

# 冬芽培養によるジゾウカンバ幼植物体の再生

山本茂弘<sup>1)</sup>・山田晋也<sup>1)</sup>・片井秀幸<sup>1)</sup>・袴田哲司<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 農林技術研究所森林・林業研究センター

## *In vitro* Plantlet Regeneration From Winter Buds of Jizoukanba (*Betula globispica*)

Shigehiro Yamamoto<sup>1)</sup> Shinya Yamada<sup>1)</sup> Hideyuki Katai<sup>1)</sup> and Tetsuji Hakamata<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Forestry and Forest Products Research Center/Shizuoka Res.Inst.of Agric.and For.

### Abstract

Jizoukanba (*Betula globispica*) is one of the endangered tree species of Shizuoka Prefecture. In order to protect and preserve this species, we studied the conditions of plantlet regeneration by tissue culture using winter buds.

The results of this study revealed the suitable conditions for the primary culture medium, the combination and concentration of plant hormones to add, and the support materials for rooting medium, the acclimatization of plantlets to the outdoors, and the possibility of subculture.

The following points were recognized in this study.

1. For the sprouting of winter buds, and the elongation of healthy shoots that 1/2MS medium with 0.5 mg/L of BAP (6-benzylaminopurine) and 0.5 mg/L of GA<sub>3</sub> (gibberellin A<sub>3</sub>) were suitable.
2. Vermiculite was suitable as a support material used for the rooting medium in order to raise the rooting ratio and the acclimatization efficiency of the plantlets.
3. With an easy planting method and humidity management, acclimatization of the plantlets was easily accomplished in about two weeks.
4. It suited the tendency for the subculture number of the explants to decrease, by withering to death etc.
5. Local specificities were an indication of the rooting ratio of the shoots.

キーワード：ジゾウカンバ, 伸長, 組織培養, 冬芽, 発根

## I 緒 言

ジゾウカンバは、本州の関東地方西北部及び中部地方東南部の岩尾根など、森林の疎開した向陽地に生えるまれな高木である<sup>5)</sup>。本県では、富士宮市の毛無山(標高1945m)及び静岡市の下十枚山(標高1732m)の標高約1600m以上の尾根部に自生し、本種分布の南限とされている。しかしながら本県での個体数は少なく、それぞれ数十本程度が確認されるのみである。本県産ジゾウカン

バは、静岡県版レッドデータブックでは絶滅危惧Ⅱ類(絶滅の危険が増大している種)に指定されており<sup>8)</sup>、保護・保全の必要性が高まっている。

本研究では、ジゾウカンバ母樹の保護等に資するため、組織培養によるクローン増殖を試みた。材料には、同じカバノキ属のミズメ<sup>2)</sup>、ウダイカンバ<sup>3,4)</sup>、ダケカンバ<sup>3)</sup>で幼植物体再生例のある冬芽を用いた。そして、冬芽からのシュート伸長に適した添加する植物ホルモンの種類とその濃度及び培地組成、並びにシュートの発根に適した

発根培地支持体について検討し、再生した幼植物体の順化を試みた。また、培養容器内でのシュートの増殖やクローン保存のため、外植体の継代培養の可能性についても検討した。

## II 材料及び方法

### 1. 冬芽の展開及びシュート伸長

#### (1) 初代培地に添加する植物ホルモンの検討

材料として、山梨県山梨市の乾徳山(標高2031m)の山頂付近の尾根に自生するジゾウカンバ10個体(樹高5~6m)から、2007年4月20日に、開葉前の冬芽の付いた長さ20cm程度の枝を採取した。4月23~26日に、冬芽を付けた枝を約2cmに切り分け、表面殺菌処理のため、70%エタノールに1分間、次に1%次亜塩素酸ナトリウムに3分間、更に3%過酸化水素水に5分間浸漬した。冬芽の表面が乾燥してから、滅菌したピンセットで表面の芽鱗をすべて剥がした冬芽をメスで切り取り外植体とした。

冬芽の培養に適した植物ホルモンの検討のため、0.5、1.0 mg/Lのそれぞれ2段階の濃度の6-ベンジルアミノプリン(BAP)と0.5 mg/LのジベレリンA<sub>3</sub>(GA<sub>3</sub>)との組み合わせ及び0.5 mg/LのBAPのみを添加した3種類の伸長培地

を用意した。そして、外植体を各個体5個ずつ挿し付けた。培地の基本組成は、Murashige Skoog培地(MS培地)<sup>7)</sup>の無機塩類を1/2の濃度に改変したもの(1/2MS培地)を用いた。1/2MS培地の組成を表1に示す。

#### (2) 初代培地の種類の検討

材料は前出の乾徳山産の4個体と、埼玉県秩父郡両神村の両神山(標高1724m)山頂付近の尾根に自生する6個体(樹高約5m)のジゾウカンバを用いた。両神山産の個体は、2007年4月28日に、開葉前の冬芽の付いた長さ20cm程度の枝を採取した。そして、5月2日に(1)の試験と同様に冬芽の表面殺菌・外植体の調整を行い、BAP、GA<sub>3</sub>ともに0.5mg/Lを添加した1/2MS培地、Woody Plant Medium培地(WPM培地)<sup>6)</sup>、Broadleaved tree Medium培地(BTM培地)<sup>1)</sup>に外植体を各個体5個又は3個ずつ挿し付けた。各培地の組成を表1に示す。

### 2. 発根培地支持体の検討

発根培地には、3-インドール酪酸(IBA)0.5 mg/Lと1-ナフタレン酪酸(NAA)0.02 mg/Lを添加した1/2MS培地を用いた。発根培地の支持体には、寒天(0.8%)、パーミキュライト(10mL)及びロックウール(グロダグ社製; 25×25×40 mm)を用いた。それぞれ寒天培地、パーミキュライ

表1 各培地の基本組成(mg/L)

組 成	培 地		
	1/2MS	WPM	BTM
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	825	400	165
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>			240
KNO <sub>3</sub>	950		190
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		990	860
CaCl <sub>2</sub> ・2H <sub>2</sub> O	220	96	44
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ・4H <sub>2</sub> O		556	
MgSO <sub>4</sub> ・7H <sub>2</sub> O	185	370	370
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	85	170	270
FeSO <sub>4</sub> ・7H <sub>2</sub> O	13.9	27.8	27.8
Na <sub>2</sub> -EDTA <sup>1)</sup>	18.65	37.3	37.3
MnSO <sub>4</sub> ・4H <sub>2</sub> O	11.15	22.3	22.3
ZnSO <sub>4</sub> ・7H <sub>2</sub> O	4.3	8.6	8.6
CoCl <sub>2</sub> ・6H <sub>2</sub> O	0.0125		0.02
CuSO <sub>4</sub> ・5H <sub>2</sub> O	0.0125	0.25	0.25
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ・2H <sub>2</sub> O	0.125	0.25	0.25
KI	0.415		0.15
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3.1	6.2	6.2
ニコチン酸	0.5	0.5	0.5
塩酸ピリドキシン	0.5	0.5	0.5
塩酸チアミン	0.1	1.0	1
ミオイノシトール	100	100	
L-グリシン	2	2	
L-グルタミン			2
ショ糖	2,000	2,000	2,000

1) エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム。

ト培地、ロックウール培地と呼ぶ。培養開始約2ヵ月後と3ヶ月後の2回、長さ1.5cm以上の健全なシュート(濃い緑色のよく展開した葉を2枚以上付け、旺盛な伸長をしているもの)を、各培地に22本ずつ挿し付けた。このとき、前歴となる初代培養の植物ホルモンの組合せや培地の種類及びシュートの大きさや特定の個体が、偏らないように挿し付けた。

以上の培養には口径25 mm、長さ150 mmのガラス試験管を用い、培地10 mL(パーミキュライト培地、ロックウール培地では寒天を含まない培地液量10mL)を注いだ後、121℃で15分間高圧蒸気滅菌した。培地のpHは5.8に調整した。培養条件は、蛍光灯照明による約5000 Lx、16時間日長、室温25℃に保ち管理した。

### 3. 幼植物体の順化

発根培地支持体の検討試験で得られた幼植物体について、培地に挿し付けてからおよそ7週間後に、幼植物体を試験管から取り出し、水道水で根を軽く洗い流した。このとき根についたパーミキュライトやロックウールは無理に取り除かなかった。その後、赤玉土、パーミキュライト及びピートモスを3:1:1の容積比で混合した用土を用い、口径75mmのビニールポットに植え付けた。そして、チャック付きのポリ袋に入れて密閉し、約5000Lx、16時間日長、室温25℃の条件下に7日間置いた。その後、ポリ袋の口を開けて周囲湿度約70%の状態6日間経過後、約50%遮光した屋外の網室内に移し(8月下旬と9月下旬)、ミストかん水による管理を行った。

### 4. 継代培養

培養開始約2ヵ月後以降、シュートの切り取りの有無に関わらず、新しく作成した培地に外植体を継代培養した。第1回目、2回目の継代培養は、0.25mg/LのBAPを添加した1/2MS培地に移植した。その後、第3回目の継代培養からは、BAP、GA<sub>3</sub>をそれぞれ0.5mg/L添加した1/2MS培地に移植した。継代培養では外植体の分割は行わず、基部切り口にできたカルスや褐変した部分を取り除き、枯死したり、生存の見込めない外植体は培養から除いた。継代培養は、約1ヶ月ごとに繰り返し行った。

継代培養には200mLのガラスビンを用い、培地量は20mLとした。培地の作成、培養条件は初代培養と同様とした。

## III 結果及び考察

### 1. 冬芽の展開及びシュート伸長

#### (1) 初代培地に添加する植物ホルモンの検討

外植体挿し付け後、1週間ほどで冬芽が膨らみ葉が開き始めた。培養開始から23日後、BAPとGA<sub>3</sub>との3種類

の組合せごとに、外植体の葉の展開程度を、表2に示す4段階の展開指数で評価した。この段階で、バクテリアやカビ等の汚染により枯死した外植体を除いた残存率は全体で79%であった。

表2 外植体(冬芽)の展開指数と展開の状態

展開指数	開葉の状態
1	芽は閉じたままである
2	芽がほころび葉が開きはじめている
3	葉が展開している途中である
4	葉が十分に展開している

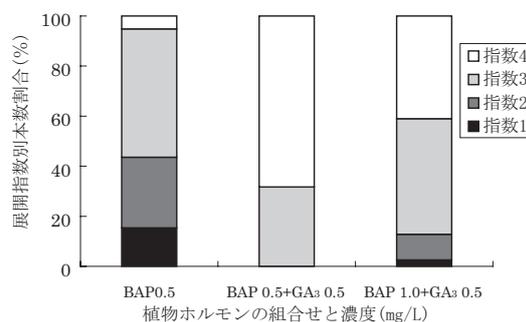


図1 植物ホルモンの組合せと外植体の展開指数別本数割合(23日後)

植物ホルモンの組合せと外植体の展開指数別本数割合を図1に示す。BAPとGA<sub>3</sub>をともに0.5mg/L添加した培地では、葉が十分に展開している展開指数4の外植体割合が68%と最も大きく、展開指数2以下のものはなかった。一方、BAPのみの添加培地では、展開指数4の外植体割合は5%と最も小さかった。

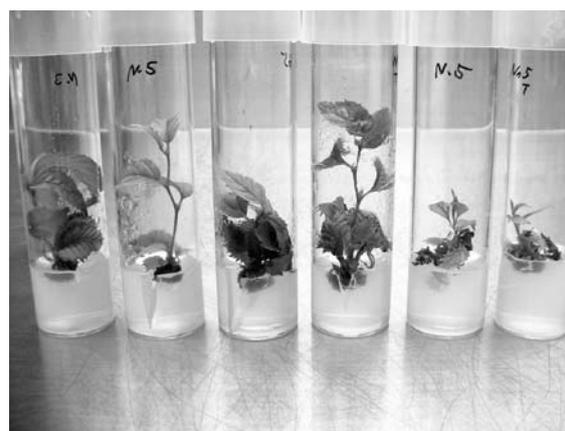


写真1 外植体からのシュート伸長(50日後)

左BAP 1.0mg/L+GA<sub>3</sub> 0.5mg/L, 中BAP 0.5mg/L+GA<sub>3</sub> 0.5mg/L, 右BAP 0.5mg/L.

以上のことから、冬芽の開葉、葉の展開に対して、本試験の範囲では、BAPとGA<sub>3</sub>をともに0.5mg/L添加するのが適していると考えられる。

外植体から葉が展開し、培養開始後約1ヶ月経過する

と、シュートが伸長を始めた。50日後のシュートの伸長状況を写真1に示す。

約50日後、組織の褐変やバクテリア等雑菌の汚染による枯死は、ほぼ収束したと思われた。表3に培養開始54日後の、植物ホルモンの組合せと外植体挿し付け本数及び枯死した外植体を除いた残存率を示す。残存率は全体で67%であった。

およそ2ヵ月後、発根培地に移せるのに十分と思われる健全なシュートの伸長した外植体が多数得られた。中には複数のシュートが伸長した外植体も見られた。そこで、培養開始56~59日後、15mm以上に伸長した健全なシュートを切り取り、発根培地支持体の検討試験に供した。なお、シュートの切り取りの有無に関わらず、残りの外植体は、1/2MS培地に継代した。継代後、新たにシュートを伸長させる外植体も見られ、培養開始95~98日後に、再度同様に健全なシュートを切り取り、発根培地支持体の検討試験に供した。

図2に、植物ホルモンの組合せごとに、培養開始98日後までに、長さ15mm以上のシュートが伸長した外植体

の本数割合及び外植体あたりの発根培地移植シュート本数を示す。ここで、本数割合の分母は、雑菌の汚染等による枯死の収束した54日後に残存していた外植体の本数とした。

シュートが15mm以上に伸長した外植体の本数割合は、植物ホルモンの組合せにより、27~38%であり、GA<sub>3</sub>無添加の場合低い値であった。また、外植体あたりの発根培地移植シュート本数は0.18~0.46本であり、BAPとGA<sub>3</sub>をともに0.5mg/L添加した培地で多く、GA<sub>3</sub>無添加培地では少なかった。

以上のことから、本試験の範囲では、外植体からのシュートの伸長には、それぞれ0.5mg/LのBAPとGA<sub>3</sub>の添加により、健全なシュートを多く得ることができると考えられる。

(2) 初代培地の種類の検討

培養開始から23日後、培地ごとに、外植体の葉の展開程度を4段階の展開指数(表2)で評価した。この段階で、組織の褐変やバクテリア等雑菌の汚染により枯死した外植体を除いた残存率は全体で87%であった。

培地ごとの外植体の展開指数別本数割合を図3に示す。

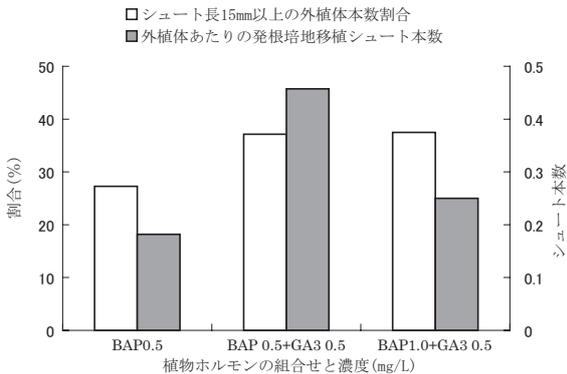


図2 植物ホルモンの組合せと15mm以上のシュートが伸長した外植体の本数割合<sup>1)</sup>及び外植体あたりの発根培地移植シュート本数<sup>2)</sup>(98日後)

- 1) 雑菌の汚染が概ね収束した54日後に残存していた外植体本数に対する割合。
- 2) 54日後に残存していた外植体1本あたりの発根培地移植シュート本数。

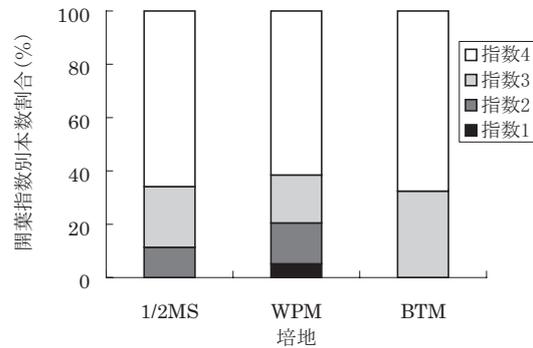


図3 培地と外植体の展開指数別本数割合(23日後)

表3 植物ホルモンの組合せと外植体挿し付け本数及び残存率 (54日後)

BAP(mg/L)	GA <sub>3</sub> (mg/L)			計	GA <sub>3</sub> (mg/L)			計	残存率(%)**2)
	0	0.5	1.0		0	0.5	1.0		
0.5	5	5	5	15	2	2	2	6	40
1.0	5	5	5	15	3	4	4	11	73
0.5	5	5	5	15	3	2	1	6	40
1.0	5	5	5	15	5	4	5	14	93
0.5	5	5	5	15	4	5	4	13	87
1.0	5	5	5	15	5	2	4	11	73
0.5	5	5	5	15	1	4	4	9	60
1.0	5	5	5	15	5	5	3	13	87
0.5	5	5	5	15	4	4	4	12	80
1.0	5	5	5	15	1	3	1	5	33
計	50	50	50	150	33	35	32	100	67

- 1) 個体番号のKは乾徳山で採取した個体を表す。
- 2)\*\*: 一元配置の分散分析では個体間に1%水準で有意差あり。

葉が十分に展開している展開指数4の外植体割合は、61～68%と大きな差は認められなかった。また、展開指数2以下のものは、1/2MS培地で11%、WPM培地で21%、BTM培地では認められなかった。

以上のことから、冬芽の開葉、葉の展開に対して、BTM培地がやや適していると思われるものの、本試験の範囲では大きな違いはないと考えられる。

表4に、培地の種類ごとの外植体挿し付け本数と培養開始49日後の残存率を示す。培養開始49日後、バクテリア等の汚染による枯死は、ほぼ収束したと思われた。残存率は全体で56%であった。

培養開始49日後、(1)の試験と同様に、15mm以上に伸長した健全なシュートを切り取り、発根培地支持体の検討試験に供した。なお、シュートの切り取りの有無に関わらず、残りの外植体は、1/2MS培地に継代した。継代後、新たにシュートを伸長させる外植体も見られ、培養開始から89日後に、再度同様にシュートを切り取り、発根培地支持体の検討試験に供した。

図4に、初代培養での培地の種類ごとに、49日後の、長さ15mm以上のシュートが伸長した外植体の本数割合及び外植体あたりの発根培地移植シュート本数を示す。ここで、本数割合の分母は、雑菌の汚染等による枯死の収束した49日後に残存していた外植体の本数とした。

シュートが15mm以上に伸長した外植体の本数割合は、培地の種類により25～35%であり、BTM培地で高く、WPM培地で低い値であった。一方、外植体あたりの健全シュートの本数は0.42～0.56本であり、1/2MS培地で他の培地より多かった。なお、BTM培地では、シュートの葉は黄色を帯び、部分的に褐変することが多かった。

以上のことから、本試験の範囲では、健全なシュートを多く得るには、1/2MS培地が適しているものと思われる。

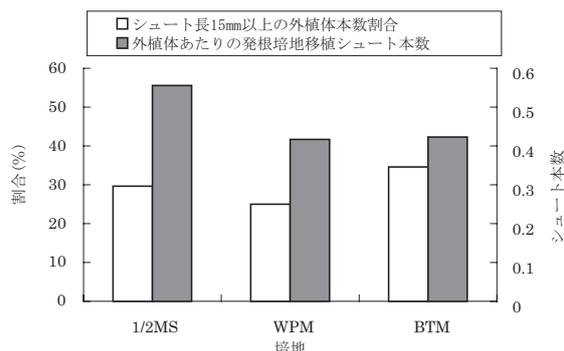


図4 培地のと15mm以上のシュートが伸長した外植体の本数割合及び外植体あたりの健全シュート本数<sup>2)</sup>(89日後)

- 1) 雑菌の汚染が概ね収束した49日後に残存していた外植体本数に対する割合。
- 2) 49日後に残存していた外植体1本あたりの発根培地移植シュート本数。

## 2. 発根培地支持体の検討

挿し付け2週間後から発根が始まり、30日以後はほとんど発根するシュートが見られなくなった。

42日後の各発根培地支持体ごとの発根率を図5に示す。また、各培地での状況を写真2、3に示す。各培地支持体ごとの発根率は、寒天培地27%、パーミキュライト培地36%、ロックウール培地14%であり、パーミキュライト培地で最も高かった。パーミキュライト培地では根の細根が多く発生した(写真3)。

以上のことから、発根培地の支持体としてはパーミキュライトが最も適していると思われる。

パーミキュライト培地で発根率が高く細根が多いのは、通気性といった物理的性質の他、培地のpHなど化学的性質も影響すると考えられる。培地のpHは、培地支持体により培養後変化することが報告されており、ケヤキの発根培地では、当初pH5.6に調整したものが、培養32日後、寒天培地では5.2、パーミキュライト培地では6.4、ロックウール培地では、6.8に変化した<sup>9)</sup>。また、ク

表4 培地ごとの外植体挿し付け本数及び残存率(49日後)

個体1)	培地			計	1/2MS WPM BTM			計	残存率(%)**2)
	1/2MS	WPM	BTM		1/2MS	WPM	BTM		
K2	5	5	5	15	1	2	3	6	40
K3	5	5	5	15	4	2	1	7	47
K5	5	5	5	15	4	4	1	9	60
K8	5	5	5	15	5	3	4	12	80
R1	5	5	5	15	0	0	1	1	7
R2	5	5	5	15	0	0	1	1	7
R3	3	3	3	9	2	1	3	6	67
R4	5	5	5	15	3	4	4	11	73
R5	5	5	5	15	5	5	5	15	100
R6	3	3	3	9	3	3	3	9	100
計	46	46	46	138	27	24	26	77	56

- 1) 個体番号のKは乾徳山、Rは両神山で採取した個体を表す。
- 2)\*\*: 一元配置の分散分析では個体間に1%水準で有意差あり。



写真2 発根培地の支持体と挿し付けたシュート  
左寒天、中パーミキュライト、右ロックウール。



写真3 幼植物体の発根状況  
左寒天培地、右パーミキュライト培地

ヌギではpH5.8に調整したロックウール培地が、高圧蒸気滅菌後7.3に上昇した<sup>10)</sup>。高いpHは、発根に適さないことが予想される。

次に、前歴となる初代培養の植物ホルモンの組合せや培地の種類及び各個体について、挿し付け本数と発根率を表5、6に示す。

初代培地の植物ホルモンの組合せでは、BAP 0.5mg/LとGA<sub>3</sub> 0.5mg/Lの組合せで挿し付けシュート本数が最も多く、また、この組合せ由来のシュートのみが発根した(表5)。初代培地の種類では、1/2MS培地で挿し付けシュート本数が最も多く、発根率も46.7%と最も高かった(表6)。挿し付けシュート本数や発根本数が少なく、発根培地の条件も必ずしも同一ではないため明らかではないが、シュートが多く得られた植物ホルモンの組合せ及び培地の種類では、発根した幼植物体をより多く得られる可能性がある。

なお、乾徳山産の個体は、発根培地に移植した7個体中K9個体が発根したのみであった。一方両神山産では、4個体中R3、R4、R5、R6の4個体すべてが発根した(表5、

表5 植物ホルモンの組合せと発根培地へのシュート挿し付け本数及び発根率(42日後)

個体1)	植物ホルモンの組合せ			計	発根本数	発根率(%)
	BAP(mg/L)	GA <sub>3</sub> (mg/L)	挿し付け本数			
	0.5	0.5	1.0			
	0	0.5	0.5			
K1	0	0	0	0	—	—
K2	0	0	0	0	—	—
K3	3	2	2	7	0	0
K4	0	2	2	4	0	0
K5	1	1	1	3	0	0
K6	0	0	0	0	—	—
K7	1	2	1	4	0	0
K8	0	2	0	2	0	0
K9	1	4	1	6	2	33.3
K10	0	3	1	4	0	0
計	6	16	8	30	2	6.7
発根本数	0	2	0			
発根率(%)	0	12.5	0			

1) 個体番号のKは乾徳山で採取した個体を表す。

表6 培地と発根培地へのシュート挿し付け本数及び発根率(42日後)

個体1)	培地			計	発根本数	発根率(%)
	WPM	BTM	挿し付け本数			
K2	0	0	0	0	—	—
K3	0	3	1	4	0	0
K5	0	0	0	0	—	—
K8	0	0	0	0	—	—
R1	0	0	0	0	—	—
R2	0	0	0	0	—	—
R3	2	1	2	5	2	40.0
R4	1	0	1	2	1	50.0
R5	4	2	2	8	2	25.0
R6	8	4	5	17	10	58.8
計	15	10	11	36	15	41.7
発根本数	7	4	4			
発根率(%)	46.7	40.0	36.4			

1) 個体番号のKは乾徳山、Rは両神山で採取した個体を表す。

6). こちらについても、挿し付け本数が少なく、初代培養の前歴及び発根培地の条件、個体の年齢等同一ではなく、2地域間の各個体外植体あたりの発根本数について分散分析しても有意な差は認められないもの(P=0.07)、発根性には産地による違いがある可能性がある。

### 3. 幼植物体の順化

鉢上げ1ヶ月後(順化後)の幼植物体の状況を写真4に、鉢上げ3ヶ月後の、由来となる発根培地支持体別の幼植物体の生存率を表7に示す。生存率は、バーミキュライト培地とロックウール培地では100%であった。一方、寒天培地で50%であった。寒天培地由来の幼植物体で生存率が低いのは、根が軟弱であったため、鉢上げ時の根の痛みが影響したものと思われる。

なお、屋外へ出したのは8月と9月の暑い時期であった。標高が高く、気温等当苗畑と大きく異なる気象条件の場所に生育している樹種であるにもかかわらず、バーミ

表7 幼植物体の順化後の生存率(3ヶ月後)

培地支持体	鉢上げ本数	生存本数	生存率(%)
寒天	6	3	50
バーミキュライト	8	8	100
ロックウール	3	3	100



写真4 順化後の幼植物体

キュライト培地、ロックウール培地由来の幼植物体での枯死はみられず、低地において育成の可能性が示唆される。

### 4. 継代培養

初代培養開始49~59日後、BAPを0.2mg/L添加した1/2MS培地に、外植体の第1回目の継代培養を行った。さらに初代培養開始から数えて89~98日後に、伸長したシュートを、発根培地供試用に切り取り、第2回目の継代培養を行った。しかしながら、第2回目の継代培養からシュートの伸長が悪く、葉の色も黄色味を帯びてきたため、培地に添加する植物ホルモンを、初代培養で適し

ていたBAP、GA<sub>3</sub>をそれぞれ0.5mg/L添加した1/2MS培地に変えて継代培養を続けた。

外植体の継代当初本数(初代培養49~54日後の残存数)に対する継代本数の割合の経過を図6に示す。第1回目の継代培養で継代本数割合が大きく減少しているのは、当初、生存しているものの褐変や黄変などにより、枯死する可能性が高く、新たな伸長を期待できない多くの外植

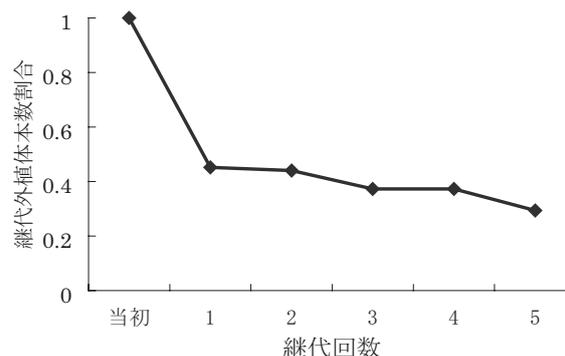


図6 外植体の当初本数(残存本数<sup>1)</sup>)に対する継代本数割合の経過  
1) 残存本数: 培養開始49~54日後の残存外植体本数。

体を継代培養しなかったためである。その後も、継代培養中に枯死、生育不良などにより除外したため、継代本数割合は減少傾向となった。

個体別にみた外植体継代6ヶ月後(継代第5回目)の継代当初本数に対する継代本数割合を表8に示す。この割合は、全体で0.26となった。2地域間の各個体あたりの継代本数割合について分散分析しても有意な差は認められなかった(P=0.30)。

表8 各個体の外植体継代6ヶ月後の本数割合

個体1)	残存本数2)	継代第5回目の本数	継代本数割合
K1	6	0	0
K2	23	0	0
K3	20	6	0.30
K4	14	4	0.29
K5	31	9	0.29
K6	11	0	0
K7	9	2	0.22
K8	37	1	0.03
K9	12	4	0.33
K10	5	4	0.80
R1	1	0	0
R2	1	0	0
R3	6	3	0.50
R4	11	2	0.18
R5	15	12	0.80
R6	9	8	0.89
計	211	55	0.26

1) 個体番号のKは乾徳山、Rは両神山で採取した個体を表す。

2) 残存本数: 培養開始49~54日後の生存外植体数。

今後は、継代培養に適した培地や植物ホルモン、培養条件について検討する必要がある。

### 5. まとめ

本研究から、ジゾウカンバの冬芽を用いた組織培養によるクローン増殖について、健全なシュートを多く得る

ためには、BAPとGA<sub>3</sub>をともに0.5mg/L添加した1/2MS培地が適し、発根培地の支持体にはパーミキュライトを用いることで発根率や、幼植物体の順化効率が高まると考えられた。また、幼植物体の順化は容易であることが分かった。しかしながら、シュートの発根率に産地差がある可能性が示唆された。

静岡県内で絶滅が危惧される種のひとつであるジゾウカンバの保護・保全のためには、より多くの個体のクローン増殖を行う技術の確立が不可欠であるとともに、遺伝子解析による本県と他県の集団との遺伝的比較及び本県の集団内の遺伝的多様性の調査結果等を考慮した保全方法の検討が必要である。これにより、本県集団内の個体数の維持、遺伝的な多様性の保全、他集団間の移植の可否等、保護・保全対策に寄与すると考えられる。今後は、本県産ジゾウカンバについて、より汎用的な組織培養技術の確立のほか、挿し木、接木などの増殖技術や、育苗、育林技術等の検討とともに、十分な遺伝子解析を行い、生育地の保護、現地外での個体保存など行政的な対策についても検討する必要がある。

#### IV 摘 要

本県の絶滅危惧種であるジゾウカンバの保護・保全に資するため、冬芽を用いた組織培養によるクローン増殖に適した、初代培地に添加する植物ホルモン・培地の種類及び発根培地支持体の種類、幼植物体の野外への順化について検討した。また、培養容器内での保存のため、継代培養の可能性を検討した。その結果次のことがわかった。

- 1 冬芽の開葉及び健全なシュートの伸長のためには、BAPとGA<sub>3</sub>をともに0.5mg/L添加した1/2MS培地が適していると思われた。
- 2 発根率及び幼植物体の順化効率を高めるためには、発根培地に用いる支持体としてパーミキュライトが適していると思われた。
- 3 幼植物体の順化については、簡単な鉢上げ操作や湿度の調整などにより、約2週間で容易に行うことができた。
- 4 外植体の継代培養については、継代回数が多くなるにつれ、枯死などにより、継代本数が減少する傾向にあった。
- 5 シュートの発根性には、地域差がある可能性が示唆された。

#### V 引用文献

- 1) Chalupa, V. (1984): *In vitro* Propagation of Oak (*Quercus robur* L.) and Linden (*Tilia cordata* Mill.). *Biologia Plant.* (Praha). 26, 374~377.
- 2) Ide, Y. (1987): *In vitro* Clonal Propagation of Mature Japanese Cherry Birch. *J. Jpn. For. Soc.* 69(4), 161~163.
- 3) Ide, Y. and Yamamoto, S. (1990): *In vitro* Planant Regeneration of Mature Monarch Birch (*Betula maximowicziana*) by Winter Bud Culture. *J. Jpn. For. Soc.* 72(2), 147~150.
- 4) 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. 東大農学部演習林報告 85, 27~42.
- 5) 北村四郎・村田源(1979): 原色日本植物図鑑・木本編Ⅱ, 545pp, 保育社, 大阪.
- 6) Lloyd, G. and McCown, B. (1980): Commercially feasible micropropagation of mountain laurel (*Kalmia latifolia*) by use of shoot tip culture. *Proc. Inc. Proc. Int. Prant Prop. Soc.* 30, 421~427.
- 7) Murashige, T. and Skoog, S. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. plant.* 15, 473~497.
- 8) 静岡県自然環境調査委員会編, 静岡県環境森林部自然保護室企画(2004): まもりたい静岡県の野生生物-県版レッドデータブック-〈植物編〉, 338pp, 羽衣出版, 静岡.
- 9) 山本茂弘・袴田哲司(2004): 静岡県産ケヤキ精英樹の選抜と組織培養によるクローン増殖. 静林技セ研報 32, 1~13.
- 10) 山本茂弘・近藤晃・井出雄二(1991): クヌギ実生の組織培養における発根および順化の諸条件-発根培地の支持体の違いとアンシミドールの添加が発根と順化に及ぼす影響-. *日林誌*73, 225~231.