

組織培養によるキハダの増殖の試み

誌名	愛媛県林業試験場研究報告
ISSN	03892875
著者名	岡田,恭一 余吾,初徳 鋤先,孝一
発行元	愛媛県林業試験場
巻/号	21号
巻号補足	
掲載ページ	p. 10-15
発行年月	2001年3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



組織培養によるキハダの増殖の試み

岡田 恭一・余 吾初 徳^{*1}・鋤 先 孝一^{*2}

An attempt of multiplication of Kihada (*Phellodendron amurense*) by tissue culture

Kyouichi OKADA, Hatsunori YOGO^{*1} and Kouichi SUKISAKI^{*2}

用材や薬用など、様々な用途に利用でき、農山村における換金作物として期待されるキハダの増殖について研究を行った。この結果、初代培養から次代に継代できるシュートの割合は、クローンやサイトカイニンの濃度により差が認められ、クローンでは三坂3号が高くなり、サイトカイニンの濃度では、BAPでは濃度が高いほど、TG-19では濃度が低いほど高くなった。また、挿し木における挿し穂の部位については、基部から発根する個体が多くなった。

キーワード — 汚染率、キハダ、継代率、組織培養

1. 緒言

近年、国民生活の向上から、山菜や薬用効果のある樹木への需要が高まっている。この中で、キハダは古くから整腸等の民間薬として利用され、また材は机や器具材に使用されるなど、幅広い用途を持っている。このため、本研究においては、優良な形質を持つクローンから、大量に育成することを目的とし、組織培養とそれ以外の方法による増殖方法について検討を行った。なお、この試験は「地域特性品種の組織培養増殖研究」において実施したものである。

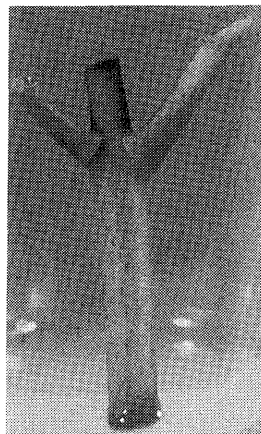
2. 材料及び調査方法

2.1 培養に用いたクローン及び部位

本県産の優良形質木である、三坂1号～4号、8号、9号、河之子1号～5号を用いた。

また培養の供試部位としては、以下の4種類を使用した。

- ①えき芽を含む茎軸小片で葉柄をY字状に調整したもの(以下「Y軸小片」と略)
- ②上記のY軸小片の葉柄を折り、えき芽部分を露出するように調整したもの(以下「露出Y軸小片」と略)
- ③羽状複葉部
- ④葉柄を折りえき芽を露出させて、数mm角四方に切り取ったもの(以下「葉柄内芽」と略)



写真—1 Y軸小片



写真—2 露出Y軸小片

*1 現農林水産部森林整備課

*2 現林業試験場総務課研修係

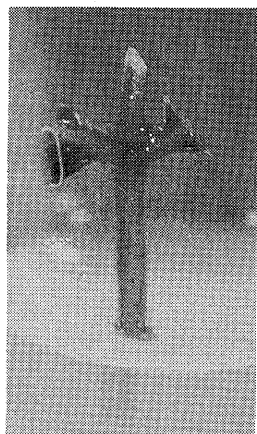


写真-3 羽状複葉部

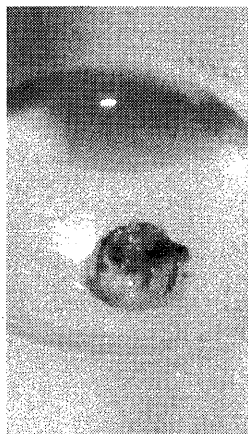


写真-4 葉柄内芽

このうち、Y軸小片、露出Y軸小片、羽状複葉部については、屋外のクローンから採取した枝を、温室内で水ざしにより展葉させたシュートより採取した。また、葉柄内葉については、温室内の鉢植えの個体より採取した。

2.2 調査項目

2.3 組織培養による増殖方法についての検討

2.3.1 材料の供試部位と汚染率の関係

温室内で展葉させたシュートより材料を採取した。殺菌方法としては、70%エタノールで45秒表面殺菌を行い、供試したシュートのうちカビにより汚染された個体の割合(以下「汚染率」と略)について検討した。試験は3回の繰り返しにより行い、クローンとして三坂2号を使用した。

2.3.2 材料の採取時期と汚染率の関係

材料の供試部位として、葉柄内芽とY軸小片を使用し、採取時期の違いによる汚染率について検討した。試験は葉柄内芽については2回、Y軸小片については6回の繰り返しにより行い、部位ご

との条件については、表-1のとおりとした。

2.3.3 材料の殺菌時間と汚染率の関係

温室内で展葉させたY軸小片を材料として、エタノールの殺菌時間の違いによる汚染率について検討した。試験は12回の繰り返しにより行い、殺菌時間は、45秒、1分、2分、3分の4段階とした。

2.3.4 成長調整物質と継代率の関係

初代培養に用いる培地として、WPMを使用し、成長調整物質として(1)TG-19を $1\mu\text{M}$ 、(2)IBA $0.1\mu\text{M}$ +BAP $1\mu\text{M}$ の2種類を使用し、初代培養から次代に継代できるシュートの割合(以下「継代率」と略)について検討した。試験は3回の繰り返しにより行い、材料として温室内で展葉させた三坂1号のY軸小片を使用した。

2.3.5 クローンと継代率の関係

クローンとして、三坂1、2、3号を使用し、それぞれの継代率について検討した。試験は2回の繰り返しにより行い、材料として温室内で展葉させたY軸小片を使用し、培地はWPMにTG-19を $5\mu\text{M}$ 添加したものを使用した。

2.3.6 成長調整物質の濃度と継代率の関係

初代培養に用いる培地としてWPMを使用し、使用する成長調整物質の種類と濃度の組み合わせを変え、それぞれの継代率について検討した。試験は2回の繰り返しにより行い、サイトカイニンの種類により、TG-19区とBAP区とに区分した。TG-19区はサイトカイニンのみを添加し、濃度は1、3、 $5\mu\text{M}$ の3水準とした。

なお、両区とも温室内で展葉させた三坂1号のY軸小片を使用した。

表-1 供試部位ごとの条件

採取部位	クローン	殺菌方法	採取時期
葉柄内芽	河之子4、5号	70%エタノール3分+	6月7日、11日、28日
	三坂3号	1%アンチホルミン15分	7月13日、27日
Y軸小片	三坂1、8号	70%エタノール1分	5月22日、27日
			6月4日

2.4 組織培養以外による増殖方法についての検討

2.4.1 接ぎ木による増殖

接ぎ木による活着率について検討した。台木として、造園業者から購入したキハダ苗を使用した。また、穂木として3月上旬に野外から採取した本県産のキハダクロン(三坂1、3、4、6、7号、河之子1～5号)を使用した。採取した穂木は、接ぎ木をするまで、基部を水に浸して冷暗所(5℃)で保存した。接ぎ木はその年の4月中旬に切り接ぎまたは割り接ぎにより行い、終了したのものにはビニール袋を被せた。

2.4.2 挿し木による増殖

挿し木による活着率について検討した。穂木として、本県産のキハダクロン(三坂3、4、9号、河之子3～5号)と実生由来の苗を使用した。挿しつけは3月中旬に行い、挿しつけ方法、挿しつけ部位等の条件については以下のとおりとした。

①挿しつけ条件

・温室内のプランター

鹿沼土に押しつけ後かんれいしゃで覆いをかけ、ミストによる散水を行った。

・苗畑の畑土と鹿沼土

苗畑の畑土と、その上に5cm程鹿沼土で覆った場所の2ヶ所にそれぞれ挿しつけ、その後ビニールで密閉した。(密閉挿し)

②挿しつけ部位

穂木の幹に近い方から基部、中央部、先端部とし、温室内、苗畑のそれぞれの条件ごとに挿しつけた。

3. 結果及び考察

3.1 組織培養による増殖方法についての検討

3.1.1 材料の供試部位と汚染率の関係

供試部位ごとの汚染率は、Y軸小片が供試数90本中12本(以下「(12/90)」と表記)で13.3%となり、露出Y軸小片が5.6%(5/90)、羽状複葉部が11.1%(10/90)となり、露出Y軸小片の汚染率が最も低くなった(図-1)。

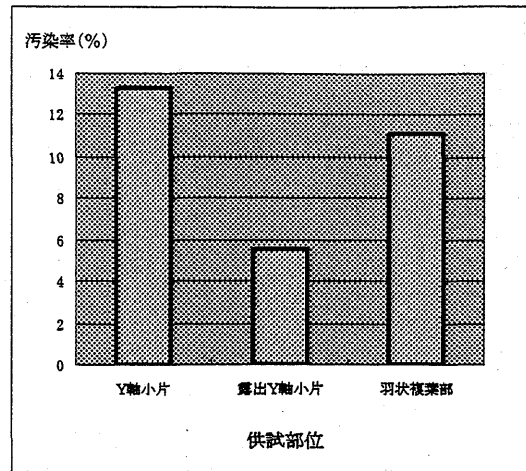


図-1 材料の供試部位と汚染率の関係

これは、葉柄部分を折ることにより、雑菌に汚染された部位が減少し、殺菌の効果が高まったためではないかと考えられた。

3.1.2 材料の採取時期と汚染率の関係

葉柄内芽については、6月7日の汚染率が50%(13/26)と最も高く、Y軸小片については6月4日が11.1%(20/180)と最も高くなった(図-2)。

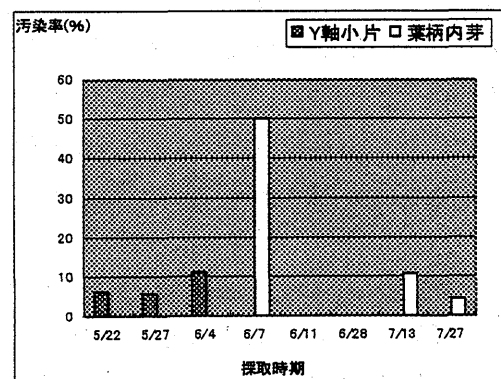


図-2 材料の採取時期と汚染率の関係

3.1.3 材料の殺菌時間と汚染率の関係

殺菌時間と汚染率との間には有意差が認められ、45秒で23.9%(100/418)、1分で7.8%(28/360)、2分で8.7%(4/46)、3分で2.7%(2/75)となり、3分間で最も低くなった(図-3)。

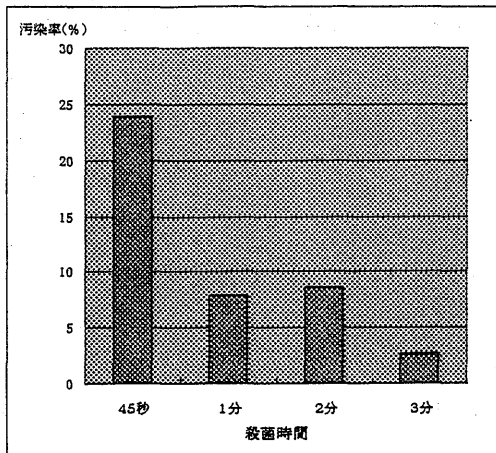


図-3 材料の殺菌時期と汚染率の関係

3.1.4 成長調整物質と継代率の関係

TG-19を添加した場合には、供試数61本中50本を継代でき(以下(50/61)と表記)、継代率は82%、BAPを添加した場合は73.3%(44/60)となり、TG-19を添加した場合の方が継代率は高かった(図-4)。

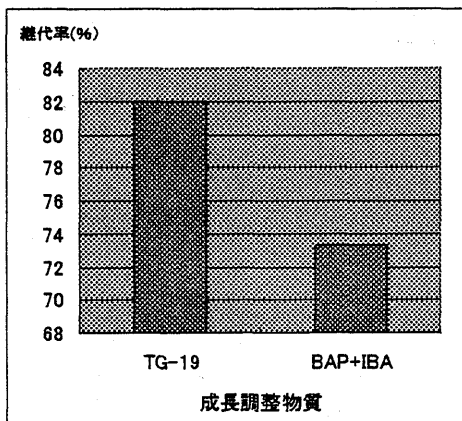


図-4 成長調整物質と継代率の関係

3.1.5 クローンと継代率の関係

クローンと継代率の間には有意差が認められ、三坂1号では70.4%(38/54)、同2号では17.4%(16/92)、同3号では95.6%(43/45)となり、三坂3号が最も高く、三坂2号で最も低くなった(図-5)。

挿し木や接ぎ木については、親木や品種により活着性に差があることが報告されている(船越ほか、1982、谷口ほか、1996)が、今回の試験では

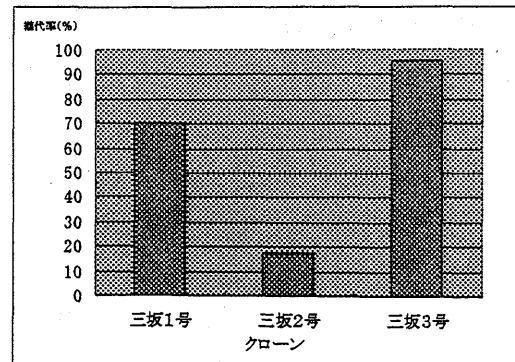


図-5 クローンと継代率の関係

組織培養における継承率においても、クローンにより差が認められた。

3.1.6 成長調整物質の濃度と継代率の関係

TG-19区の場合は、 $1\mu\text{M}$ で82.1%(46/56)、 $3\mu\text{M}$ で74.5%(38/51)、 $5\mu\text{M}$ で70.4%(38/54)となり濃度が高いほど低くなった。また、BAP区の場合は、 $1\mu\text{M}$ で74.5%(41/55)、 $3\mu\text{M}$ で76.3%(45/59)、 $5\mu\text{M}$ で77.8%(42/54)となり、濃度が高いほど高くなった(図-6)。キハダの葉柄内芽を使用した場合の開葉とシュート形成のためのBAPの最適濃度は、 $1\mu\text{M}$ 前後かそれよりもやや低濃度側にあるという報告がある(有吉、1989)が、今回の調査では $1\mu\text{M}$ から $5\mu\text{M}$ の範囲内で、BAPが高濃度で継代率が高くなった。しかし、 $1\mu\text{M}$ よりも低濃度、あるいは $5\mu\text{M}$ よりも高濃度での調査は行っていないので、今後検討する必要がある。

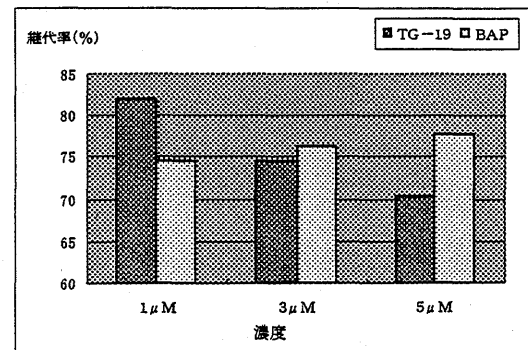


図-6 成長調整物質の濃度と継代率の関係

3.2 組織培養以外による増殖方法についての検討

3.2.1 接ぎ木による増殖

検討した結果、クローンの違いにより活着率に違いが見られ、河之子1、2号で高く、三坂3、4、7号で低くなった(表-2)。トチノキでは品種により活着率に差があることが報告されており(谷口ほか、1996)、キハダにおいてもこの傾向が認められた。また、培養における継代率と接ぎ木による活着率について検討を行ったが、有意差は認められなかった。

3.2.2 挿し木による増殖

試験を行った結果、全体で21本の個体に発根が認められたが、その内苗畑で発根したものは、鹿沼土を使用した場合の2本のみで、その他はすべて温室内であった。また発根の認められたクローンは、三坂9号と実生由来の個体のみであった(表-3)。また、発根した個体の挿し穂の部位ごとの本数を調べたところ、基部が15本、中央部が2本、先端部が4本で、基部から発根した個体が最も多かった(図-7)。また、挿し木による発根率と組織培養による継代率について検討を行ったが、有意差は認められなかった。

表-2 接ぎ木による活着率

	三坂1号	三坂3号	三坂4号	三坂6号	三坂7号	河之子1号	河之子2号	河之子3号	河之子4号	河之子5号	合計
接ぎ木本数	40	7	6	3	10	20	40	17	13	7	163
活着本数	29	3	2	2	1	19	38	13	8	5	120
活着率(%)	72.5	42.9	33.3	66.7	10.0	95.0	95.0	76.5	61.5	71.4	73.6

表-3 挿し木による活着率の検討

			三坂3号	三坂4号	三坂9号	河之子3号	河之子4号	河之子5号	実生由来	合計
温室	基部	供試数			12				12	24
		活着数			2				11	13
	中央部	供試数			12				12	24
		活着数			1				1	2
	先端部	供試数			12				12	24
		活着数			1				3	4
苗畑	鹿沼土	基部	供試数	3	1	12	8	3	11	38
			活着数	0	0	2	0	0	0	2
		中央部	供試数			12			12	24
			活着数			0			0	0
		先端部	供試数			12			12	24
			活着数			0			0	0
	畑土	基部	供試数			14				
			活着数			0				
		中央部	供試数			14			14	
			活着数			0			0	
		先端部	供試数			14			14	
			活着数			0			0	

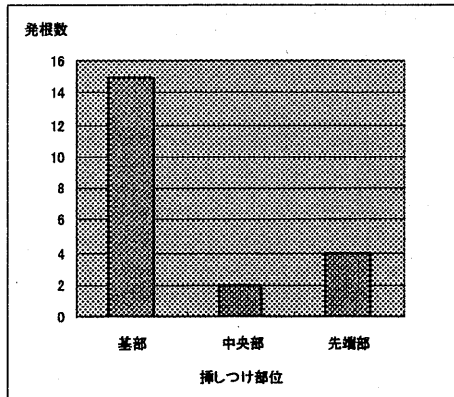


図-7 挿しつけ部位と発根数

4. 結 論

キハダの増殖について、組織培養とそれ以外の方法について検討を行い、以下の知見を得た。

- (1)材料の殺菌時間では、70%エタノールで3分間殺菌した場合にカビによる汚染率は最も低くなった。
- (2)WPMを基本培地とした場合、次代に継代できるシュートの割合は、濃度が1~5 μ Mの範囲において、BAPでは濃度が高くなるほど、TG-19では濃度が低くなるほど高くなった。
- (3)次代に継代できるシュートの割合は、クローンにより差が認められ、三坂3号で最も高くなった。
- (4)挿し木における挿し穂の部位については、基部から発根する個体が最も多かった。

組織培養による増殖方法については、継代培養を繰り返すにつれて順次枯死する個体が目立ち、最終的な順化まで至っていないので、今後は継代に適した培地組成や培養環境について検討していく必要がある。また、組織培養以外の増殖方法については、挿し木により発根する個体が少ないので、発根率を向上させるための条件について検討していく必要が認められた。

参考文献

- 有吉邦夫(1986) キハダの組織・器官培養による苗木養成法—葉柄内芽の培養—。鳥取県研究報告32: 47-57
- 船越三朗・菅田定雄・二階堂利夫・鎌田暁洋(1982) トドマツのさし木—親木ごとのさし穂の発根率の違い—。日本林学会北海道支部講演集31: 195-196
- 谷口真吾・長石全志朗(1996) トチノキの接木増殖に関する研究(I)—接穂の採取時期、接木時期の違いが活着率に及ぼす影響。林木の育種「特別号」: 28-31