

## 組織培養によるクワの増殖(1)

誌名	宮城県蚕業試験場蚕桑要報
ISSN	05404908
著者	立岩, 剛 林, かずよ
巻/号	20号
掲載ページ	p. 10-16
発行年月	1990年9月

# 組織培養によるクワの増殖

## (1) 初代培養から順化までの技術確立

立岩 剛・林 かずよ

桑苗生産の一手段として、分離芽の培養による増殖を検討した。増殖システムは冬芽又は腋芽から大量のシュートを生じさせ、ある程度生長したものを摘出し、発根培地で発根させ、

更に順化をして圃場に移し、肥大伸長させて苗木または、そのまま桑園化しようとするものである。

### 1. シュート増殖技術

#### 試 験 方 法

春発芽前に伐採した前年春切枝を2.5℃に貯蔵し、適宜取り出して材料とした。冬芽は、りん片を除去し、中性洗剤で洗浄し、水洗後エタノール及び次亜塩素酸ソーダで滅菌した。供試品種は、しんけんもち、あおばねずみ、及びしんいちのせとした。培地はMS培地にフラクトース3%、寒天1.3%、サイトカイニンとして6-ベンジルアミノプリン(BA)を所定量、

オーキシシンとしてインドール-3-酢酸(IAA)を0.1mg/ℓ加え、pHを5.8に調整したものを使用した。加温溶解後植物培養試験管に分注し高圧滅菌した。滅菌した冬芽は滅菌水で3回洗浄後培地に置床した。培養は27℃、3.000lux、12時間明-12時間暗に設定した陽光恒温器で行なった。

#### 結 果 及 び 考 察

(1) 初代培養、置床44日後(4月27日植え)の1芽当たりのシュート数はBA 2 mg/ℓが1 mg/ℓより多いか同様であり、全体では、あおばねずみのBA 2 mg/ℓが多かった。芽重はBA濃度及び品種的にも差が無く、平均シュート長

は1 mg/ℓが長く、しんいちのせ、しんけんもち、あおばねずみの順となった。なお、この時点で芽及びシュートとも黄色がかってきたので約1カ月で培地の更新が必要と考えられた。

表-1 初代培養(44日後)シュート発育状況

品 種 名	BA濃度 (mg/ℓ)	置 床 数 (1)	シュート数 (2)	(1)/(2)	芽 重	平 均 シュート長
あおばねずみ	1	5ケ	5本	1.0	0.4 <sup>g</sup>	16 <sup>mm</sup>
	2	5	8	1.6	0.4	15
しんいちのせ	1	14	15	1.0	0.6	23
	2	8	8	1.0	0.6	19
しんけんもち	2	8	9	1.1	0.4	17

(2) 継代培養(I) (1)の培地更新としてBA濃度を1, 2, 3 mg/ℓと変えた培地に移植したところ(置床66日後)、1芽当たりのシュート数は、しんけんもち、しんいちのせで2>1>3 mg/ℓとなったが、あおばねずみでは1>2>3 mg/ℓとなり品種間で差があらわれた。したがって継代培養のBA濃度は1または2 mg/ℓが適当と考えられた。

表-2 継代培養(I) 66日後のシュート発育状況

品 種 名	BA濃度 (mg/ℓ)	芽 数 (1)	シュート数 (2)	(1)/(2)
しんけんもち	1	3ケ	7本	2.3
	2	3	8	2.7
	3	3	4	1.3
あおばねずみ	1	3	8	2.7
	2	3	7	2.3
	3	3	6	2.0
しんいちのせ	1	8	16	2.0
	2	7	16	2.3
	3	4	7	1.8

(3) 継代培養(Ⅱ) BA濃度を1または2mg/lとして初代培養後約1カ月毎に1回培地を更新し、96日間(6月22日植、2回培地更新)培養した。生育状況を見ると、置床34日後では、しんけんもち、あおばねずみの生育が早く、しんいちのせの生育が遅かった。BA濃度別では、しんけんもち、しんいちのせでは1mg/l、あ

おばねずみで2mg/lの初期生育が良好であった。59日後ではシュート発生芽が増加し、中でもあおばねずみの2mg/lが100%発生した。またしんいちのせでは34日後より40%増加したが3品種の中で最も遅れた。BA量別ではしんけんもちで1mg/l、あおばねずみ及びしんいちのせで2mg/lが多かった。

表-3 継代培養(Ⅱ) 34日後の生育状況

品 種 名	BA濃度 (mg/l)	芽 数	≡	≡	+	-
しんけんもち	1	16 (100)	8 (50.0)	4 (25.0)	0 (0.0)	4 (25.0)
	2	16 (100)	5 (31.3)	4 (25.0)	4 (25.0)	3 (18.7)
あおばねずみ	1	16 (100)	4 (25.0)	6 (37.5)	4 (25.0)	2 (12.5)
	2	12 (100)	8 (66.7)	3 (25.0)	0 (0.0)	1 (8.3)
しんいちのせ	1	16 (100)	1 (6.2)	9 (56.3)	5 (31.3)	1 (6.2)
	2	12 (100)	0 (0.0)	4 (33.3)	3 (25.0)	5 (41.7)

(注) シュート伸長≡, 開葉≡, 未開葉+, 枯死-, ( ) 内は%

表-4 継代培養(Ⅱ) 59日後の生育状況

品 種 名	BA濃度 (mg/l)	芽 数	≡	≡	+	-
しんけんもち	1	12 (100)	9 (75.0)	3 (25.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
	2	13 (100)	5 (38.4)	5 (38.4)	0 (0.0)	3 (23.2)
あおばねずみ	1	14 (100)	9 (64.3)	1 (7.1)	4 (28.6)	0 (0.0)
	2	10 (100)	10 (100)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
しんいちのせ	1	15 (100)	6 (40.0)	3 (20.0)	3 (20.0)	3 (20.0)
	2	7 (100)	3 (42.9)	0 (0.0)	1 (14.2)	3 (42.9)

62日後の1芽当たりのシュート数は、3品種とも2mg/lが多く、特にしんけんもちは、1mg/lの2.7倍となった。BA濃度別の平均最長シュート長は大差なく、品種別では、しんけんもちが長かった。96日後の1芽当たりのシュート数は、しんけんもち、あおばねずみの2mg/lでそれぞれ16.3、11.7本となった。

また1mg/lと2mg/lを比較すると、2mg/lが多く、しんけんもちで8.2倍、あおばねずみで7.3倍であった。また各品種とも平均シュート長は1mg/l、平均最長シュート長は2mg/lが長く、品種別平均最長シュート長は、しんけんもちが長かった。なお、しんけんもち、あおばねずみの1mg/lで発根する現象がみられた。

表-5 継代培養(Ⅱ) 62日目のシュート発育状況

品 種 名	BA濃度 (mg/l)	シュート 発生芽 (1)	シュート数 (2)	平均最長 シュート長	(2) / (1)
しんけんもち	1	9	16	32 <sup>mm</sup>	1.8
	2	5	24	34	4.8
あおばねずみ	1	9	13	18	1.4
	2	10	22	22	2.2
しんいちのせ	1	6	8	23	1.3
	2	3	5	20	1.7

表-6 継代培養(II) 96日目のシュート発育状況

品 種 名	BA濃度 (mg/l)	シュート 発生芽(1)	シュート数 (2)	平均 シュート長	平均最長 シュート長	(2) / (1)
しんけんもち	1	10	20	19 <sup>mm</sup>	27 <sup>mm</sup>	2.0
	2	3	49	17	38	16.3
あおばねずみ	1	5	8	19	25	1.6
	2	10	117	14	32	11.7
しんいちのせ	1	7	18	14	19	2.6
	2	3	11	11	30	3.7

以上のことから、しんけんもち・あおばねずみの継代培養によるシュート増殖ではBAを2 mg/l添加し、約1カ月毎の更新により約100日で1芽当たり12~16本のシュートを発生させ

ることができた。なお、しんいちのせについては1, 2 mg/lとも3~4本の発生で今後更に継続検討する必要がある。

## 2. 発根技術

### 試 験

1, シュート増殖技術で得られたシュート(2~3 cm)を無菌的に摘出し供試した。発根培地はMS培地にオーキシンとしてナフタリン酢酸(NAA)を所定量, シュート伸長を良くするためサイトカイニンとしてBAを $1 \times 10^{-2}$  mg/l フラクトース又はシュクロースを3%, 寒天

### 方 法

を0.8~1.3%添加しpHを5.8に調整した。容器は100又は200ml三角フラスコを使用し, この中に3~6本シュートを挿した。培養は27℃, 3000lux, 12時間明-12時間暗に設定した陽光恒温器で行った。

### 結 果 と 考 察

まず, NAAを $5 \times 10^{-1}$ , 1, 2 mg/lの3段階に設定し, シュクロース3%, 寒天0.8%の培地で培養したところ品種間差異が認められ, あおばねずみは発根割合が高かったが, しんけんもちは中程度, しんいちのせは全く発根が見られなかった。なお, しんけんもち, あおばね

ずみの発根したものは根が培地から突出し, 上向きに発生する現象が見られ, 細く, 短い状態であった。このことはNAA濃度が高すぎて起きた現象としてみられ,  $5 \times 10^{-1}$ ~2 mg/lの濃度は不適切であると考えられた。

表-1 NAA濃度別発根状況(昭和62年9月30日挿し, 56日目)

品 種	NAA濃度 (mg/l)	供試シュート数 (本)	発根個体数 (本)	発根割合 (%)
しんけんもち	$5 \times 10^{-2}$	6	5	83.3
	$1 \times 10^{-1}$	3	3	100.0
	$2 \times 10^{-1}$	5	2	40.0
あおばねずみ	$5 \times 10^{-2}$	12	12	100.0
	$1 \times 10^{-1}$	14	11	78.6
	$2 \times 10^{-1}$	20	19	95.0
しんいちのせ	$5 \times 10^{-2}$	8	3	37.5
	$1 \times 10^{-1}$	6	1	16.7
	$2 \times 10^{-1}$	8	0	0.0

次に、NAAを $5 \times 10^{-2}$ 、 $1 \times 10^{-1}$ 、 $2 \times 10^{-1}$  mg/ℓの3段階に設定し、フラクトース3%、寒天の1.3%の培地で培養したところ(表-1)、発根割合はあおばねずみではNAAの3段階とも79~100%であり、しんけんもちでは、

$5 \times 10^{-2} \sim 1 \times 10^{-1}$  mg/ℓで83~100%で発根が良好であった。しかし、しんいちのせは3段階とも発根割合が0~38%で不良であり、濃度が高くなると発根割合が低くなる傾向を示した。

表-2 経時的発根状況(昭和63年1月22日挿し)

品 種	NAA濃度 (mg/ℓ)	供試シュート数 (本)	発根個体数(上段,本)と発根割合(下段,%)		
			12日 目	31日 目	61日 目
しんけんもち	$5 \times 10^{-3}$	15	5 33.3	13 86.7	15 100.0
	$1 \times 10^{-2}$	15	10 66.7	13 86.7	14 93.3
	$2 \times 10^{-2}$	9	4 44.4	7 77.8	7 77.8
あおばねずみ	$5 \times 10^{-3}$	15	10 66.7	13 86.7	13 86.7
	$1 \times 10^{-2}$	15	6 40.0	12 80.0	13 86.7
	$2 \times 10^{-2}$	12	7 58.3	11 91.7	11 91.7
しんいちのせ	$5 \times 10^{-3}$	15	6 40.0	12 80.0	12 80.0
	$1 \times 10^{-2}$	17	9 52.9	16 94.1	16 94.1
	$2 \times 10^{-2}$	22	9 40.9	17 77.3	19 86.4

更にNAA濃度を均等に下げて $5 \times 10^{-3}$ 、 $1 \times 10^{-2}$ 、 $2 \times 10^{-2}$  mg/ℓの3段階に設定し、フラクトース3%、寒天1.3%の培地で培養し、経時的な発根を調べたところ、次の結果を得た(表-2)。発根培地に移してから12日目には各品種とも発根が一部に認められ、しんけんもちの $1 \times 10^{-2}$ 、あおばねずみの $5 \times 10^{-3}$ 及び $2 \times 10^{-2}$ 、しんいちのせの $10^{-2}$  mg/ℓで50%を超える発根がみられた。31日目になると、大部分が発根し、しんけんもちの $2 \times 10^{-2}$  mg/ℓとしんいちのせの $2 \times 10^{-2}$  mg/ℓを除き80~90%台の発根割合を示した。したがってこの12~31日間に大部分が発根するものと考えられた。また61日目になると、しんけんもちの $5 \times 10^{-3}$  mg/ℓで100%の発根割合を示し、他もほとんど80~90%の発根割合で根もしっかりと発生した。更に31日目と比較して増加する区もあったが、ほとんどは差がなかった。このため発根は1ヶ月ぐらいで出そろうことが分かった。

しかし31日目の根の状態は品種により短く、細いので寒天を洗い落して順化に移すには根がしっかりしていないと切れてしまうということから更に培養を継続する必要がある、61日目ぐらいの根が適切であると思われた。なお、しんいちのせは当初、他の2品種より経過が遅れる傾向を示したが、後半に追いつき、80~90%台の発根割合を示した。

以上の3試験を通じてNAAの好適な濃度の範囲はあおばねずみが最も広く、次いでしんけんもち、しんいちのせの順で、しんいちのせは他の2品種に比べ低濃度で発根が良好であることが確認された。一般にサイトカニンとオーキシンは拮抗作用がありサイトカニンの濃度が高いと発根が抑えられることが認められているが、シュート増殖培養で、サイトカニンとしてのBAを2 mg/ℓ使用したとき、発根培養ではどのような影響が出るかをみるために次の試

験を行なった。

表-3 BA濃度(前培養)と発根との関係(昭和63年2月26日挿し, 49日目)

NAA濃度 (mg/l)	BA(前培養) (mg/l)	供試シュート数 (本)	発根個体数 (本)	発根割合 (%)	平均
$1 \times 10^{-2}$	1	26	23	88.5	90.9
	2	29	27	93.1	
$2 \times 10^{-2}$	1	19	19	100.0	100.0
	2	29	29	100.0	

(注) 品種: しんいちのせ

前培養のBA濃度を1又は2mg/lにしたしんいちのせのシュートを用いてNAA濃度を $1 \times 10^{-2}$ 及び $2 \times 10^{-2}$ mg/lの2段階に設定し、シュークロス3%, 寒天1.3%を用いた培地で発根状況を調査した。その結果(表-3), NAA10mg/lでBA1mg/lと2mg/lの間に4.6%の差がみられたがNAA $2 \times 10^{-2}$ mg/lでは差が全く無く、全体としては前培養のBA濃度と発根とは無関係であることが分かった。また本県ではシュート増殖のための継代培養法はBAを2mg/l使用するのが適切であるとしたが、このことは発根に

何ら影響を及ぼさないものと確認された。

なお、培養にフラクトース又はシュークロースを使用したか、これらによる発根率の差は認められず、どちらを使用しても発根は可能であった。

今後の問題点としては、発根に有効なシュート長の限界を出してシュートを有効に利用すること、シュート摘出作業の省力化、発根完了期間短縮化のための環境条件の明確化、順化に移すのに容易な容器の開発等があげられる。

### 3. 培養苗の順化技術

#### 試 験

冬芽をMS培地で継代培養し、得られたシュートを発根培地(NAA添加)で発根させ培養苗とした。供試品種は、しんけんもち、あおばねずみ、しんいちのせとした。培養苗はフラスコから取り出し水道水で寒天をよく洗い流した。容器はプラスチック製蓋付円筒ポット、ジフィポット及びポリエチレンポットを使用した。用土はパーミキュライト、液肥はMS無機塩類溶液を用い、追肥として丸桑肥料の飽和水溶液を50倍に希釈したものを20日おきに注入した。実験は人工気象室(コイトロン)内で行い、

#### 方 法

光線は自然光を用い照度は寒冷沙で調整し、開始後26日は二重、その後20日間は一重にしていた。湿度は円筒ポットの時は蓋をして、ジフィポットの時は超音波加湿器の利用で、またポリエチレンポットの時はピーカーをかぶせることで保てるようにした。散水は高湿状態から解放後、適宜用土の乾燥時に行った。順化は外気温の異なる春(3月24日)から夏期(8月3日)にかけて、また使用容器を替えて計4回実施し、温湿度(開始後16~24日間)及び圃場移植時の生存割合を調査した。

#### 結 果 と 考 察

(1)超音波加湿器を用いて人工気象室内を高湿状態(80%以上)にし、室温が最高(平均)で32°C、最低(平均)で16°Cの範囲で推移した時、生存割合は73~90%(平均)と高かった。品種別では、しんけんもち、しんいちのせは乾燥(湿度65%以下)に強く75~100%の生存割合で

3回とも安定していた。しかし、あおばねずみは高湿環境下では高い生存割合であったが、乾燥に弱く、湿度65%以下の頻度が多くなると38%と低くなり不安定な傾向を示した。なお高温(30°C以上)になると飽和水蒸気圧が上がり高湿状態がとりにくく、超音波加湿器では不可能

と考えられた。

表-1 (1) 第1回目生存状況

品 種	供 試 数	枯 死 数	生 存 数	生 存 割 合
しんけんもち	29	2	27	93.1%
あおばねずみ	11	2	9	81.8
しんいちのせ	12	1	11	91.7
計	52	5	47	90.4

(ジフィポット+超音波加湿器 3/24~5/16 53日間)

表-1 (2) 温湿度変化

期 間	室内温度 (平均, °C)			室内湿度 (平均, %)			65%以下 頻度(回)
	最 高	最 低	平 均	最 高	最 低	平 均	
3/24~4/8	27.2	16.3	21.8	92.7	70.6	81.7	7

表-2 (1) 第2回目生存状況

品 種	供 試 数	枯 死 数	生 存 数	生 存 割 合
しんけんもち	8	0	8	100.0%
あおばねずみ	8	5	3	37.5
しんいちのせ	51	13	38	74.5
計	67	18	49	73.1

(ジフィポット+超音波加湿器 4/22~6/4 43日間)

表-2 (2) 温湿度変化

期 間	室内温度 (平均, °C)			室内湿度 (平均, %)			65%以下 頻度(回)
	最 高	最 低	平 均	最 高	最 低	平 均	
4/22~5/7	29.7	19.6	24.7	91.9	65.1	78.5	18

表-3 (1) 第3回目生存状況

品 種	供 試 数	枯 死 数	生 存 数	生 存 割 合
しんいちのせ	38	7	31	81.6%

(ジフィポット+超音波加湿器 5/23~8/3 72日間)

表-3 (2) 温湿度変化

期 間	室内温度 (平均, °C)			35°C以上	室内湿度 (平均, %)			65%以下
	最 高	最 低	平 均	頻度(回)	最 高	最 低	平 均	頻度(回)
5/23~6/8	31.9	22.2	27.1	6	91.6	71.3	81.5	10

(2)密閉ポット及びポリポットにピーカーをかぶせて14日間培養苗のみを高湿にしたものは定期的に真夏ということで室内が高温になり最高(平均)で33°C、35°C以上の頻度は12回を記録した。このため密閉容器内も高湿となり、枯死

するものが多く、生存割合は42%と低い傾向であった。なお、覆いを除去した後の湿度65%以下の頻度は17回と多かったがそれ以前に27個体(79%)が枯死しており除去の影響は少なかったものと考えられる。

表-4 (1) 第4回目生存状況

品 種	供 試 数	枯 死 数	生 存 数	生 存 割 合
しんけんもち	32	20	12	37.5 %
あおばねずみ	23	13	10	43.5
しんいちのせ	4	1	3	75.0
計	59	34	25	42.4

(密閉ポット, ポリポット+ビーカー 8/3~9/16 44日間)

表-4 (2) 温湿度変化

期 間	室内温度 (平均, °C)			35°C以上	室内湿度 (平均, %)			65%以下
	最 高	最 低	平 均	頻 度 (回)	最 高	最 低	平 均	頻 度 (回)
8/3~8/18	33.0	24.9	29.0	12	95.1	64.0	79.6	35
8/19~8/26	32.0	25.5	28.8	0	92.9	58.0	75.5	17

以上のことから自然光を利用した人工気象室での培養苗の順化は品種間差異が認められたが、日射を調整しながら開始後15日間は高湿状態(80%以上)にし、気温は20~30°Cに制御して45日間位保護するのが効果的であると推察された。また容器はジフィポットを使用すると順化期間

中根が外に張り出し稚苗の生育も良好で、圃場移植も能率的でかつ萎凋も防止できた。

なお、順化期間の短縮化及び圃場移植後の雑草との競合に負けない稚苗の育成方法については今後も継続検討していく予定である。

### 摘

分離芽の組織培養によるクワの増殖を初代培養から順化まで検討したところ次の成果を得た。  
 (1)しんけんもち、あおばねずみの継代培養によるシュート増殖ではBAを2mg/l添加し、約1カ月毎の更新により100日で1芽当たり12~16本のシュートを発生させることができた。  
 (2)シュート発根はMS培地にNAAを加えることで可能であったが品種間差異が認められ、NAA濃度でしんけんもちは $5 \times 10^{-3} \sim 1 \times 10^{-1} \text{mg/l}$ 、あおばねずみは $5 \times 10^{-3} \sim 2 \times 10^{-1} \text{mg/l}$ 、しんいち

### 要

のせは $5 \times 10^{-3} \sim 2 \times 10^{-2} \text{mg/l}$ で80~90%の発根割合が得られた。また10日目ごろから発根が始まり、30日目には出そろうことが確認されたが、順化過程に順調に移しうる発根培養の期間は60日前後必要と考えられた。  
 (3)自然光を利用した人工気象室での培養苗の順化は品種間差異が認められたが、日射を調整しながら開始後15日間は高湿状態(80%以上)にし、気温は20~30°Cに制御して45日間位保護するのが効果的であると考えられた。

### 文

- (1)立岩 剛(1987): 東北蚕糸研究報告, 12, 50.  
 (2)立岩 剛(1988): 東北農業研究, 41, 335~336.

### 献

- (3)立岩 剛・林 かずよ(1988): 東北蚕糸研究報告, 13, 64.