

ハンカチノキ(*Davidia involucrata*)のマイクロプロパゲーション

誌名	日本林學會誌 = Journal of the Japanese Forestry Society
ISSN	0021485X
著者名	佐藤, 亨
発行元	日本林學會
巻/号	78巻3号
巻号補足	
掲載ページ	p. 309-313
発行年月	1996年8月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター

Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



論 文

ハンカチノキ (*Davidia involucrata*) の
マイクロプロパゲーション

佐藤 亨*

佐藤 亨：ハンカチノキ (*Davidia involucrata*) のマイクロプロパゲーション 日林誌 78: 309~313, 1996 ハンカチノキ (*Davidia involucrata* BAILL.) の幼齡木から採った節付き茎軸および頂芽を外植体とし、BAP (*N*⁶-ベンジルアミノプリン) 3.16 μ M と NAA (α -ナフチル酢酸) 0.316 μ M を加えた Broad-leaved woody plant medium (BW 培地) 上で開芽とシュートの伸長を見た。伸長したシュートは、BAP 5.62 μ M と NAA 0.316 μ M を添加した BW 培地で約 2 カ月ごとに継代培養したところ、徐々にシュート塊の数を増し、継代 7 代目の培養から発根培養に供しうるシュートが得られた。継代培養の都度、採取したシュートは活性炭、IBA (β -インドール酪酸) および NAA を加えた 1/2 BW 培地にさしつけ、高率の発根率で幼植物体が得られた。培養室での予備順化の後、ビニールポットに鉢上げ順化することができた。キーワード：インドール酪酸、ナフチル酢酸、ハンカチノキ、ベンジルアミノプリン、マイクロプロパゲーション

SATO, T.: Micropropagation of Hankachinoki (*Davidia involucrata*). J. Jpn. For. Soc. 78: 309~313, 1996 Single nodal segments and shoot tips from young trees of *Davidia involucrata* BAILL. were used to establish initial cultures. For bud break, the best results were obtained on Broad-leaved woody plant medium (BW) with 3.16 μ M of BAP (*N*⁶-benzyl-aminopurine) and 0.316 μ M of NAA (α -naphthylacetic acid). Multiple shoots in subcultures were proliferated on BW medium with 5.62 μ M of BAP and 0.316 μ M of NAA. The longer shoots for rooting stock were obtained after seventh subculture. Isolated shoots were rooted by culturing them on half-strength BW medium containing 0.1 or 0.5% of activated charcoal, 3.16 or 10.0 μ M of IBA (β -indolebutyric acid) and 1.0 μ M of NAA. The rooting percentages were from 85.0 to 100.0%. The plantlets could be hardened and transplanted to pots.

Key words: BAP, *Davidia involucrata*, IBA, micropropagation, NAA

I. はじめに

ハンカチノキ (*Davidia involucrata* BAILL.) は、中国原産の落葉高木で、樹木界のパンダと称されており、春先にハンカチ状に下垂した白色の苞をつけた花が咲く。公園または樹木園用樹木として賞用されつつある。その苗木は、主として種子を輸入しての実生によって生産されているが、種子は発芽率が極めて低いといわれている。

そこで、増殖方法として、組織培養による大量増殖を試みた。その結果、腋芽および頂芽培養に始まって、継代培養による増殖を重ね、伸長したシュートを収穫して発根させ、ポットに鉢上げして順化させることができたので報告する。

II. 材料と方法

樹齡 5 年生の高さ約 2.5 m の鉢植えのハンカチノキを、室温約 25°C 内外の温室に 4 月中旬に持ち込み、新しい枝を伸長させた。新しく伸びた枝を採取し、葉柄着生部から上下に長さ約 2 cm のところで切った茎軸から、葉身を切り落として腋芽培養の外植体とするとともに、新しく伸びた枝の頂端を約 2 cm 長に切り取り、葉身を切り落として頂芽培養の外植体とした。

外植体は、クリーンベンチ内で、中性洗剤液で 20 分間攪拌洗浄したのち、70 % エタノールに 1 分間浸漬した。次いで有効塩素 1 % の次亜塩素酸ナトリウム溶液で 15 分

間攪拌浸漬処理した後、滅菌水で 3 回洗った。滅菌した外植体は滅菌濾紙上で風乾した。腋芽培養の外植体は茎軸の上下と葉柄の端を、また頂芽培養の外植体は下部切り口を切り返して、管瓶の培地にほぼ直立にさしつけた。

この研究には、WPM 培地 (2) と BTM 培地 (1) の培地組成を半減して加え合わせた、表-1 に示す Broad-leaved woody plant medium (3) (以下 BW 培地とよぶ) を基本培地として用いた。

初代培養には BW 培地に BAP (*N*⁶-ベンジルアミノプリン) を 1.0, 3.16 および 10.0 μ M の 3 段階で加え、すべての培地に 0.316 μ M の NAA (α -ナフチル酢酸) を添加した。供試外植体の数が少なかったため NAA を加えない培地は用いなかった。

初代培養で腋芽または頂芽から伸長したシュートは、シュート塊 (短いシュートの集合体) の増殖のために継代培養に移した。1~7 代目の継代培養では、シュート塊の下部に形成されたカルスと古い葉は切り捨ててシュート塊を分割し、また発根させるためのシュートを収穫しないで、3 cm 以上伸びたシュートは二つに切断して新しい培地に植え継ぎした。

1, 2 代目の継代培養には、BAP を 3.16 μ M と NAA を 0.316 μ M の濃度で加えた BW 培地を用い、3 代目には BAP を 3.16 または 10.0 μ M に NAA を 0.316 μ M の濃度で加えた。その後の 4~6 代の継代培養には BAP を 3.16 または 5.62 μ M にした BW 培地を用いた。7 代目以降の培

* 秩父小野田(株)つくば研究所 Tsukuba Biotechnol. R&D Ctr., Chichibu-Onoda Cement Co., Ibaraki 305

地には BAP を $5.62 \mu\text{M}$ の濃度にし、これに組み合わせ加える NAA の濃度を 0.0, 0.1, 0.316, 1.0 または $3.16 \mu\text{M}$ の濃度に変えて加え、シュート塊の増殖数やシュートの収穫数を検討した。1 代の継代培養の期間はシュート塊の生育状況を観察しながら、39~56 日とした。

継代培養 7 代目の継代培養の終わりに初めて 3 cm 以上の発根に供するシュートを収穫してから、以後シュートの発根培地の検討を行った。8 代目のシュートの発根培養には、1/2 BW 培地 (表-1) に活性炭 ACC (旧小野田セメント, 東京) を 0.1 または 0.5 % を加えたものと加えない培地を調製し、NAA をすべての培地に $1.0 \mu\text{M}$, IBA (β -

インドール酪酸) を 3.16 および $10.0 \mu\text{M}$ の 2 水準で添加して用いた。9 代目以降に得られたシュートについては、活性炭を 0.1, 0.5 % の 2 段階、IBA は 3.16 , $10.0 \mu\text{M}$ の 2 段階とし、NAA はすべてに $1.0 \mu\text{M}$ の濃度で加えた培地を用いた。

初代培養には 15 ml の培地を分注した 20 mm×100 mm の管瓶を、また継代培養と発根培養には 60 ml の培地を分注した 250 ml のマヨネーズ瓶を用い、常法によりオートクレーブで滅菌した。以上の培養はすべて約 3,000 ルックスの蛍光灯照明, 16 時間日長, $25 \pm 2^\circ\text{C}$ の培養室で行った。

III. 結果と考察

1. 初代培養における芽の開葉とシュートの伸長

初代培養 37 日目における腋芽、頂芽の開葉とシュートの伸長状態は図-1, 表-2 に示したとおりである。BAP を $1.0 \mu\text{M}$ 加えた BW 培地上では、腋芽からシュートの伸長が全く認められず、葉のみが展開し、その数は平均 3.8 枚であった。これに対して、BAP を 3.16 または $10.0 \mu\text{M}$ の濃度で加えた培地では、外植体の半数でシュートが伸長し、BAP $3.16 \mu\text{M}$ の培地では平均 15.2 mm, $10.0 \mu\text{M}$ の培地では平均 6.2 mm の伸長を見た。頂芽を外植体とした場合、BAP を $3.16 \mu\text{M}$ を加えた培地だけに置床したが、シュートを伸ばした外植体は 4 個 (40 %) であり、平均開葉数は 4.3 枚であった。頂芽からは 1 個のシュートだけでなく 2~3 個のシュートを伸長させたものもあった。

この結果から、ハンカチノキの初代培養に BW 培地を用いた場合、腋芽培養・頂芽培養ともに、BAP $3.16 \mu\text{M}$, NAA $0.316 \mu\text{M}$ の添加が適していることが認められた。

2. 継代培養におけるシュート塊の増殖とシュート収穫数

継代培養の各世代の終わりににおけるシュート塊の増加数と、3 cm 以上の発根のために用いるシュートの収穫数を表-3 に掲げた。継代培養に移って 1~2 代目 (継代培養 95 日) までの、シュート塊の新しいシュートの増殖がほとんど見られず、培養物の葉の形は図-2 の左に示したように外植体採取時のままの葉の形であった (図-2 左)。そこで 3 代目の継代培養には、BAP を $3.16 \mu\text{M}$ のほかに

表-1. 本研究で用いた培地の組成

培地の種類	初代培地, 継代培地 (BW 培地*) (mg/l)	発根培地 (1/2 BW 培地) (mg/l)
塩類		
NH ₄ NO ₃	283	141.5
(NH ₄) ₂ SO ₄	120	60
KNO ₃	95	47.5
K ₂ SO ₄	925	462.5
KH ₂ PO ₄	170	85
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	370	185
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	70	35
Ca(NO ₃) ₂ · 4 H ₂ O	598	299
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	27.8	13.9
Na ₂ -EDTA	37.3	18.6
MnSO ₄ · H ₂ O	22.3	11.15
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	8.6	4.3
H ₃ BO ₃	6.2	3.1
Na ₂ MO ₄ · 2 H ₂ O	0.25	0.125
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0.25	0.125
KI	0.08	0.04
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	0.01	0.005
Myo-inositol	100	100
Pyridoxine-HCl	0.5	
Thiamine-HCl	1.0	1.0
Nicotinic acid	0.5	0.5
Glycine	2.0	
Glutamine	1.5	
Charcoal, activated	0	0~5,000
Sucrose	20,000	10,000
Agar	10,000	10,000

*Broad-leaved woody plant medium (3).

表-2. ハンカチノキの腋芽および頂芽の初代培養におけるシュートの伸長と葉の展開*

外植体の種類	培地ホルモン構成		用いた外植体数	シュートが伸長した外植体数	平均シュート長 (mm)	開葉のみの外植体数	平均開葉数	発生した芽と葉の種類
	BAP (μM)	NAA (μM)						
腋芽	1.0	0.316	10	0	0.0	10	3.8	腋芽から葉のみ発生
	3.16	0.316	10	5	15.2	5	5.0	腋芽からシュート, 葉発生
	10.0	0.316	10	5	6.8	5	4.4	〃
頂芽	3.16	0.316	10	4	5.5	6	4.3	頂芽および腋芽発生

* 培養開始から 37 日目の結果。

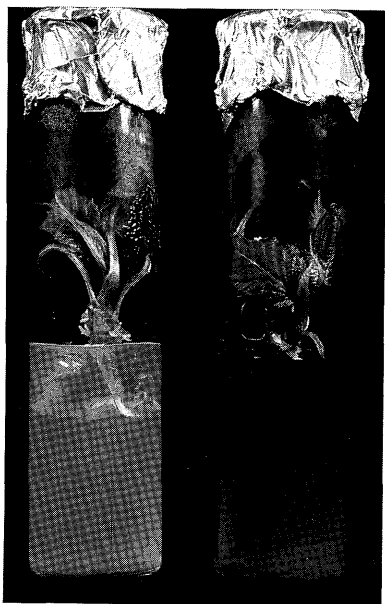


図-1. ハンカチノキの節付き茎軸の初代培養における腋芽シュートの伸長 (培養開始 30 日目)

表-3. ハンカチノキの継代培養における生存芽株数, シュート塊の数および収穫したシュート数

継代数	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
継代培養日数	56	39	48	52	56	50	46	42	48	46	45
植物ホルモン組成(BW 培地に組み合わせ加えた)											
BAP (μM)	3.16	3.16	3.16 10.0	3.16 5.62	3.16 5.62	3.16 5.62	5.62	5.62	5.62	5.62	5.62
NAA (μM)	0.316	0.316	0.316	0.316	0.316	0.316	0.0 0.316	0.316	0.1 0.316 1.0	0.1 0.316 1.0 3.16	0.1 0.316 1.0 3.16
生存芽株数	40	40	32	32	32	31	29	28	27	26	24
シュート塊*の数	43	66	104	109	127	175	271	852	852	1,453	1,721
収穫シュート数**	—	—	—	—	—	—	24	132	280	640	638

* 継代培養の都度, 小分けされて次代の増殖のために培養される小さいシュートとシュート塊とを指す。** 各継代培養の終わりに収穫した 3 cm 以上のシュートの数で, 直ちに発根用培地にさしつけた。

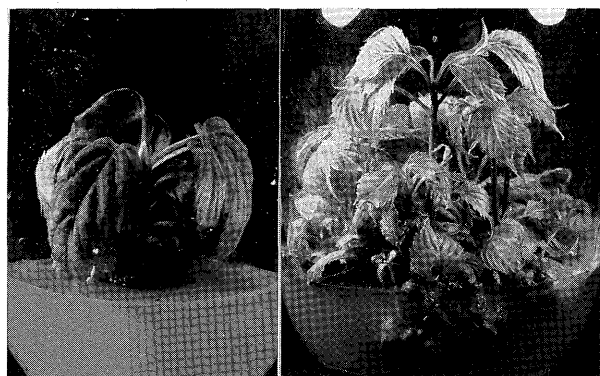


図-2. ハンカチノキの 3 代目継代培養におけるシュートおよびシュート塊の伸長状況 (初代培養開始後, 約 170 日目)

左: 幼若化しないシュート (BAP 3.16 μM と NAA 0.316 μM を含む BW 培地), 右: 幼若化したシュート塊 (BAP 10.0 μM と NAA 0.316 μM を含む BW 培地)。

10.0 μM 添加した培地を用いた。BAP 10.0 μM の培地では一部の培養物にややガラス化したものが見られたが, シュートの数は増加し, 発生したシュートの葉の形は芽生えの葉のように幼若化した (図-2 右)。BAP を 10.0 μM 加えた BW 培地では, シュート塊の増殖が認められたが, ガラス化した培養物も見られたので, BAP の濃度がやや高いと考えられた。そこで 4~6 代目の継代培養では BAP の濃度を 3.16 μM と 5.62 μM の 2 水準で培養したところ, 3.16 μM 添加の培地では依然としてシュートの増殖はみられず, 葉の形は幼若化しなかったのに対して, 5.62 μM 添加の培地では培養物のガラス化はなく, 図-2 の右のようにシュートがよく発生し, 葉の形も幼若化した。7 代目以降の継代培養培地には, BAP を 5.62 μM の濃度だけとし, 9 代目以降の継代培養培地についてはこれに添加する NAA の濃度を検討した。表-3 からわかるように, シュート塊が幼若化し, 発根に用いられるような 3 cm 以上のシュートが多量に得られたのは継代培養 7 代目以降であり, 10 代目で BAP 5.62 μM と NAA 0.316 μM または



図-3. ハンカチノキの 9 代目継代培養におけるシュートとシュート塊

初代培養開始後, 474 日目の BAP 5.62 μM と MAA 0.316 μM を含む BW 培地で培養した 1 瓶から得られたシュートおよびシュート塊。上段: 発根培地にさしつけるシュート群, 下段: 継代培地に移植するシュート塊群。

表-4. 継代培養8代目で得られたハンカチノキシートの発根率と順化率

発根培地(1/2 BW)の植物ホルモンなどの組成						
活性炭	0.0	0.0	0.1	0.1	0.5	0.5 %
IBA	3.16	10.0	3.16	10.0	3.16	10.0 μM
NAA	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0 μM
供試シュート数	22	22	22	22	22	22
発根率*	95.0	100.0	100.0	85.0	100.0	90.0 %
発根数/発根シュート数 (平均 $\pm$ 標準偏差)	9.3 $\pm$ 3.8	10.4 $\pm$ 3.0	4.0 $\pm$ 2.3	2.9 $\pm$ 1.9	3.4 $\pm$ 1.9	3.7 $\pm$ 2.9
平均根長 mm (平均 $\pm$ 標準偏差)	6.1 $\pm$ 9.5	45.3 $\pm$ 8.9	32.9 $\pm$ 12.6	100.1 $\pm$ 39.2	113.0 $\pm$ 44.9	33.6 $\pm$ 16.9
順化率**	82.4	78.9	100.0	93.8	100.0	100.0 %
備考	根の分岐なし 根の分岐なし 分岐した根多い 分岐した根多い 分岐した根多い 分岐した根多い					

* さしつけ後, 60 日目の発根率.** 鉢上げ後, 40 日目の順化率。

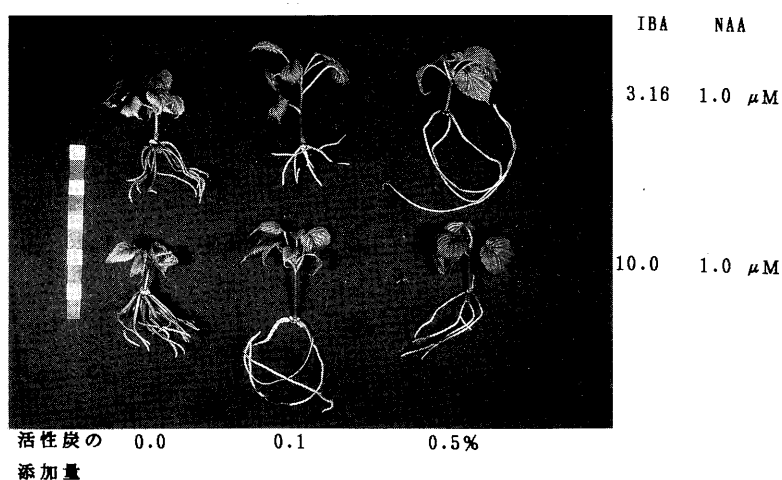


図-4. ハンカチノキ継代培養8代目に得られたシュートの発根(さしつけ後約75日目(スケール:10 cm))

1.0 μM の組み合わせ添加した培地で急激にシュート塊の数と収穫して発根に供し得るシュート数が増加した。9代目の継代培養を終わった時点での1瓶から得られたシュート塊を, 10代目の継代培養に移植する短いシュート群と, 発根培養にさしつけるシュートとに切り離れた時の状態を図-3に示す。

3. シュートの発根

7代目以降の継代培養の植え継ぎの都度収穫したシュートを, 発根培地にさしつけて発根をはかった。ケムリノキ, ウテリスカンバ, ワイセイクリ等のマヨネーズ瓶内で増殖したシュートでは, 発根培地に活性炭を添加することによって発根率が向上したことから(未発表), ハンカチノキの継代培養で得られたシュートにも適用した。8代目の継代培養を終えた時点で得られたシュートを用いたときの, 発根率, 発根根数, 平均根数, 平均根長を表-4に示す。活性炭の有無に関わらず, 85~100%の発根率を示した。発根シュート当たりの発根根数は, 活性炭なしの培地では短いものが多く, 活性炭を添加した培地では長く伸長して根数が少なかった(図-4)。また活性炭を加えない培地にさしつけたシュートの葉縁はやや黄~赤褐色を呈した



図-5. 順化, 伸長しつつあるハンカチノキの幼植物(鉢上げ後, 約60日目)

のに対して活性炭を加えた培地にさしつけたシュートの葉は, さしつけ時より2~3枚の葉数を増して伸長し, 深緑色を呈した。IBAの濃度間には有意な違いが見られなかった。

4. 順化

発根培地にさしつけて発根した幼植物体は, 培養室内で

瓶の蓋をゆるめ、4週間の間予備順化した。瓶から取り出した幼植物体は水道水で根から寒天を洗い落とした後、メトロミックス (Grace Sierra Horticultural Products Co., CA) とフヨウライト (フヨウライト株式会社, 東京) を1:1に混ぜた培土を、7.5 cm ビニールポットにつめたものに鉢上げした。鉢上げしたポットは遮光率40%の白色シェードのラブシート (ユニチカ, 東京) で覆った温室内ベットに並べ、適時噴霧灌水して順化した。ラブシートは30日で取り除き、鉢上げ40日目の鉢上げ苗木数に対して活着生存した苗木数で表した順化率は、表-4に示したとおりである。この表からわかるように、活性炭を加えない培地上で発根させた幼植物体の順化率は低く、78.9~84.2%を示したのに対して、活性炭を加えた培地で発根させた幼植物体はよく活着して92.8~100.0%の順化率を示し、活性炭の効果がうかがえた。

樹木の場合、草本と違って発根させてから鉢上げしないと活着が望めないこと、および増殖がある程度まで進んだ段階で、その後はシュート塊の増殖と発根に供するシュ-

ートの収穫とを並行させて行う必要がある(3)。また、発根した幼植物体をガラス器から器外に直接鉢出し移植した場合には、直ちに葉がしおれて活着が難しいため、培養室内でのある程度の予備順化が必要である。

ハンカチノキの器官培養による大量増殖の場合でも、上記の点を満たしてようやく成功の域に達した。継代培養の初期数代のシュートとシュート塊の増殖速度が極めて遅いことから、これをクリアーするための培地の組成と培養条件の検討と探索をさらに進める必要がある。

引用文献

- (1) CHALUPA, V. (1981) Propagation of broadleaved forest trees *in vitro*. Commun. Inst. For. Czechoslov. 12: 255-271.
- (2) LLOYD, D. and McCOWN, B. (1980) Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. Comb. Int. Plant Propagator's Soc. 30: 421-427.
- (3) 佐藤 亨 (1990) 樹木の器官・カルス培養の基礎的研究. 森林総合研究所研究報告 360: 35-119.

(1996年5月29日受理)