

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——

井出雄二**・山本茂弘***

Plantlet Regeneration by Winter Bud Culture of *Betula maximowicziana* and *Betula ermanii*

—Seasonal trends in bud culture and positional effects of winter buds—

Yuji IDE** and Shigehiro YAMAMOTO***

I. はじめに

組織培養によるクローン増殖は、林木の育種を実行する上できわめて有効な手段となるものと考えられている。特に、選抜育種ではプラス木クローンの確保が重要であるが、組織培養によれば安定的にクローン増殖が行える利点がある。すなわち、組織培養によるクローン増殖法は、単にさしき、つぎきなどの従来法での成木のクローン増殖が困難な樹種だけでなく、樹木一般の育種に有効な手法といえる。

カバノキ属 (*Betula*) の樹木は広く広葉樹用材として利用され、また、今後バイオマス資源としての利用が期待されている。わが国では、ウダイカンバ (*B. maximowicziana* REGEL), ダケカンバ (*B. ermanii* CHAM.), シラカンバ (*B. platyphylla* SUKATCHEV var. *japonica* (MIQ.) HARA), ミズメ (*B. grossa* SIEB. et ZUCC.) の4種が一般に重要な樹種とされている。このうち、バイオマス生産用樹種として注目されているシラカンバは、すでに組織培養によるクローン大量増殖法が確立され (SAITO and IDE, 1985 a, SAITO and IDE, 1985 b, SATO *et al.*, 1986, IDE, 1987 a, 細井, 1989), また、人工種子化の技術も確立されている (KINOSHITA *et al.*, 1990)。また、用材生産向けのカンバについては、ミズメは冬芽の培養によるクローン増殖法 (IDE, 1987 b) が、ウダイカンバについては生長点培養 (片寄ら, 1988), えき芽の培養 (McCOWN, 1989), および冬芽の培養法 (IDE, 1990) が確立されており、それぞれの育種への応用が期待されている状況にある。

一般に、組織培養の外植体としては採取直後の新鮮な材料が求められる。特に、生育期間中の組織を用いた場合には、植物の萎凋やバクテリアの繁殖などをさけるため、材料採取後短時間の内に培養に移さなければならない。しかし、実際のプラス木は、培養施設から遠隔地に生育することがほとんどで、長距離の材料運搬を強いられるため、生育期間中の培養は非常に困難と考えられる。

これを克服するための方法として、原口 (1989) は生育期間中のサクラのシュートの培養に際

* 本論文は第102回日本林学会大会で口頭発表した

** 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.

*** 静岡県林業技術センター
Shizuoka Prefecture Forestry Technology Center.

して、外植体の運搬のための保存液を用いることを検討し、2時間半程度の輸送に一定の効果があることを報告している。

しかしながら、生長休止期の冬芽を用いれば、そのような手法をとらずに、材料の長距離の運搬やある程度の保存も可能と考えられる。また、実際のプラス木の選定作業は生育休止期に行われることが普通であり、選抜のための調査と増殖材料の採取を同時に行える利点がある。このようなことから、冬芽の培養によるクローン増殖法は、現実の育種において有効であると期待される。

しかし、実際の選抜作業では、効率のよいクローン増殖を達成する必要がある。そのためにはまず、培養に適した冬芽の種類や採取時期を明らかにしておくことが必要である。先の、ミズメ (IDE, 1987b) およびウダイカンバ (IDE and YAMAMOTO, 1990) についての報告では、培養方法の確立に主眼が置かれ、培養に供する冬芽の条件については、検討されていない。また、ダケカンバについてはこれまでに組織培養に関する報告は全く無い。

本報告は、ウダイカンバとダケカンバの成木を材料に、培養に供する冬芽について、培養時期、シュート内での冬芽の位置について検討し、冬芽の培養による増殖を効率よく行うための条件を明らかにする。また、新たにダケカンバについて冬芽の培養による植物体再生法を明らかにする。

なお、本研究では、材料の選定、採取および輸送に関して、東京大学北海道演習林倉橋昭夫博士に、全面的なご協力を賜った。また、同演習林研究部渡邊元博士には、ご多忙の中本論文の校閲を賜った。それぞれ厚くお礼申し上げる。

II. 材料と方法

1. 供試材料と実験内容

東京大学農学部附属北海道演習林東山育種樹木園に植栽されている、30年生の北海道産ウダイカンバおよびダケカンバの成木それぞれ2個体を供試木とした（高橋ら, 1974, 全国大学演習林協議会, 1989）。供試木の大きさ等を表-1に示す。供試木から、1989年10月から1990年3

表-1 供試木の概要
Table 1. Outlines of sample trees

樹種 Species	個体 No. Individual No.	樹高* Height* (m)	胸高直径* DBH* (cm)	種子産地 Provenance	植栽年 Year of plantation*
ウダイカンバ <i>Betula maximowicziana</i>	M1	18	26	北海道苫小牧** Tomakomai, Hokkaido	1959
	M2	19	28	"	"
ダケカンバ <i>Betula ermanii</i>	E1	14	19	北海道芦別岳*** Ashibetsu-dake, Hokkaido	1959
	E2	15	20	"	"

* 1990年4月現在
At april, 1990

** 系統番号: S-296 (高橋ら, 1974), No. 359 (全国大学演習林協議会, 1989)
Family number: S-296 or No. 368

*** 系統番号: S- (高橋ら, 1974), No. 359 (全国大学演習林協議会, 1989)
Family number: S- or No. 359

表-2 冬芽の培養時期と培養した冬芽の種類

Table 2. Inoculation seasons and kinds of cultured winter buds

冬芽採取日 Collection of winter buds	培養開始日 Date of inoculation	採取から培養までの日数 Days between collection and inoculation	培養した冬芽の種類と数 Kinds and number of cultured buds
1989. 10. 23	1989. 10. 27	4	P*(5), L (位置別各5)**
11. 28	11. 30	2	"
12. 25	12. 27	2	"
1990. 1. 22	1990. 1. 24	2	P*(10)
2. 19	2. 22	3	"
3. 19	3. 23	4	"

* 仮頂芽 Pseudo-terminal buds.

** 側芽 Lateral buds (five for each pisotion).

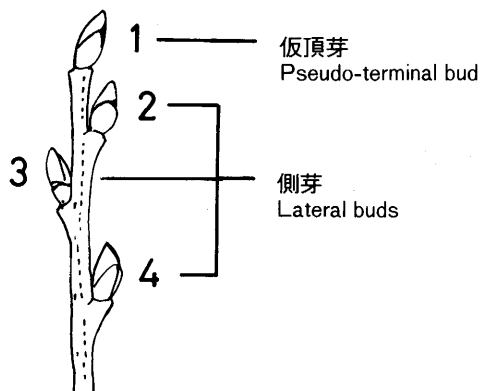


図-1 冬芽の位置番号

Fig. 1. Position number of winter bud.

月までの6カ月にわたり、ほぼ1カ月間隔で6回、冬芽をつけた当年生枝を採取した。ウダイカンバについては、冬芽を5~6個つけた、長さ10~20 cm、直径3~6 mmの枝を、ダケカンバについては、冬芽を4~5個つけた長さ6~15 cm、直径2~4 mmの枝を、それぞれ採取し、冬芽を培養に供した。

培養時期および試験内容について表-2に示す。1回目から3回目の培養では、冬芽の枝上での位置の違いによるシュートの伸長状況を比較した。1個体5本の当年生枝を用い、ウダイカンバでは先端の仮頂芽1個と側芽3個、すなわち1枝当たり4個の冬芽を供試し、ダケカンバ

では、1枚当たり仮頂芽1個と側芽2個の、計3個の冬芽を供試した。便宜上、図-1に示すように、仮頂芽を1番とし、順次下に側芽に2から4番まで番号をつける。また、4回目から6回目までの培養では、各個体仮頂芽のみ10個ずつ培養し、1回目から6回目までを通じ、培養時期による仮頂芽からのシュートの伸長状況の違いを比較した。

冬芽からのシュートの伸長状況は、培養開始から30日後、60日後、90日後の3回それぞれ調査し、明かなシュートの形成が認められたものの数とその長さを測った。

また、培養開始から90日後に10 mm以上に伸長していたシュートは、外植体から切り離し、発根培地にさしつけ植物体の再生を確認した。

2. 冬芽の培養方法

採取した枝は、ビニール袋に入れ常温で東京まで郵送した。材料は受取後直ちに培養に供した。結果として、培養開始は材料採取の2~4日後となった。枝は節ごとに冬芽を1個ずつつけた、約2 cmの小片に切り分けた。次いで、先の尖ったピンセットを用いて、冬芽の外側の3~4枚の鱗

表-3 基本培地の組成*

Table 3. Components of the basic medium*

		(mg/l)	
NH ₄ NO ₃	400	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25
KNO ₃	480	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025
CaCl ₂	440	CoCl ₂	0.025
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.8
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	380	Na ₂ -EDTA	37.3
H ₃ BO ₃	6.2	Thiamine HCl	0.4
MnSO ₄ ·4H ₂ O	16.9	<i>myo</i> -Inositol	100
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6	Sucrose	20,000
KI	0.3	Agar	8,000

* 改変 ANDERSON 培地 (ANDERSON, 1986)
Modified ANDERSON's medium (ANDERSON, 1986)
pH は KOH と HCl を用いて 5.8 に調整した
pH was adjusted at 5.8 by KOH and HCl

片をはぎ取った。メスを用いて冬芽を枝から切り離し、外植体として用いた。外植体は、70%エタノールに1分間浸した後、0.3%昇こう水溶液中に20分間浸し表面殺菌し、次いで、十分な量の滅菌水で3回すすいだ後、基部を滅菌したメスでわずかに切り戻し、用意した培地に置床した。培養物は25°Cの恒温条件、約5,000 luxの蛍光灯照明下、16時間日長において培養した。

シュートの伸長を期待する培地として、ウダイカンバの冬芽の培養についての報告 (Ide, 1990) を参考に、BAP (6-benzylaminopurine) を 1.6 mg/l 添加した改変 ANDERSON 培地 (ANDERSON, 1986) を用意した (表-3)。また、シュートの発根には、同じ改変 ANDERSON 培地に NAA (α -naphthylacetic acid) を 0.02 mg/l, IBA (β -indolbutyric acid) を 0.5 mg/l 添加したものを用意した。これらはいずれも KOH と HCl を用い pH を 5.8 に調整した、0.8%寒天培地とし、25 mm × 110 mm の培養容器に約 10 ml ずつ分注し、120°Cで20分間オートクレーブした。

III. 結果と考察

1. ウダイカンバ

1) 培養経過の概要

試験期間を通じての、ウダイカンバ冬芽の一般的な培養経過は、以下のとおりである。

培養時期や冬芽の位置によらず、培養開始から2~3日で冬芽が膨らみ始め、培養1~2週間目までには1~3枚の葉の展開が認められた。また、この時期までに、冬芽の基部にカルスの形成が起こり、旺盛な増殖を示した。

明かなシュートの形成は、早いものでは培養開始から1週間目に起こった。しかし、シュートの多くは、増殖してきたカルスに包み込まれてしまい、以後の伸長が阻害されたため、発根培地へ移植可能な大きさに生育したものは少なかった。シュートの形成が起こらなかった冬芽も、すべてカルスの増殖によって、生長点が包み込まれてしまった。カルスによってシュートの生長が阻害されてしまった冬芽は、やがてカルスや展開した葉を含めて褐変し、培養開始から60日目ごろから順次枯死していった。ウダイカンバにおける、このような外植体基部の旺盛なカルスの

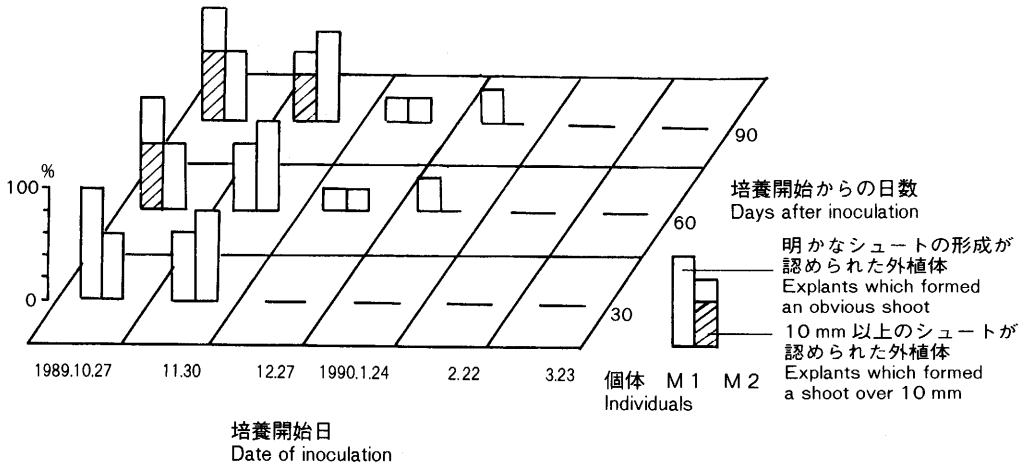


図-2 培養開始時期のちがう仮頂芽からのシュートの形成および伸長のようす(ウダイカンバ)

Fig. 2. Shoot formation and elongation from pseudo-terminal buds which inoculated at different season (*Betula maximowicziana*).

増殖によるシュートの生育阻害は、McCOWN (1989) によって既に指摘されており、ウダイカンバの組織培養における一般的な傾向と考えられる。

そのようなカルスによる阻害にもかかわらず、シュートが連続して伸長した外植体では、やがてカルスが褐変したものの、培養開始から 90 日目までの観察では、シュート自体には何等変化は起こらず、発根培地へ移植することが可能であった。

2) 培養開始時期によるシュート形成のちがい

仮頂芽からのシュートの形成および伸長の状況を培養開始時期別に調査した結果を、図-2 に示す。ここで、1 mm 以上の茎軸が確認された外植体についてのみ、明かにシュートが形成されたものとして記録した。

10月27日と11月30日に培養を開始した場合には、M1, M2 両個体とも培養開始後 30 日以内にシュートの形成が認められた。特に、M1 では全ての外植体からのシュートの形成が認められた。しかし、12月27日の培養開始では、30 日以内のシュートの形成は認められず、30 日目から 60 日目の間にシュートの形成が起こった。1月24日の培養開始では、M1 のみ 60 日目の観察でシュートの形成が認められたが、M2 では全く見られなかった。それ以降、2月22日と3月19日の培養開始では、両個体とも全くシュートの形成は認められなかった。また、これらのシュートが伸長を続け、発根培地に移植できる 10 mm 以上の長さになったものの数は、M1 では、10月27日に培養開始したもので 60 日目に 3 本、11月30日培養開始では 90 日目に 2 本が観察された。しかし、それぞれ最初に確認されたシュートの他には、新たに伸長してきたシュートは認められなかった。一方、M2 では 10 mm 以上に伸長したシュートは、90 日目までの観察では全く認められなかった。また、90 日目までに 10 mm 以上に伸長していなかったシュートは、その後全く伸長しなかった。

これらの結果から、ウダイカンバの冬芽の培養で外植体として仮頂芽を用いた場合、本試験の範囲内では、培養開始時期が遅れるにしたがってシュートの形成開始が遅くなること、それに

表-4 静岡と北海道における培養開始時期の気温

Table 4. Temperatures of inoculation seasons at Shizuoka and Hokkaido

冬芽採取場所 Place of collecting winter buds	冬芽採取日 Date of collection	冬芽採取前1カ月間の気温(°C) Temperature during one month before collection of winter buds		
		平均気温 Mean	最高気温 Maximum	最低気温 Minimum
静岡県浜北市* Hamakita, Shizuoka	1989. 1. 10	7.34	17.6	-1.9
北海道富良野市** Furano, Hokkaido	1989. 10. 23	10.53	19.0	-0.3
	1989. 11. 28	3.72	15.3	-3.4
	1989. 12. 25	-3.42	12.7	-17.8

* 静岡県林業試験場苗畑
Nursery of Shizuoka Prefecture Forestry Technology Center

** 東京大学北海道演習林樹木園
Arboretum of Tokyo University Forest in Hokkaido

伴ってシュートの伸長自体も悪くなることがわかった。シュートの伸長が認められなかったり、伸長が停止してしまった原因の一つは、外植体基部から増殖したカルスによるものと考えられる。

また、同一の培地条件で培養したにもかかわらず、M1では発根培地に移植可能なシュートが得られ、M2では全く得られなかった。これは、個体によって培地に対する反応性や培養適期が異なるためと考えられる。

M1を基準にしてみると、発根培地に移植可能なシュートを得るには、遅くとも11月下旬までに培養を開始する必要がある。早期に培養を開始した冬芽のシュート形成が良好なのは、シュートの伸長が良くなかったM2の場合でも、12月27日以降ではほとんどシュートの伸長がみられない事実からも、普遍的なものといえよう。

ところが、静岡県に植栽されたウダイカンバを用いた場合には、1月下旬に培養を開始したにもかかわらず、シュートは十分に伸長した(IDE and YAMAMOTO, 1990)。静岡と北海道の、供試冬芽採取直前1カ月間の平均気温および最高気温、最低気温を表-4に示す。これによると、静岡の1988年1月10日の値は、北海道における1989年10月23日と11月28日の値のほぼ中間である。このことから、静岡と北海道のシュートの伸長状況の違いの原因として、供試冬芽採取時の気温条件が関与しているものと推測される。また、個体の遺伝的違いに起因する、冬芽の休眠ステージの違いなども関係するものと予想されるが、現在のところ明かではない。

本試験の結果からは、北海道に生育するウダイカンバの冬芽の培養では、培養開始時期を10月下旬頃とするのが、現在のところ適当と判断される。しかし、上に述べたような気温条件との関係が推測されることから、事業的に増殖を進める際には、培養時期等について予備的な試験・調査を行う必要があるものと思われる。

一方、片寄ら(1989)は、ウダイカンバ冬芽から摘出した成長点の培養において、北海道札幌市で3月に採取した材料を用いて植物体の再生に成功している。この点については今後さらに検討する必要がある。

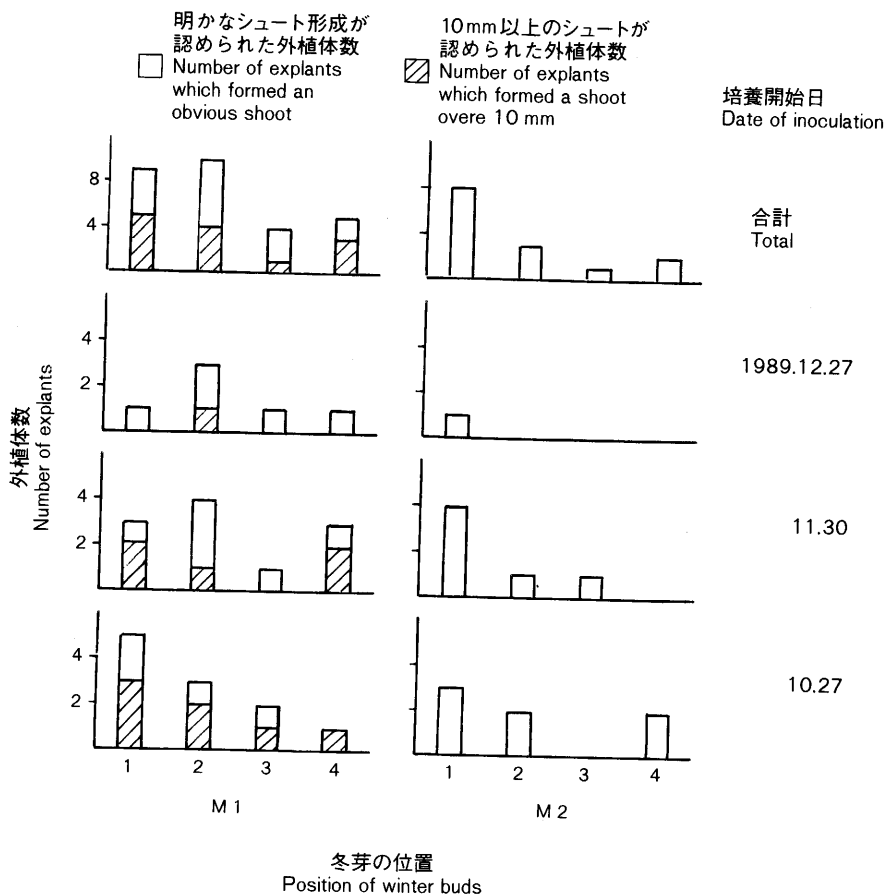


図-3 冬芽の位置によるシュートの形成および伸長のちがい(ウダイカンバ)
 培養開始から90日目. 冬芽の位置は, 仮頂芽を1とし, 以下, 下方に向かって側芽に2から4までの番号をつけた

Fig. 3. Shoot formation and elongation from winter buds which located different position on one-year-old twigs (*Betula maximowicziana*).
 Ninety days after inoculation. Position of winter buds were denoted as follows; 1, pseudo-terminal bud; 2-4, lateral-buds numbered downward.

3) 培養に供する冬芽の位置によるシュート形成のちがい

冬芽の位置別のシュートの形成とその伸長状況を図-3 に示す。全体としてみると、シュートの形成は、M1, M2 とともに培養開始時期が遅くなるにしたがって悪くなる傾向が認められる。これは、1) で仮頂芽について示した事と一致する。

10月27日のM1及び11月30日のM2では先端から下に向かってシュートの形成が悪くなっている。他では、必ずしもそのような一定の関係は見られないが、大きく先端の2芽と下側の2芽とにわけてシュートの形成状況を比べると、M1では68%, M2では79%のシュートが上の2芽から形成され、上の2芽の方が下の2芽に比べ常に優れていることがわかる。また、10mm以上のシュートは、M2では認められなかったが、M1では伸長したもののうち69%が先端

に近い2芽からのものであった。

これらから、ウダイカンバでは、先端の仮頂芽とそのすぐ下の側芽とを外植体として用いることが、効率の良い増殖につながるものと結論される。

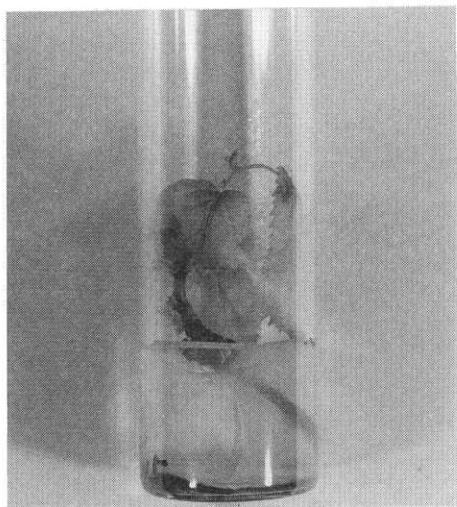


図-4 発根培地上で再生したウダイカンバの幼植物体
発根培地へ移植3か月後、培養びんの直径は20 mm

Fig. 4. Regenerated plantlet of *Betula maximowicziana* on rooting medium. Three month after transplanting to rooting medium. Diameter of culture tube was 20 mm.

4) 植物体の再生

冬芽の位置別の培養に供試した、M1の10 mm以上に伸長したシュート13本を、それぞれ培養開始時期ごとに、培養開始から90日目に外植体から切り取って発根培地にさしつけた。さしつけたシュートの平均長は14 mmであった。その結果、発根培地に移植後1週間目ごろからシュート基部にカルスの形成が始まった。しかし、ほとんどすべてのシュートは基部のカルスの増殖が見られただけで、発根は観察されなかった。11月30日培養開始の1本だけが、発根培地へ移植後2週間目に発根した(図-4)。発根培地に移植後4週間目に調査した発根状況を表-5に示す。

IDE and YAMAMOTO (1990)の結果では、9本のシュートを供試して30日後に55.6%の発根率が得られている。一方、本試験では13本を供試して7.7%と低い値であった。この原因として、使用した発根培地の違いや個体間差など

表-5 発根培地に移植後4週間目に発根していたシュートの数(ウダイカンバ; M1)*
Table 5. Number of rooted shoot after 3 weeks of transplantation to rooting medium (*Betula maximowicziana*; M1)*

冬芽の位置 Position of bud	冬芽の培養開始日 Date of winter buds' inoculation			合計 Total
	10/27	11/30	12/27	
1	0/3**	0/2	/0	0/5
2	0/2	0/1	0/1	0/4
3	0/1	/0	/0	0/1
4	0/1	1/2	/0	1/3
Total	0/7	1/5	0/1	1/13

* 培養開始から90日目に、10 mm以上に伸長していたシュートを発根培地に移植
Shoots elongated over 10 mm at 90 days after inoculation of winter buds were transplanted to rooting medium.

** 発根数 (Number of rooted shoot)/シュート数 (Number of cultured shoot)

が考えられる。特に、本試験においては、シュート基部にカルスが形成されたことが、発根を阻害した大きな要因であると考えられる。カルス形成が促進される原因として、発根培地中のオーキシニベルが高すぎることがあげられる。Ide and YAMAMOTO (1990) の場合、改変 IS 培地に NAA を 0.0002 mg/l 添加した培地を用いており、今回用いた培地は、オーキシニ量が多すぎたものと考えられる。片寄 (1989) らは、シュート基部を 50 ppm IBA で短時間浸漬処理することにより発根植物を得ているが、培地中には NAA が 0.02 mg/l 含まれるのみであり、発根促進とカルス形成の抑制の両面から考えると、この方法がウダイカンバの増殖には適当であると推察される。

2. ダケカンバ

1) 培養経過の概要

試験期間を通じての、ダケカンバ冬芽の一般的な培養経過は、以下のとおりである。

E1 の冬芽は、培養開始から 1 週間目ごろから膨らみ始め、2~3 週間目には 1~2 枚の葉を展開した。しかし、冬芽の一部は、やや膨らみ始めた時点で褐変し、やがて枯死してしまった。また、E2 では、ほとんどの冬芽が、培養開始 4~5 日目から褐変し始め、やがて枯死してしまった。この原因は明かでないので、実験方法を含めて今後検討を必要とする。

葉を展開した冬芽は、培養開始から 30~90 日目の間に、ほとんどがシュートを形成し、それらの大部分は伸長して、培養開始から 90 日目までに 10 mm 以上になり、発根培地への移植が可能であった。

なお、外植体基部には若干カルス形成が認められたが、ウダイカンバの場合のような著しい増殖は認められず、従ってカルスによるシュートの伸長阻害も認められなかった。

2) 培養開始時期によるシュート形成のちがい

ダケカンバのシュートの形成と伸長の状況を、図-5 に示す。培養開始から 30 日以内に明らかシュートの形成が認められた外植体は全く無く、ほとんどのシュートが 30 日目から 60 日目までの間に形成され引き続き伸長した。これは、ウダイカンバでは、大部分のシュートが培養開始 30 日以内に形成され、伸長を開始したのに比べるとかなり遅い。しかし、60 日目に既に 10 mm 以上に伸長していたシュートも認められており、シュートの伸長速度自体はそれほど遅くない。

E2 では、試験期間中を通じてシュートの形成が確認できたのは 10 月 27 日に培養を開始した仮頂芽のわずか 1 本だけであり、10 mm 以上のシュートは全く形成されなかった。このことから、ダケカンバにおいても個体による違いが顕著であると結論されるが、シュートの形成ができなかった原因は、ダケカンバの冬芽の特性、実験方法を含め、今後検討を必要とする。

E1 では、1 月 24 日以降の培養開始ではシュートの形成がまったく認められなかった。また、11 月 30 日と 12 月 27 日との間では、シュートの形成状況に差がみられ、培養開始時期が遅くなるにしたがって、シュートが形成されにくくなる傾向が明らかである。また、培養開始から 60 日目までに形成されたシュートは、90 日目までにすべて 10 mm 以上に伸長した。

よって、本試験の E1 の結果から、冬芽の培養を 11 月 30 日頃までに開始するのが適当と結論される。これは、北海道におけるダケカンバの冬芽培養における、一般的な培養開始時期の目安となるものと考えられる。

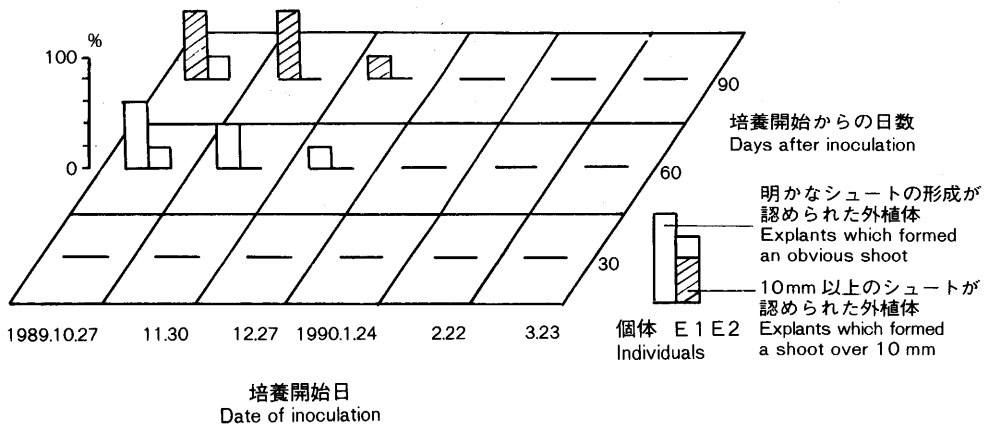


図-5 培養開始時期のちがう仮頂芽からのシュートの形成および伸長のようす(ダケカンバ)
 Fig. 5. Shoot formation and elongation from pseudo-terminal buds which inoculated at different season (*Betula ermanii*).

3) 培養に供する冬芽の位置によるシュート形成のちがい

冬芽の位置によるシュートの形成と伸長の違いを図-6に示す。E1, E2ともに3番目の冬芽では、全くシュートの形成が認められなかった。また、2番目の冬芽でもシュートの形成が認められたのはただ1本だけであり、形成されたシュートの大部分は先端の仮頂芽からであった。また、E1で10mm以上に伸長したシュートはすべて仮頂芽からのものであった。一方、E2では10mm以上に伸長したシュートはまったく認められなかった。芽の位置によるシュートの伸長状況は、ダケカンバの冬芽はウダイカンバのそれとかなり違っている。

以上の結果から、本研究で用いた培養方法では、ダケカンバの冬芽の培養の外植体としては、一年生枝先端の仮頂芽を使用するのがよい。

4) 植物体の再生

冬芽の位置別の培養によって、10mm以上に伸長したE1のシュート7本を、それぞれ培養開始時期ごとに、培養開始から90日目に外植体から切り取って発根培地にさしつけた。さしつけたシュートの平均長は16mmであった。はやいものでは、さしつけてから1週間目に発根が認められ。また、4週間目には全てのシュートで発根が認められた(表-6, 図-7)。しかし、発根後のシュートはしばらく伸長を停止したままであり、発根後1カ月目頃にはじめて伸長を開始した。シュートの伸長が認められたのは7本中3本だけであり、残りは3ヵ月を過ぎても何等変化が見られなかった。また、伸長を再開したもので、再開後2~3週間間で再び伸長を停止してしまった。

しかし、発根後シュートが再び伸長した幼植物体から、シュートを切り取って同一組成の発根培地にさしつけたところ、発根して新たな幼植物体が再生した。このことから、発根後、シュートが連続生長しさえすれば、試験管内挿し木での継代培養が可能であることが明らかとなった。

ここでみられたシュートの伸長停止は、試験管内挿し木などでのクローン増殖を目指す上で重大な障害となるので、培地条件だけでなく、日長、温度条件等も含めてさらに検討し、原因を明らかにする必要がある。

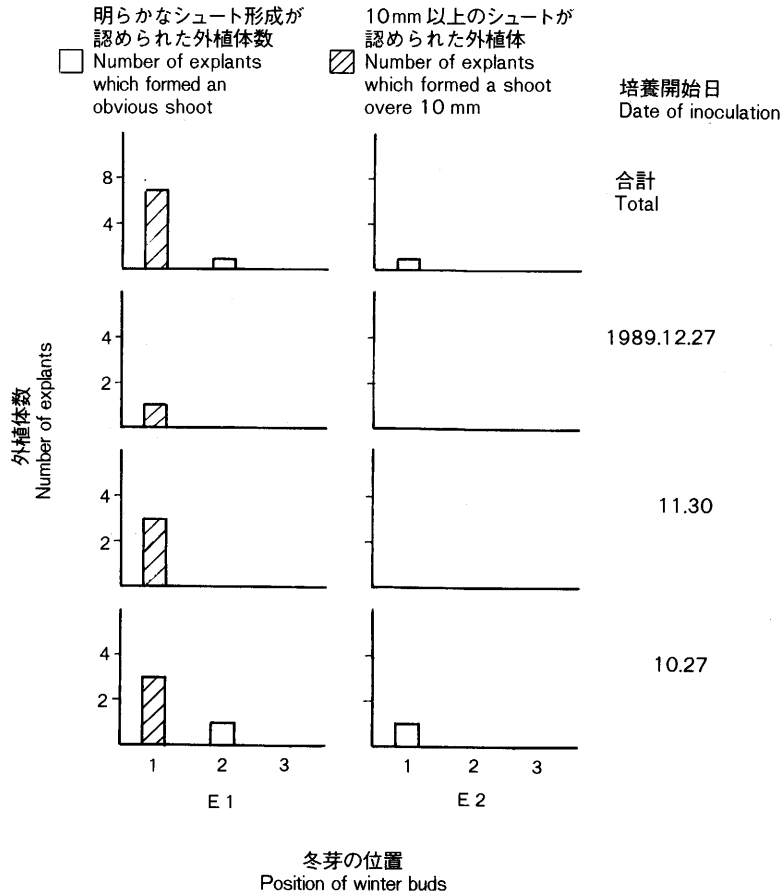


図-6 冬芽の位置によるシュートの形成および伸長のちがい(ダケカンバ)
 培養開始から90日目. 冬芽の位置は, 仮頂芽を1とし, 以下, 下方に向かって側芽に2から4までの番号をつけた

Fig. 6. Shoot formation and elongation from winter buds which located different position on one-year-old twigs (*Betula ermanii*).
 Ninety days after inoculation. Position of winter buds were denoted as follows; 1, pseudo-terminal bud; 2-4, lateral-buds numbered downward.

IV. 結 論

ウダイカンバとダケカンバについて, 北海道に生育する個体を材料に用いた場合の, 培養開始の適期及び外植体として適当な冬芽の位置について明らかにした。

本試験方法の範囲内では, ウダイカンバ, ダケカンバともに 11 月下旬までに培養を開始した場合に, 発根培地に移植可能なシュートを得ることができたが, 培養開始後早くからシュートが伸長開始することなどを考慮に入れた場合, 10 月下旬の培養が適当である。しかし, ウダイカンバでは他の培養例から, 培養開始適期の地域による違いのあることが推察され, ダケカンバでもこのような違いがある可能性も考えられるので, なお両樹種についてこれらの点を検討する必要

表-6 発根培地に移植後4週間目に発根していたシュートの数(ダケカンバ; E1)*
 Table 6. Number of rooted shoot after 3 weeks of transplantation to rooting medium
 (*Betula ermanii*; E1)*

冬芽の位置 Position of bud	培 養 開 始 日 Date of winter buds' inoculation			合 計 Total
	10/27	11/30	12/27	
1	3/3**	3/3	1/1	7/7
2	/0	/0	/0	/0
3	/0	/0	/0	/0
Total	3/3	3/3	1/1	7/7

* 培養開始から90日目に、10 mm以上に伸長していたシュートを発根培地に移植
 Shoots elongated over 10 mm at 90 days after inoculation of winter buds were transplanted to rooting medium.

** 発根数 (Number of rooted shoot)/シュート数 (Number of cultured shoot)

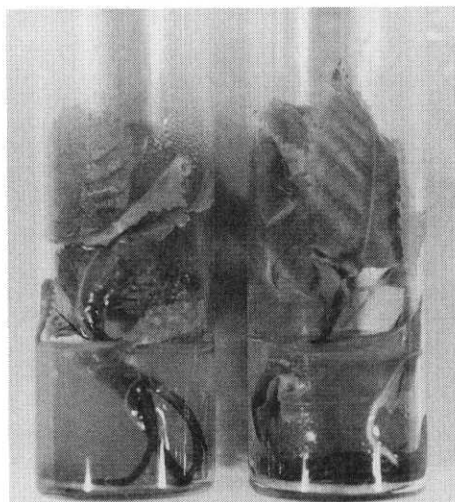


図-7 発根培地上で再生したダケカンバの幼植物体
 発根培地へ移植3カ月後. 培養びんの直径は20 mm

Fig. 7. Regenerated plantlets of *Betula ermanii* on rooting medium.
 Three months after transplanting to rooting medium. Diameter of culture tube was 20 mm.

がある。

このように、冬芽の培養が培養開始時期によって、異なるシュートの伸長を示すことは、冬芽の休眠状態との関係から、興味を持たれる現象である。一般に、冬芽は秋期に休眠状態(真性休眠)に入り、低温にさらされることによって徐々に休眠の解除が行なわれる(Kozłowski, 1971)。本試験では、秋から初冬にかけての冬芽からのみシュート形成が認められ、休眠が既に解除されていると考えられる状態の冬芽からはシュートが形成されていない。この原因は不明であるが、樹木の休眠機構を考える上で重要な事実であると考えられ、今後検討が望まれる。

また、それぞれの樹種について2個体ずつを供試したが、いずれの樹種も1個体だけがよくシュートを伸長した。このことは、個体により要求する培養条件が異なっていることを示すものと考えられる。従って、本試験のような一定の培養条件で、多くの個体を増殖することは困難と思われる。他のカバノキ属樹木のえき芽から

のシュートの伸長例を見ると、0.4~2.0 g/l程度のBAPの添加が有効である(McCOWN, 1989)ことから、新たな個体の増殖を試みる場合には、この範囲でBAPの濃度を変えた数種類の培地を、供試する必要があるものと考えられる。また、培養開始時期も個々に検討する必要がある。

次に、当年生枝上における冬芽の位置によりシュートの伸長が異なることが明らかにされた。ウダイカンバでは、先端の仮頂芽を含めた上部2個の冬芽を、ダケカンバでは仮頂芽のみを用いることにより効率的なシュート伸長を期待できることがわかった。これは、先端に近い冬芽が栄養的により充実していることや、1年生枝上の冬芽が、将来、長枝化するか短枝化するかといった可能性の違いがあるため、また、休眠状態が下部の冬芽と異なっている等の理由と推測される。

一方、カバノキ属樹木に普通である短枝上の冬芽は、採取しやすく、また、多量に採取できるので、外植体としての利用価値が高いと考えられるが、これについては検討しなかった。この点については、今後研究を進める必要がある。

また、このようにして得られたシュートを発根培地にさしつけた場合、十分に伸長したシュートであれば、発根して植物体を再生する可能性があることが明らかになった。

両樹種について明らかにされた、培養時期及び冬芽の位置による違いは、近縁の他樹種についてもあてはまる可能性が高いと思われ、今後、他のカバノキ属樹木の冬芽の培養を進める上で、非常に参考になる結果が提供できたといえる。

本研究を含めこれまで、ミズメ、ウダイカンバ、ダケカンバ、3種の日本産主要カンバについて、成木の冬芽の培養による植物体の再生が可能であることが明らかになり、ほぼ共通した手法での増殖が可能となった。

3樹種は、鱗片を剥した冬芽を培養することで、シュートを伸長させることができるが、表面殺菌法やシュート伸長用の培地などは、樹種ごとに異なる。

表面殺菌法は、ミズメについては鱗片付きの状態、アルコールと過酸化水素水を組合せた方法で、比較的容易に殺菌が可能であった (Ide, 1987) のに対して、ウダイカンバ (Ide and Yamamoto, 1990)、ダケカンバでは、鱗片を除いた後、昇こうを用い強い殺菌を行わないと表面殺菌は不可能であった。一般に、冬芽表面の鱗片は相当雑菌に汚染されていることから、冬芽をそのまま殺菌処理した後鱗片を剥すよりは、鱗片剥離後に表面殺菌を行うほうが効率的であると考えられる。

シュートの伸長を期待する培地として、ミズメでは IS 培地 (Saito and Ide, 1985b, Ide, 1987b)、ウダイカンバ (Ide and Yamamoto, 1990) とダケカンバでは改変 ANDERSON 培地を用いた。ミズメでは ANDERSON 培地は検討しなかったが、継代培養では使用可能であることから (井出, 未発表)、初代培養においてもシュートの伸長が期待できると思われる。カバノキ属樹木の組織培養で、定芽の伸長によりシュートを得る培養方法を取る場合には、MS 培地 (Murashige and Skoog, 1962) も使用されるが (井出, 1987)、WPM (Lloyd and McCown, 1980, McCown, 1989, McCown and Amos, 1979, 片寄, 1988, Lee *et al.*, 1986) や IS (Ide, 1987) など、塩類濃度が MS 培地の 1/4 程度と低い培地が多く用いられている。本研究で用いた ANDERSON 培地もそのような培地の一つであり、カバノキ属樹木の定芽からのシュートの伸長には、塩類濃度の低い培地を用いることが、一般に適切と考えられる。

どの樹種についても、冬芽から伸長したシュートは外植体から切り離し、NAA や IBA といったオーキシンを添加した、改変 IS 培地および ANDERSON 培地にさしつけることで、発根を誘導し、植物体の再生が可能であった。このことから、これらの培地が発根培地の基本組成として、一般的に使用可能であることは明らかである。しかし、各試験とも得られたシュート数が少なかったため、添加する植物ホルモンの適性な種類と量については、特に結論が得られていない。

実際には、個体によって発根性に違いがあることは普通であるので、個体毎に適当な培地条件の決定が必要であると考えられる。

従来、カバノキ属樹木の組織培養においては、生育期間中の茎軸 (HUHTINEN and YAHYAOGU, 1974), 枝 (SAITO and IDE, 1985a), 葉 (SIMOLA, 1985), 葉柄 (IDE and SAITO, 1985b), えき芽 (McCOWN and AMOS, 1979, IDE, 1987, 細井, 1989, McCOWN, 1989, LEE *et al.*, 1986) などが外植体として用いられており、生長休止期の冬芽を直接外植体として用いた例は少ない (IDE, 1987, IDE and YAMAMOTO, 1990)。先に述べたように、組織培養によるプラス木の増殖は、生長休止期に行うことが事業実行上有効と考えられ、この意味で、ミズメ、ウダイカンバについて、ダケカンバで冬芽の培養によるクローン増殖法が明らかにされた意義は大きい。

また、本試験は、ウダイカンバとダケカンバの2種について、採取した冬芽をただちに培養するのではなく、特別な処理や保存方法を用いずに現地から培養施設まで郵送し、採取2~4日後に供試するという条件下で、植物体の再生が行われた。このことは、冬芽による培養法が、カバノキ属樹木の増殖にとって汎用性のある有効な技術であることを示している。今後、さらに材料とする冬芽の保存、輸送方法等についても検討し、実用的な手法として確立したい。

要 旨

ウダイカンバ及びダケカンバ冬芽を供試体としての培養を行った。培養試験は、外植体として用いる冬芽の、採取時期及び枝上での位置の違いによる、シュートの伸長経過の違いを検討した。それぞれの樹種2個体について、10月下旬から3月下旬まで、ほぼ1ヵ月おきに6回にわたり、時期をかえて培養を行った。改変 ANDERSON 培地に BAP (6-benzylaminopurine) を 1.6 mg/l 添加した培地に、鱗片を除いた冬芽を置床し培養した結果、両樹種についてつぎのことが明らかになった。

1) 培養開始時期が遅くなるにつれて、シュートの形成が悪くなる傾向が認められ、両種共1月以降の培養ではシュートは得られなかった。すなわち、発根培地に移植可能なシュートを得るためには、北海道においては遅くとも11月下旬までに培養を開始する必要がある。効率的な増殖のためには、本試験の範囲では10月下旬の培養が適当である。これは、静岡での試験との関係でみると、冬芽形成後月平均気温が5℃を下回らない時期が適当であると示唆される。

2) シュートの形成及び伸長は、枝の上部に位置する冬芽では旺盛であったが下部の冬芽からは少なかった。この結果、ウダイカンバでは一年生枝先端の仮頂芽及び2番目の冬芽を、ダケカンバでは仮頂芽のみを用いた場合に、良好なシュートの形成が期待される。

なお、シュートの伸長は個体間差が大きく、新しい個体の培養に際しては、培地に添加する BAP の量などの培養条件について、個体毎に検討が必要である。

3) 両樹種とも、10 mm 以上に伸長したシュートを切り取って改変した ANDERSON 培地に、IBA (Indolebutyric acid) を 0.5 mg/l, NAA (α -naphthylacetic acid) を 0.02 mg/l 添加した発根培地に移植することにより、発根個体を得ることが出来た。これにより、ミズメ、ウダイカンバに次いでダケカンバにおいても冬芽の培養による、植物体再生が可能であることが明らかになった。

キーワード: ウダイカンバ, ダケカンバ, 組織培養, 冬芽, クローン増殖

引用文献

- ANDERSON, W. C.: A revised tissue culture medium for shoot multiplication of rhododendron. J. Am. Soc. Hortic. Sci. **109**: 343-347, 1986.
- 原口雅人: カバザクラ 850 年生老木の腋芽培養. 41 回日林関東支論: 61-62, 1989.
- 細井佳久: シラカンバ(1)成木腋芽の培養, 木本植物の増殖と育種(最新バイオテクノロジー全書編集委員会編). 157-160, 農業図書, 東京, 1989.
- HUHTINEN, O. and YAHYAOGU, Z.: Das frühe Blühen von aus Kalluskulturen herangezogenen Pflänzchen bei der Birke (*Betula pendula* ROTH.). Silvae Genet. **23**: 32-34, 1974.
- IDE Y.: Studies on clonal propagation techniques of Japanese white birch by tissue culture. Bull. Shizuoka Pref. For. Exp. Sta. **16**: 56 pp, 1987a.
- : *In vitro* clonal propagation of mature Japanese cherry birch. J. Jpn. For. Soc. **69**: 161-163, 1987b.
- and YAMAMOTO, S.: *In vitro* plantlet regeneration of mature monarch birch (*Betula maximowicziana*) by winter bud culture. J. Jpn. For. Soc. **72**: 147-150, 1990.
- 片寄 藤・玉井 裕: ウダイカンバ成木の生長点培養, 林木の育種「特別号」1988, 46-47, 1989.
- KINOSHITA, I., and SAITO, A.: Propagation of Japanese white birch by encapsulated axillary buds. 1. Regeneration of plantlets under aseptic conditions. J. Jpn. For. Soc. **72**: 166-170, 1990.
- KOZLOWSKI, T. T.: Growth and development of trees I. 443 pp, Academic Press, New York, 1971.
- LEE, B. C., KIM, J. H., PARK, J. I., and LEE, S. K.: Rapid micropropagation of *Betula* spp. through *In vitro* tissue culture. Res. Rep. Inst. For. Gen. Korea **22**: 132-138, 1986.
- LLOYD, G. and McCOWN, B.: Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia* by use of shoot-tip culture. Comb. Proc. Int. Plant Prop. Soc. **30**: 421-427, 1980.
- McCOWN, B. H.: Birch (*Betula* spp.) in Biotechnology in agriculture and forestry, vol. 5 Trees II (BAJAJ, Y. P. S. Ed.). 324-341, Springer-Verlag, Berlin, 1989.
- and AMOS, R.: Initial trials with commercial micropropagation with birch. Comb. Proc. Int. Plant Prop. Soc. **29**, 1979.
- MURASHIGE, T. and SKOOG, S.: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. **15**: 437-497, 1962.
- SAITO, A. and IDE, Y.: *In vitro* plantlet regeneration from adventitious buds induced on cuttings of peeled twigs of Japanese white birch. J. Jpn. For. Soc. **67**: 282-284, 1985a.
- , ———: *In vitro* plantlet regeneration from adventitious buds induced by petiole culture in Japanese white birch. J. Jpn. For. Soc. **67**: 373-375, 1985b.
- SATO, T., IDE, Y., and SAITO, A.: Tissue culture technology in the rapid clonal propagation of Japanese white birch. J. Jpn. For. Soc. **68**: 343-346, 1986.
- SIMOLA, L. K.: Propagation of plantlets from leaf callus of *Betula pendula* f. *Purpurea*. Sci. Hortic. **26**: 77-85, 1985.
- 高橋延清, 濱谷稔夫, 倉橋昭夫: 北海道演習林育種樹木園における外来樹種の初期生育状況. 演習林. **18**: 2-78, 1974.
- 全国大学演習林協議会編: 国立大学演習林の所有する森林植物遺伝子資源(上巻). 609 pp, 1989, 全国大学演習林協議会, 京都.

(1990年10月30日受理)

Summary

Effects of seasonal and positional difference of winter buds on shoot elongation were examined *in vitro* winter bud culture of *Betula maximowicziana* REGEL and *B. ermanii* CHAM.

Two 30-year-old mature individuals growing in the university forest in Hokkaido were used as the source of explants for each species, respectively. Inoculations were carried out six times from October, 1989 to March, 1990 at an interval of about a month. Winter buds which scales had been removed were cultured on modified ANDERSON'S medium with 1.6 mg/l of BAP (6-benzylaminopurine).

Shoot formation and elongation was reduced with the advance of inoculation season. It was concluded that winter bud culture of these two species should start at the end of November at latest. And the end of October was thought to be most favorite time for starting culture as far as this experiment concerned.

Active shoot formation and elongation was expected from winter buds which were attached on the upper part of one-year-old twigs. Then upper two winter bud including pseudo-terminal bud for *B. maximowicziana* and only pseudo-terminal buds for *B. ermanii* supposed to be appropriate for the explants.

Shoot elongation varied seriously from individual to individual in both species. Therefore experiments for determination of appropriate culture conditions such as concentration of BAP would be necessary for the propagation of new individual.

Shoots which elongated over 10 mm were cut and placed on rooting medium which was modified ANDERSON's medium containing 0.5 mg/l of IBA (indolebutyric acid) and 0.02 mg/l of NAA (α -naphthylacetic acid) after 90 days of inoculation. Rooting were occurred in both species and regenerated plantlets in a few weeks. This is the first report of *in vitro* plantlet regeneration of *B. ermanii*.

Key words: *Betula maximowicziana*, *Betula ermanii*, Tissue culture, Winter bud, Clonal propagation