

# ヤチカンバ (*Betula tatewakiana*) 冬芽の培養による 植物体再生と大量増殖法の確立

井出 雄 二\*

## Plant Regeneration and Mass Propagation of *Betula tatewakiana* by Winter Bud Culture

Yuji IDE\*

### はじめに

ヤチカンバ (*Betula tatewakiana* M. OHKI et S. WATANABE) は、北海道十勝地方および根室地方の湿原に生育するカバノキ科の樹木であり、もともと生育地が限られている上、開発による環境変化などによる生育地の減少も進んでおり (渡邊, 1994)、絶滅が危惧されている (日本植物分類学会, 1993)。

一方、これまでカバノキ属 (*Betula* spp.) の樹木については、多くの樹種で組織培養による増殖法が確立されており (McCOWN, 1989)、本邦産樹種に限ってもミズメ (*B. grossa*) (IDE, 1987)、ダケカンバ (*B. ermanii*) (IDE and YAMAMOTO, 1990, 井出・山本, 1991)、オノオレカンバ (*B. schmidtii*) (LEE et al., 1986, IDE and NISHIKAWA, 1993)、シラカンバ (*B. platyphylla* var. *japonica*) (SAITO and IDE, 1985a, SAITO and IDE, 1985b, SATO et al., 1986, 井出, 1987)、ウダイカンバ (*B. maximowicziana*) (片寄・玉井, 1989, 井出・山本, 1991) などについて、組織培養による種苗増殖法が確立されている。

そこで、本研究では、ヤチカンバのクローン保存および種苗の大量増殖を可能にし、本種の遺伝子資源の保存に資することを目的に、これまでに開発されてきたカバノキ属樹木の組織培養法を適用し、その増殖法を明らかにした。

本研究の遂行にあたって、東京大学農学部附属北海道演習林の倉橋昭夫講師、井口和信技官には材料の採取に関してご協力を賜った。また、東京大学農学生命科学研究科森林科学専攻齋藤陽子さんには培養実験にご協力いただいた。厚くお礼申し上げる。

### 材料と方法

#### 冬芽からの植物体再生

外植体を得るための材料として、東京大学農学部附属北海道演習林の樹木園に保存されているヤチカンバ 1 個体 (樹齢不詳, 樹高約 2 m) を用いた。

1993 年と 1994 年の 2 月中旬にこの個体から、当年枝を採取し、冬芽をつけた 2 cm 程度の小片に切り分けた。冬芽の鱗片を、ピンセットを用いて剥ぎ取った後、冬芽を小枝からメスを用い

\* 東京大学農学部附属演習林研究部

Research Division of the University Forests, Faculty of Agriculture, The University of Tokyo.

て切り離した。

表面殺菌として、冬芽を、まず、70% エタノール中で1分間攪拌し、次いで有効塩素量1%のアンチフォルミン水溶液中で3分間、さらに3% 過酸化水素水中で3分間、それぞれ攪拌した後、クリーンベンチ内で風乾した。冬芽の基部をメスで少し切り戻した後、冬芽からのシュートの伸長を期待する培地に置床した。冬芽の培養数は30個とした。培地には、WPM (LLOYD and McCOWN, 1980) に、BAP (6-benzylaminopurine) 0.8 mg/l とショ糖 20 g/l を添加した 0.8% 寒天培地を用いた。なお、培地の pH はオートクレーブ前に 5.6 に調整した。

培養条件は、およそ 6,000 lux の蛍光灯照明下、18 時間日長、25°C とした。以下、本研究におけるすべての培養はこの培養環境で行なった。

冬芽の培養によって伸長したシュートは切り取って、発根のため、主要塩類の濃度を 1/2 にした MS 培地 (MURASHIGE and SKOOG, 1962) (1/2MS) に IBA ( $\beta$ -indolebutyric acid) を 0.5 mg/l と NAA ( $\alpha$ -naphthylacetic acid) を 0.02 mg/l 加え、ショ糖を 20 g/l 添加した 0.8% 寒天培地にさしつけた。

発根して再生した植物体は、約 2 ヶ月の間隔でシュートを切り取り、葉を 2 枚程度つけた小片に切り分けた上、上述と同じ発根培地にさしつけて増殖を図った。

### 大量増殖法の検討

冬芽の培養によって得られたクローンを用いて、マルチプルシュートの誘導による大量増殖法を検討した。

試験管内で約 5 cm 程度に育ち、7~8 枚の葉をつけた幼植物体を、1 個の腋芽をつけた長さ約 1 mm の茎軸、長さ約 5 mm の腋芽をつけない茎軸、長さ約 5 mm の葉柄とに切り分けそれぞれを用意した培地に置床した。培地は、WPM に BAP を 0 mg/l または 0.8 mg/l と GA<sub>3</sub> (Gibberellic acid) を 0 mg/l または 5.0 mg/l を組み合わせて添加した 4 種類とした。培地ごとの培養外植体数は 6~10 である。培地のショ糖濃度は 20 g/l、寒天濃度は 0.8% である。培養環境は、冬芽の培養と同じである。

外植体の変化および発生したシュートの数を、培養開始から 2 週間後および 2 ヶ月後に調査した。また、培養開始から 2 ヶ月後に発生していたシュートを切り取って、上述と同じ発根培地にさしつけ、植物体の再生を図った。

## 結果と考察

### 冬芽からの植物体再生

多数の外植体を供試したにもかかわらず、雑菌による汚染を免れた外植体は 1993 年に供試した 2 個だけであった。しかし、培養開始から 1 ヶ月後にはこれらの冬芽から約 2 cm 程度のシュートが伸長した (図-1)。また、このシュートを切り取って発根培地に移植したところ、10 日目には発根が認められ、植物体が再生した。図-2 にその後の試験管内さしきによる継代培養で増殖した植物体を示す。

本研究に用いた冬芽の培養方法は、ミズメ (IDE, 1987)、ダケカンバ (井出・山本, 1991)、ウダイカンバ (IDE and YAMAMOTO, 1990, 井出・山本, 1991) と培地およびホルモンの条件を除き同じであり、他のカバノキ属樹木で用いられている冬芽の培養方法が本種にも有効であること

が明らかになった。しかし、雪中での冬芽の採取は、雑菌による外植体の汚染の一原因と考えられ、今後適切な表面殺菌手法の検討が必要と思われる。

### 大量増殖法の検討

培養開始から2週間目の各外植体の様子を表-1に示す。

葉柄および茎軸の培養では、外植体が全体的に膨らむ膨潤化および外植体の切断面の肥大が認められた。しかし、その後の培養では新たな変化は見られず、培養開始から2ヶ月目にはほとんどの外植体は褐変してしまった。外植体両端の肥大は、シラカンバの葉柄や茎軸の培養ではその後不定芽の形成に至る変化として重要であるが (SAITO and IDE, 1985b, 井出, 1987), 本研究では不定芽の形成は認められなかった。

シラカンバの場合  $GA_3$  の添加量は  $0.5 \text{ mg/l}$  とわずかでも不定芽形成が誘導されたが、ヤチ

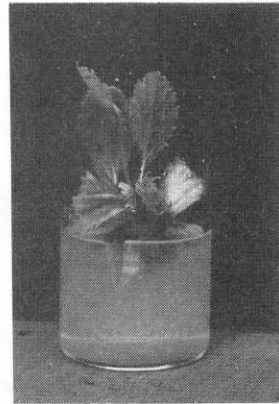


図-1 培養開始から1ヶ月後の冬芽からの葉の展開。

Fig. 1. Sprouting of leaves from a winter bud of *Betula tatewakiana* after one month of culture.



図-2 試験管内さし木により増殖した幼植物体。

Fig. 2. Plantlets regenerated by *in vitro* cutting of internodal segment of a plantlet regenerated by winter bud culture.

表-1 部位別の継代培養における培養開始から2週間後の変化  
Table 1. Changes in different tissues after two weeks of subculture

外植体 Explant	反応 Reaction	BAP (mg/l)	0		0.8	
		GA <sub>3</sub> (mg/l)	0	5.0	0	5.0
葉柄 Petioles	無変化 (%) No reaction		100.0	90.0	37.5	11.1
	全体の膨潤 (%) Swelling of whole explant		0	10.0	37.5	11.1
	両端の肥大 (%) Swelling of both ends		0	0	25.0	77.8
	供試外植体数 Number of explant		6	10	10	9
茎軸 Inter nodal segments of shoot	無変化 (%) No reaction		10.0	80.0	0	22.2
	全体の膨潤 (%) Swelling of whole explant		90.0	10.0	100.0	77.8
	両端の肥大 (%) Swelling of both ends		0	10.0	0	0
	供試外植体数 Number of explant		10	10	10	9
腋芽 Axillary buds	シュートの伸長 (%) Shoot elongation		100.0	100.0	100.0	100.0
	伸長したシュートの数 (No.) Number of elongated shoot		1.0	1.0	2.00 (1-3)	1.75 (1-3)
	平均シュート長 (mm) Mean length of shoots		1.25 (1-4)	0.28 (0-2)	7.10 (1-18)	5.14 (1-10)
	供試外植体数 Number of explant		7	10	7	8

( ) 内の数値は範囲を示す。  
Numbers in parentheses show deviation.

カンバでは、データは示さないが予備的な実験において、0.5 mg/l の添加では不定芽の形成は起こらなかった。不定芽形成に関しては、更に検討が必要と考える。

一方、腋芽の培養では、すべての外植体から長短の差こそあれ、培地によらずシュートが伸長した。また、BAP 添加培地では、複数のシュートが発生するものが認められた。引き続き培養を行った結果、培養開始から46日目には、表-2 および図-3 に示すように、BAP を添加した培地では多数のシュートが伸長していた。一方、BAP 無添加の培地では、一外植体からの複数のシュートの発生は認められなかった。

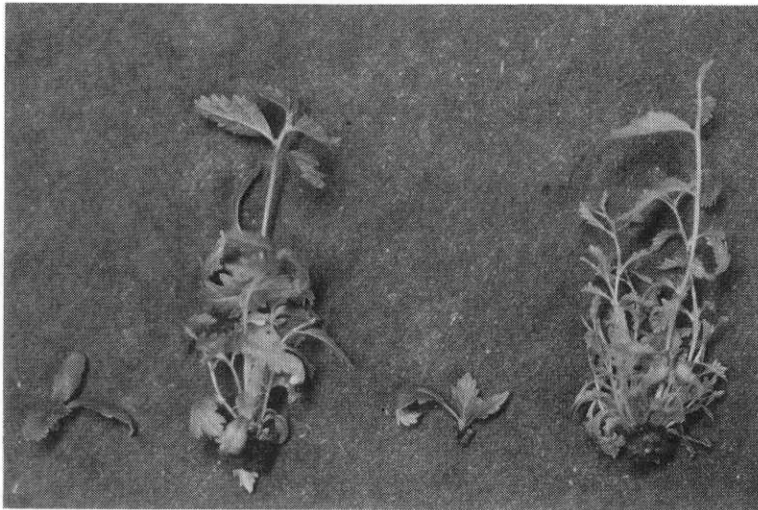
BAP 添加培地において、一外植体当り発生したシュートの数は、GA<sub>3</sub> を添加した場合、無添加の場合の約2倍であった。しかし、平均シュート長は両者とも20 mm 程度で、大きな差は認められなかった。

BAP 無添加培地では、GA<sub>3</sub> を添加しなかった場合、ほとんどの外植体のシュート長は6 mm 以下であったが、発根した外植体が唯一つ認められ、これからは16 mm と最も長いシュートが伸長した。一方、GA<sub>3</sub> を添加した場合には、ほとんどのシュートは1 mm 以下であり、一外植体

表-2 継代培養開始から2ヶ月後における腋芽からのシュートの伸長

Table 2. Shoot elongation from axillary bud after two months of subculture

	BAP (mg/l)	0		0.8	
		GA <sub>3</sub> (mg/l)	0	5.0	0
平均シュート数 Mean number of elongated shoots	(No.±S.D.)	1.0	1.0	8.00±5.83	17.29±9.67
平均シュート長 Mean length of elongated shoots	(mm±S.D.)	4.86±5.37	3.14±7.88	20.63±14.29	18.26±12.09



BAP	0	0.8	0	0.8	mg/l
GA <sub>3</sub>	0	0	5.0	5.0	mg/l

図-3 BAP および GA<sub>3</sub> を添加した WPM 上でのマルチプルシュートの形成。Fig. 3. Multiple shoot formation from axillary buds of *in vitro* propagated plantlets on the WPM containing BAP and GA<sub>3</sub> in combination.

腋芽の培養を開始してから46日後。

After 46 days culture of axillary buds.

だけが21 mmのシュートを伸長した。

これらの結果から、継代培養された幼植物体の腋芽から、複数のシュートを伸長させるにはBAPの添加が必須であり、これにGA<sub>3</sub>を5.0 mg/l添加することにより、さらに多くのシュートの発生を誘導出来ることが明らかとなった。オノオレカンバの芽生えの組織培養でも、GA<sub>3</sub>とBAPを組み合わせて添加することが、子葉節からのマルチプルシュートの誘導に有効であった(Ide and NISHIKAWA, 1993)。また、シラカンバの不定芽形成においても両者の組み合わせでマルチプルシュートが形成されていることから(井出, 1987, 河合, 1991)、カバノキ属樹木一般に、GA<sub>3</sub>とBAPの組み合わせが、マルチプルシュートを誘導する効果があるものと考えられた。

これらのシュートのうち10 mm以上に伸長していたものを切り取って、発根培地にさしつけ

たところ、さしつけ5日目には発根しているシュートが認められ、さしつけ17日目にはすべてのシュートで発根が認められた。

以上の結果より、ヤチカンバでも他のカバノキ属樹木と同じように、冬芽の培養による植物体再生が可能であることが明らかとなった。また、得られた植物体の腋芽を、BAPとGA<sub>3</sub>を組み合わせさせて添加した培地において培養することにより、多数のシュートを誘導し、幼植物体を大量に増殖することが可能となった。このことにより、組織培養による本種の遺伝子資源の保存法が確立されたといえる。今後、本方法を実際に保存の必要のある地域の植物体に適用し、遺伝子資源の保存を行って行きたい。

## 要 旨

ヤチカンバの冬芽を BAP 0.8 mg/l を添加した WPM 上で培養することによりシュートを伸長させ、さらにそのシュートを切り取って、IBA 0.5 mg/l と NAA を 0.02 mg/l 添加した 1/2MS 培地にさしつけることで、発根させ幼植物体を再生させることができた。また、再生した幼植物体の茎軸、葉柄および腋芽を、BAP 0.8 mg/l と GA<sub>3</sub> 5.0 mg/l を組み合わせさせて添加した WPM で培養したところ、BAP を添加した培地で、腋芽からマルチプルシュートを誘導することができ、種苗の大量増殖が可能であることが明らかになった。また、GA<sub>3</sub> の添加は、BAP と併用した場合にシュート数の増加に有効であった。

キーワード：ヤチカンバ、組織培養、遺伝子保存、大量増殖

## 引 用 文 献

- 井出雄二 (1987) シラカンバの組織培養によるクローン大量増殖法に関する研究. 静岡県林試研報, 16, 56 pp.
- IDE, Y. (1987) *In vitro* clonal propagation of mature Japanese cherry birch. J. For. Soc., 69, 161-163.
- IDE, Y. and NISHIKAWA, H. (1993) *In vitro* propagation of *Betula schmidtii* from germinated seedlings. Bull. Tokyo. Univ. For., 89, 163-169.
- IDE, Y. and YAMAMOTO, S. (1990) *In vitro* plantlet regeneration of mature monarch birch (*Betula maximowicziana*) by winter bud culture. J. Jpn. For. Soc., 72, 147-150.
- 井出雄二・山本茂弘 (1991) ウダイカンバとダケカンバの冬芽の培養による植物体再生—培養開始時期および冬芽の枝上での位置の影響—. 東大演報, 85, 27-42.
- 片寄 麟・玉井 裕 (1989) ウダイカンバ成木の成長点培養. 林木の育種「特別号」1988, 46-47.
- 河合昌孝 (1991) 継代培養可能なシラカンバ苗条体の誘導と増殖. 奈良県林試研報, 21, 13-20.
- LEE, B. C., KIM, J. H., PARK, J. I. and LEE, S. K. (1986) Rapid micropropagation of *Betula* spp. through *in vitro* tissue culture. Res. Rep. Inst. For. Gen. Korea, 22, 132-138.
- LLOYD, G. and McCOWN, B. (1980) Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia* by use of shoot-tip culture. Comb. Proc. Int. Plant. Prop. Soc., 30, 421-427.
- McCOWN, B. H. (1989) Birch (*Betula* spp.). In Biotechnology in agriculture and forestry, vol. 5 Trees II (Bajaj, Y. S. P. Ed.). 324-341, Springer-Verlag, Berlin.
- MURASHIGE, T. and SKOOG, S. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Pysiol. Plant., 15, 437-497.
- 日本植物分類学会編 (1993) レッドデータブック—日本の絶滅危惧植物—. 141, 農村文化社, 東京.
- SAITO, A. and IDE, Y. (1985a) *In vitro* plantlet regeneration from adventitious buds induced on cuttings of peeled twigs of Japanese white birch. J. Jpn. For. Soc., 67, 282-284.
- SAITO, A. and IDE, Y. (1985b) *In vitro* plantlet regeneration from adventitious buds induced by petiole culture in Japanese white birch. J. Jpn. For. Soc., 67, 373-375.

SATO, A., IDE, Y. and SAITO, A. (1986) Tissue culture technology in the rapid clonal propagation of Japanese white birch. J. Jpn. For. Soc., **68**, 343-346.

渡邊定元 (1994) 樹木社会学. 406, 東大出版会, 東京.

(1995年4月28日受付)

(1995年7月3日受理)

### Summary

Winter buds of *Betula tatewakiana* were cultured on WPM containing 0.8 mg/l of BAP. Shoots were successfully elongated from the buds on the medium. The shoots were cut and inoculated on to 1/2MS containing 0.5 mg/l of IBA and 0.02 mg/l of NAA. They were successfully rooted on the medium and regenerated perfect plantlets. Internodal segments, petioles and axillary buds were isolated from the plantlet and cultured on a medium containing 0.8 mg/l of BAP and 5.0 mg/l of GA<sub>3</sub>. Multiple shoots were elongated from the axillary buds cultured on a medium containing 0.8 mg/l of BAP. GA<sub>3</sub> concentration in the medium was effective in the proliferation of shoots when it was added with BAP.

**Key words:** *Betula tatewakiana*, Tissue culture, Gene conservation, Mass propagation

## Abstract

### Estimation of Mast Year of Japanese Beech (*Fagus japonica* MAXIM.) by the Observation of Peduncle Scar

Mikio KAJI and Haruo SAWADA

Peduncle scars of branches of Japanese beech (*Fagus japonica* MAXIM.) were observed in order to estimate the mast years of a stand dominated by Japanese beech in Chichibu Mountains, Central Japan. The years showing high appearance frequency (%) of peduncle scars coincided well with the mast years estimated by using seed traps in the stand. As a consequence, this method is considered to be feasible for the estimation of mast years of stands dominated by Japanese beech for a period of ten years.

### Plant Regeneration and Mass Propagation of *Betula tatewakiana* by Winter Bud Culture

Yuji IDE

Winter buds of *Betula tatewakiana* were cultured on WPM containing 0.8 mg/l of BAP. Shoots were successfully elongated from the buds on the medium. The shoots were cut and inoculated on to 1/2MS containing 0.5 mg/l of IBA and 0.02 mg/l of NAA. They were successfully rooted on the medium and regenerated perfect plantlets. Internodal segments, petioles and axillary buds were isolated from the plantlet and cultured on a medium containing 0.8 mg/l of BAP and 5.0 mg/l of GA<sub>3</sub>. Multiple shoots were elongated from the axillary buds cultured on the medium containing 0.8 mg/l of BAP. GA<sub>3</sub> concentration in the medium was effective in the proliferation of shoots when it was added with BAP.