次亜塩素酸ナトリウム溶液で 10 分間表面殺菌した後、その胚を抽出して培養した。培養条件は、MS, WPM, Gamborg の培地で、25°C 恒温、約 3000 lux 18 時間/日の蛍光灯照明とした。

### 3. 3. 2 結果と考察

外植体からの 2 週間後の結菌の発生率 4% であった。0.9 mg/l の BAP, 0.6 mg/l NAA 含有の培地で、カルス形成とシユート形成がみられ、WPM 培地で 72% のカルス形成率、MS で 39% のシユート形成率を示した。基本培地は、WPM と MS が Gamborg より優れていた。1 カ月後、外植体を BAP 0.225-1.8 mg/l, NAA 0.6 mg/l 含有の WPM 培地に継代培養したところ、カルスの形成への BAP 濃度の違いの影響は認められなかつたが、シユート本数は、BAP が 0.225-0.45 mg/l の時に多かつた。また、シユートからの発根がみられ、再生植物体が得られた。カルスはグルタミン 200 mg/l, PVP (Sigma MW 360,000) 500 mg/l, BAP 0.05-10 mg/l を含有する WPM 培地に移植したが、器官分化はみられなかつた。シユートを 1 mg/l の BAP を含有する B1M 培地で培養したところ、22 本のシユート中 5 本で新しく腋芽が伸長し、マルチプルシユートが得られた。

以上のように高級家具材や楽器製造に用いられる有用樹の Narra についても、組織培養での増殖のめどがたつた。

## 4. 熱帯林再生へ向けた組織培養研究関連の最近の話題

### 4. 1 熱帯林再生技術研究組合

林業、製紙会社、商社、機械メーカーなど 9 社が参加して、林野庁が音頭を取った、熱帯林再生技術研究組合が本年 7 月 30 日に発足した。これは 5 年計画で、熱帯林の造林に関する種々の技術の開発を行う。研究項目としては、苗木の増殖、育苗機械に関する技術開発、植栽・保育機械材に関する技術開発、造林の生育に関する試験調査、地域対策林の造成の技術開発が含まれ、増殖技術として挿し木とともに組織培養の研究が行われる。これらの研究は、ターゲットをマレーシア、タイ、インドネシア、パプアニューギニアなど東南アジアとしており、扱う樹種としては Shorea 属などのフタバガキ科、マホガニ一、ユーカリ、アカシアなどを予定している。そして、それらの組織培養方法の改良、順化育苗方法の改善、苗木活着・成長等を上昇するための菌根菌の接種方法の検討、実用的育林実証試験など、盛りだくさんな内容になっている。

### 4. 2 国際林業研究機関連合 (IUFRO)、熱帯林再生研究連合 (Bio-Refor International)

これは、森林総合研究所に置かれたユフロ日本事務局が企画した。それは、東南アジアの熱帯林広葉樹苗木の増殖技術や苗木への共生菌接種による森林再生技術の各国の共同研究体制を作ることである。本年 3 月には、インドネシアのポゴール農科大学にて、事前ワークショップが開かれ、東南アジア各国での研究の情報交換が行われた。'92 年 5 月中旬には、日本のつくば市において、本ワークショップが開かれた。結核菌利用による荒廃地への森林回復技術とともに、組織培養技術を用いたフタバガキ科苗木増殖技術について、シンポジウムがもたれ、熱帯林再生についての情報交換や、奨励途上国への技術移転の方策などが討議される。

### 4. 3 国際協力事業団 (JICA) のプロジェクト

現在、JICA は数多くの林業技術協力プロジェクトを行っているが、技術移転の項目に熱帯樹木の組織培養技術がとりあげられ、日本から専門家が派遣されたことのあるプロジェクトは 3 つある。インドネシア栗カランタンの熱帯降雨林研究、タイ、バンコックの造林研究訓練、ブルネイ、セリアでの林業研究プロジェクトである。それぞれ、フタバガキ科カパール等の組織培養による増殖、アカシアの培養とプロトプラストの採取、フタバガキ科アラールの組織培養による増殖関連の研究が行われた。この他、パプアニューギニアでの林業研究計画やインドネシア、ジョージヤカルタに建設される林木種子育種センターのプロジェクトでも、熱帯樹種の組織培養研究がとりあげられる予定である。

### 5. おわりに

熱帯林再生へ組織培養を利用する仕方にはいろいろなることが考えられるが、増殖と育種への活用が最も可能性があるだろう。その場合、直接、培養だけで山出し苗を生産するというのではなく、挿し木等の在来技術を組み合わせて、その採種木の幼若化などに主に組織培養が利用されるものと思われる。育種については、遺伝資源の長期保存や、抵抗性遺伝子導入において組織培養系が利用されるだろう。

### 6. 文献

- 1) P. K. Gupta et al.; Tissue culture of forest trees; clonal multiplication of *Ilex grandis* L. (Teak) by tissue culture, Plant Science Letters, 17, 259-268, 1980
- 2) 笹本眞子; タイ国におけるチークの組織培養、林木の育種、No. 150, 24-27, 1989
- 3) W. Th. N. Smits and R. Strycken; Some preliminary results of experiments with in-vitro culture of dipterocarps, Neth. J. Agric. Sci. 31, 233-238, 1988
- 4) Gunasekara, D.S. et al.; Suspension culture of the dipterocarp *Shorea roxburghii* G. Don., Somatic Cell Genetics of Woody Plants, M.R. Ahuja(ed.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 137-141, 1989
- 5) Evers, P. et al.; Micropropagation and rejuvenation of Dipterocarpaceae, Abst. VIIth Intern. Cnng. on Plant Tissue and Cell Culture, 88, A3-83, 1990
- 6) Linington, I.M.; Micropropagation of dipterocarpaceae trees, *ibid.* 113, A3-12 1990
- 7) 石井克明、丸山エミリオ; ペルー・アマゾン産有用樹木の組織培養、第 11 回植物組織培養学会大会、シンポジウム講演要旨集、98, 1989
- 8) 丸山エミリオ 他; 茎頂培養によるセドロ (*Cedrela odorata* L.) のマイクロプロパゲーション、71, 329-331, 1989
- 9) 石井克明 他; インドネシア産フタバガキ科の組織培養 (I) - 外植体の滅菌法と初代培養、100 回日林論、505-506, 1989
- 10) 石井克明 他; 熱帯樹 Narra と Kakawate の試験管内再生とカルス培養、第 12 回植物組織培養学会大会シンポジウム講演要旨集、125, 1991

# ユーカリの組織培養

石井 克明

## はじめに

ユーカリ (*Eucalyptus* sp.) は、オーストラリア大陸とその北方の近隣諸島を原産地とする樹木で、樹種は600種を越すといわれる。なかでも、早生樹に属する種は、広く熱帯、亜熱帯、温帯地域に植栽されている。ブラジルの植林の例では、年間成長量が70 m<sup>3</sup>/ha という驚異的な成長を示した。これらは、パルプ生産用の原木や薪炭材として多く利用されるが、広葉樹のなかでは世界で一番樹高が高くなる *E. regnans* (セイタカユーカリ) などは、建材としても優れている。このほか、ユーカリ油生産、装飾用樹木、養蜂用蜜源、コアラの餌としての利用が知られている。

バイオテクノロジーの基礎技術である組織培養の手法を、このように有用な生物資源であるユーカリに応用することが行なわれてきた。これまでに、組織培養に供されたユーカリ種は約50種にのぼる。それらは、大部分が、優良個体の増殖を目的としたものであるが、一部で二次代謝物生産を目指した組織培養研究もなされた。

## 1. 組織培養によるユーカリの増殖

初期の報告は、*E. grandis* の茎節部を用いた試験管内挿し木があげられる。その後、茎節部よりマルチプルシュート(多芽状苗条)を誘導して、大量増殖する方法が多数の樹種でなされた。増殖を目的とする個体は、耐塩性、耐凍性、耐病性、高精油含有などで選抜されたものであった。

### 1) 耐塩性ユーカリの増殖

オーストラリアは、乾燥大陸の異名をとるように、降水量が少ない。そこで穀類の生産のための灌漑が大規模に行なわれ、各地で地下水の水位の上昇



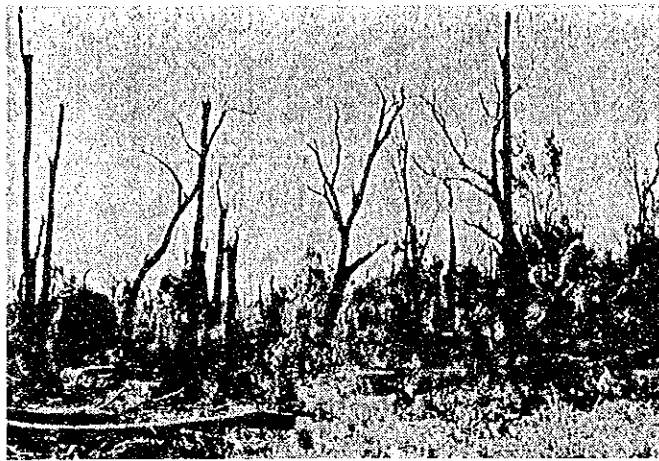
第1図 組織培養により増殖された *Eucalyptus camaldulensis* の耐塩性クローン (オーストラリア, キャンベラ市).

による岩塩の溶解などに起因する塩害が多発している。また、ボーキサイトの採掘跡地の植生回復時には、アルミニウムに対する耐性が要求される。

メルボルン大学では、*E. camaldulensis* や *E. rudis* の実生を海水よりも高い塩濃度中 (640 mmol の NaCl) で育苗し、生き残った耐塩性のクローンを CSIRO (連邦科学産業研究機構) で組織培養で増殖し、オーストラリアやイスラエルに試植した (第1図)。培地は普通 1/2 MS (1/2 濃度の Murashige-Skoog 培地) を用い、3週ごとに約4倍のマルチプルシュートの増殖率が得られている。*E. wandoo* についても同様に耐塩性個体がクローニングされた。

### 2) 耐凍性ユーカリの増殖

ユーカリは、痩せ地や乾燥地でも成育がよいことから世界中で導入されて、バイオマス資源として活用されている。フランスでは、記録的な寒さに耐えて生き残った *E. gunnii*, *E. pauciflora*, *E. dalrympleana* 等の木から得た実生中から耐凍性のものを選抜して、接ぎ木による若返りをはかって、それから組織培養で増殖している。米国でも *E. viminalis*



第2図 ジャラ立枯れ病で全滅した *E. marginata* の森林 (西オーストラリア州).

や *E. nova anglica* を用いて、耐凍性個体のクローニングが行なわれた。*E. gumii* の懸濁培養細胞のアミノ酸含量を調べたところ、耐凍性クローン由来のものではプロリン含量が10倍であった。

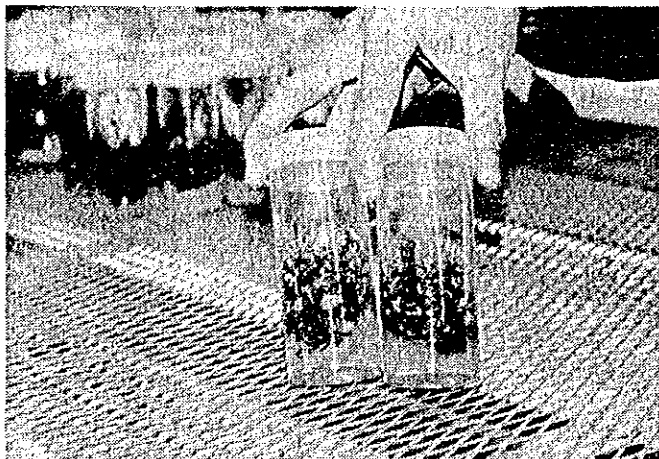
### 3) 耐虫および耐病性のユーカリの増殖

潜葉性昆虫の *Perthida glyphora* に抵抗性のある *E. marginata* の成木からの組織培養では、花芽の雄ずいからのカルスを高い無菌率で誘導し、それからシュートを分化させて増殖に成功している。

ジャラ立枯れ病は、宿主範囲の広い土壌菌の *Phytophthora cinnamomi* が原因で起こり、とくに南西オーストラリアでの森林破壊が激しい(第2図)。*E. marginata* の抵抗性個体が選抜され、成木の茎や雄ずいからの組織培養による増殖が行なわれた(第3図)。

### 4) パルプおよび薪炭用ユーカリの増殖

ブラジルは最も多くユーカリが導入され、現在



第3図 組織培養によって増殖されたジャラ立枯れ病抵抗性の *E. marginata* のシュート。

300万 ha 以上の植林地がある。従来種子による増殖では、遺伝的に多様な森林となり、成長についてもばらつきが大きい。そこで成長量の優れた木を選抜して、栄養繁殖させれば生産性は飛躍的に増大する。

萌芽枝の挿し木や成木の接ぎ木から採取した茎節部を材料として BAP(ベンジルアミノプリン) と IAA(インドール酢酸) を含有した培地が、シュートの増殖用に用いられた。発根培地は、IBA(インドール酪酸) か IAA を含有した 1/2 MS 培地かクノッブ液が用いられた。培養開始後 3~12 カ月で、1 カ月あたり 4~10 倍の一定の増殖率が得られた。発根は 70% 以上、再生増殖ユーカリの生存率は 80% 以上であった。*E. citriodora*, *E. torelliana*, *E. grandis*, *E. urophylla* 等やそれらの種間雑種が、このように組織培養で増殖され、2 年間で 25 万本のクローン苗木が山へ植林された。

### 5) 高精油含有ユーカリの増殖

レモン臭の精油を産する *E. citriodora* (レモンユーカリ) や、高精油含量で知られる *E. polybractea* について、組織培養による増殖がなされた。*E. citriodora* の 10~20 年生の精英樹の頂芽をカイネチンと BAP を含有した改変 MS 培地で培養し、8 本以上のマルチプルシュートを得た。シュートの発根には、NAA(ナフタリン酢酸) 含有の White の培地で 2 日処理した後、1/2 MS 培地に移す方法を用いた。このようにして再生増殖した植物体は半数が野外で生き残り、その葉にはシトロネラルやシトロロールを、もとの精英樹同様に高率に含有していた。*E. polybractea* は、オーストラリア東部で精油生産に用いられており、萌芽枝を用いた組織培養によるクローニング手法が開発された。

### 6) 絶滅危惧ユーカリ種の増殖

環境の変化や種子の結実不良などで絶滅が危惧されているユーカリは少なくない。それらを培養で増殖して、再びその植生を回復させることが考えられる。西オーストラリアの希少種の *E. carnabyi* の実生を組織培養で増殖することがなされた。

## 2. ユーカリの組織培養による物質生産

ユーカリ属樹木の二次代謝産物生産機能はきわめて多様である。たとえば、モノテルペンである

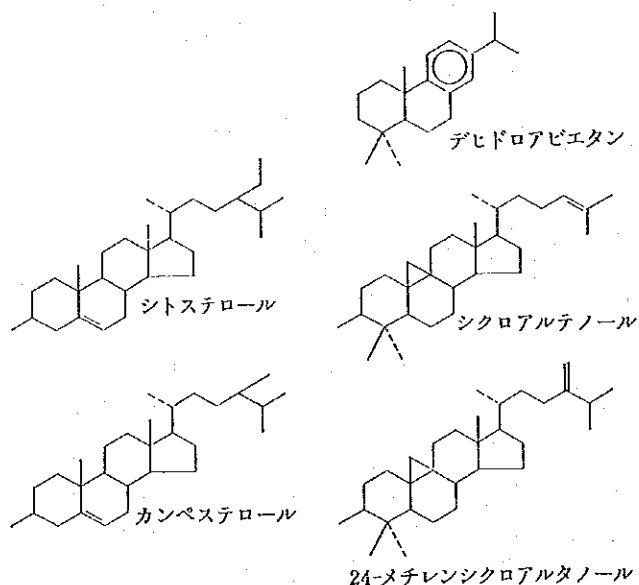
1,8-シネオールを *E. polybractea* が, ルチンを *E. macrorhyncha* や *E. youmani* が, フラボノン(kino) や, 縮合型や加水型タンニンを多くの種で, 商品化が可能に多量に生産する. ユーカリに含まれる各種活性物質についての研究が最近盛んに行なわれている.

発芽阻害成分のグランディノール, 発根阻害成分のGインヒビター, アレロパシー起因物質としてのモノテルペン, 蚊の忌避成分の *p*-メンタン-3,8-ジオールが単離された. そのほか, 抗炎症作用や抗発癌プロモーター作用が認められたユーグロバールや, 抗マラリア活性のあるロブスタジアールA, Bの含有が報告されている. そして, ユーカリ葉の蠟成分の中から強い抗酸化活性を示す  $\beta$ -ジケトン類が見つけれられ, 材に含まれるエラール酸およびその類縁体も抗酸化活性が高いことが判明している.

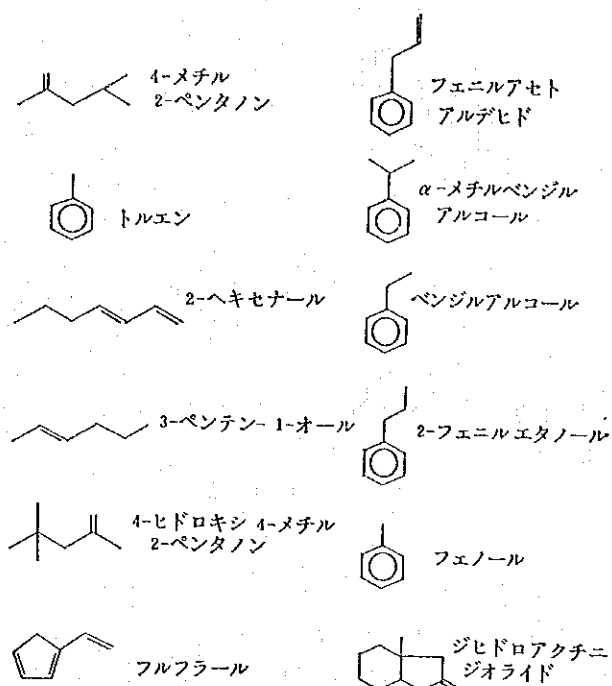
ユーカリ類の組織培養による物質生産については, アントシアニン, タンニン, ステロール等が培養組織や細胞から認められている.

### 1) *E. dives*, *E. radiata* var. *australiana* の培養細胞の成分

胚軸起源のこれらの培養細胞について, その抽出成分を分析したところ, 原植物の葉や枝条に多く含まれる精油成分は, どの培養細胞からも検出されなかったが, 材に含まれるフィトステロール類(第4図)やエラールタンニン類を大量に生産した. とくに, アセトン-クロロホルム可溶不揮発性抽出成分



第4図 *E. dives* の培養細胞のヘキサソ可溶成分.



第5図 *E. radiata* var. *australiana* の培養細胞から検出されたエーテル可溶成分.

は, 材の場合と比較すると8倍の高収量であり, シトステロールや, 24-メチレンシクロアルタノールを多く含んでいた. 一方培養細胞からのエーテル可溶揮発性物質は, 0.08%の収量で, ごく微量であった. GC-MS(ガスクロマトグラフィー-質量分析法)で分析すると, 各種低分子化合物と共に, 葉に特有な2-ヘキセナールが検出された(第5図).

### 2) *E. robusta*, *E. polybractea* の培養細胞の成分

これらの培養細胞では, 加水分解型のタンニンが多く生産され, エラール酸, メチルエラール酸が多く含まれていた. 培地に添加したオーキシンの種類や濃度がフェノール分量に影響を与えた. *E. polybractea* の場合, おもに加水分解型タンニンと関連したフェノール類のみを生産し, 普通, 培養細胞の生重あたり1.2%の総フェノール量であったのが, パラフルオロフェニルアラニン耐性株を選抜すると, いっきに5.3%のフェノール性成分含有量が得られた.

### 3) *E. perriniana* の培養細胞の成分

若い茎から誘導したカルス細胞の成分を分析した例では, フェノール類は生成せず, オレアノリン酸, ウルソリン酸, マスリニン酸, ヒドロキシウロソニン酸等のトリテルペン類を生成していた. 原植物の葉と比較すると, 培養細胞の方が酸化度の進んだ

代謝物が多かった。

#### 4) 培養細胞を用いた物質の生物変換

未利用化合物を付加価値の高い有用な物質に交換するのに、化学的な手法ではない細胞培養による方法は、生物変換 (biotransformation) と呼ばれる。高等植物細胞を用いた例は少ないが、*E. perriniana* では、液体培養中にメントールを投与して、種々のグルコース配糖体や酸化物が生産された。変換物中の *p*-メントール-3,8-ジオールの配糖体は、持続性蚊忌避剤として利用開発中である。今後、高率よく生物変換を行なうために、固定化細胞としてバイオリアクターの利用が有効である。

### 3. ユーカリのプロトプラスト培養

在来の選抜や交雑による育種技術を補ううえで、とくに時間的な短縮という意味で、細胞選抜、細胞融合、遺伝子組換えは重要である。これらに関連して、プロトプラスト (細胞壁を除いた裸の細胞) 培養は基本的な技術の一つである。

*E. saligna* の莖頂を BAP と NAA を含有した B5 培地で液体培養して、苗条原基を作出した。この苗条原基塊をセルラーゼ RS とペクトリアーゼ Y-23 の酵素で処理して、プロトプラストを単離した。プロトプラストの培養は、単独では困難であったので、ほかの植物ケナフのプロトプラストとの共培養を行ない、植物体の再生に成功している。この系を用いて、エレクトロポレーション (電氣的刺激を与えて核酸を導入する方法) により、虫害耐性の遺伝子が導入された。

#### 4. ユーカリの組織培養での外生菌根の接種

菌根菌はリンなどの養分の吸収を助け、森林樹木の成長増大に効果的なことが知られている。*E. marginata* では、*Pisolithus tinctorius* が共生菌として知られているが、樹木のクローン差、成熟度、菌の系統差が、外生菌根の形成に大きく影響することがわかっている。適当な菌の系統を見いだす方法として、莖頂培養により増殖したユーカリに、無菌的に *Pisolithus* を接種して、効率的に共生菌をスク

リーニングし、そのまま鉢出しする方法が開発された。石灰質土壌での植林では、とくに、共生菌を接種しておくことが必要である。

#### おわりに

以上、ユーカリの組織培養の現状を述べた。組織培養の活用の仕方も対象により違っている。日本では街路樹やコアラの餌ぐらいとしてしか知られていないが、とくに途上国では、早生樹として貴重な資源樹木になっている。このユーカリの機能をいっそう開発するために、バイオテクノロジーの基礎技術としての組織培養の果たす役割は、これからも大きいと思われる。

#### 参考文献

- 1) 石井克明：林木の育種，143，5-9 (1987)。
- 2) McComb, J. A., I. J. Bennett: *In* Biotechnology in Agriculture and Forestry 1 Trees (ed. Bajaj, Y. P. S.). Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York Tokyo, 340-362 (1986)。
- 3) 石井克明・福住俊郎・善本知孝：木材学会誌，28，388-392 (1982)。
- 4) 石井克明・善本知孝・福住俊郎：木材学会誌，29，171-174 (1983)。
- 5) 西村弘行：未来の生物資源ユーカリーそのバイオテクノロジーとバイオサイエンス。内田老鶴圃，pp. 274 (1987)。
- 6) 古谷 力：植物組織培養技術の実用化の現状と今後の展望。日本植物組織培養学会第1回植物組織培養コロキウム講演集，40-43 (1988)。
- 7) 古谷 力・折原 裕：組織培養，13，284 (1987)。
- 8) Ito, K., K. Doi, Y. Tatemichi and M. Shibata: *Abst. VIIIth Int. Congr. Plant Tissue. Cell Cult.*, A1-65, p. 19 (1990)。
- 9) Kawazu, T., K. Doi, T. Ohta, Y. Shinohara, K. Ito and M. Shibata: *Abst. VIIIth Int. Congr. Plant Tissue Cell Cult.*, A2-80, p. 64 (1990)。
- 10) Tonkin, C. M., N. Malajczuk and J. A. McComb: *New Phytol.*, 111, 209-214 (1989)。

(いしいかつあき)

農林水産省 森林総合研究所 生物機能開発部)

登録番号  
参照番号

1110

ODC分類	1	環境因子 生物学	
	1	立地因子 気象 位置 土壌 水文学	
質問内容	気候図作成 (乾季、雨季判定法)		
プロジェクト	南スラウエシ治山造林技術計画		
地域 : 国名	東南アジア	: インドネシア	
キーワード	気候図 気象観測 気象区分		
参考文献			
質問者	正木郁夫	回答者	石塚森吉

## 個別技術情報支援のための質問書

プロジェクト名：南スラウェシ治山計画

専門家名：正木郁夫

質問技術テーマ：気候図作成（乾季、雨季判定法）

## 1 質問の背景、プロジェクト活動での位置付け

プロジェクト・サイト内で気象観測（気温、湿度、風速、蒸発、降雨量等）を行っており、その取りまとめに必要なため。

## 2 質問の具体的内容

熱帯林造成技術テキストNO1「熱帯の造林技術」（浅川澄彦著、勸国際緑化推進センター発行）21ページ、「3）環境条件からみた樹種の選定」の中で、WALTER(1961)の気候図形による乾季、雨季の判定法が照会されているが、その他の手法があれば御教授願います。

## 3 期待する回答の範囲

乾季、雨季判定法及びその手法

質問のキーワード：気候区分

希望資料名：

希望指導委員名：浅川澄彦



## 質問内容：乾季・雨季の判別方法

### ” 乾季 (dry season)

1年のうちで降水量が少ない期間をいう。雨季の対語。これはその土地においてほぼ毎年同じころに出現するもので、気候学上の重要な自然季節の一つであり、継続期間が約一か月以上のものをいう。そのため乾季でないときに数週間異常に降水の少ない期間が出現しても、これを乾季とはいわない。乾季を決める降水量、期間についてははっきりした基準はない。” (気象の事典、平凡社、1986)

雨季の開始日・最終日が示された文献もありますが、それを決定する基準を示した文献を知りません。おそらく、半ば経験的に、且つ総合的に判断しているものと思われま

す。気候区分をおこなう研究では、多くの場合、乾季と雨季は蒸発量（あるいは蒸発散量）と降雨量のバランスの問題としてとらえられています。たとえば、More (1933)は、インドネシアの気候を想定し、月100 mmを越える降雨量があればwet（降雨量が蒸発量を上回っているだろうという意味で）、月60 mm未満の降雨量の時をdry（蒸発量が降雨量を下回っているだろうという意味で）、60-100mmをmoist（降雨量と蒸発量のバランスが多かれ少なかれ保たれているだろうという意味で）としています。Walterの方法はこれと基本的に同じ考えですが、さらに気温を導入して経験的により広範な気候下に対応するようにグラフ化したものだといえます。

ある地点の実際の蒸発量が分かればより正確に気候区分できるのですが、蒸発量は観測されることが少ないので、十分な水が供給されたときの蒸発量（可能蒸発散量または蒸発散位 Potential evapotranspirationと呼ばれることがあります。推定しているのはおもに蒸発量です）を他の気象要素から推定する方法が考案されています。しかし、貴プロジェクトでは蒸発量を実際に計測しているということなので、下図のように蒸発量と降雨量を同一グラフにプロットしてみれば、Walterのグラフよりもさらにクリアに雨季と乾季のちがいがはっきりしてくるはずで

蛇足ですが、熱帯の林業地域の気象データは非常に貴重なものなので、できれば全データを印刷して保存されることを望みます。なお、植物の側からみれば、同じ蒸発量・降水量の地域でも土壌の水分保持（供給）能力によって受ける影響が異なります。

Panで計った蒸発量

(または、他の気象要素から推定したもの)

The forest environment: climate

真の { 土壌 } からの蒸発量  
耕地

4.

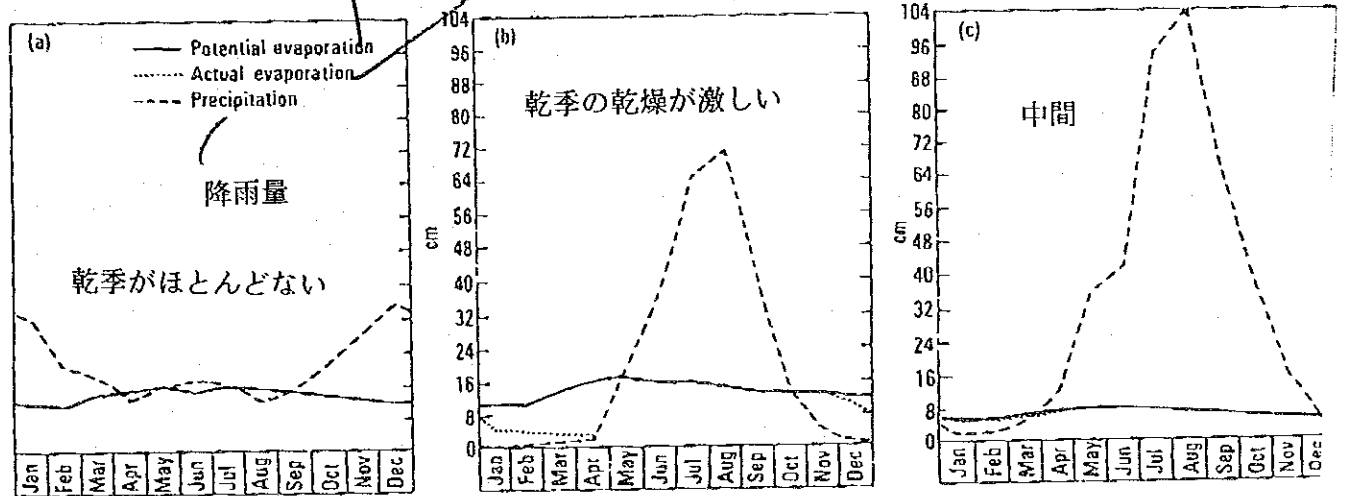


FIG. 4.4. Precipitation and evapotranspiration for three climate types in the Philippines (Kowal 1966, Fig. 3). As in Fig. 4.3 much stronger seasonality of the B/C type climates is clearly seen in (b) and (c). In the lowland seasonal climate (b) potential evaporation is not attained at the driest times of year, owing to water shortage.