

組織培養によるサクラ類の増殖の試み

誌名	愛媛県林業技術センター研究報告 = Bulletin of the Ehime Prefectural Forest Research Center
ISSN	13489534
著者名	岡田,恭一 余吾,初徳 鋤先,孝一
発行元	愛媛県林業技術センター
巻/号	22号
巻号補足	
掲載ページ	p. 9-13
発行年月	2004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



組織培養によるサクラ類の増殖の試み

岡田 恭一・余吾 初徳^{*1}・鋤 先孝^{*2}

県内の4箇所に生育しているサクラを対象として、シュート伸長と発根の最適な条件について検討を行った。その結果シュートの伸長については、無菌下での試験ではBAPを5 μ M添加した場合に、有菌下では液肥として市販の植物育成剤の窒素:リン酸:カリの割合が5:10:5のものを使用した場合に伸長量は最も高くなった。また有菌下での発根においては、市販の発根促進剤に基部を浸水して植栽した場合に発根率が最も高くなった。

キーワード — BAP、発根率、発根促進剤、サクラ、シュート伸長量

1. 緒言

県内には、銘木や天然記念物と呼ばれる、歴史的に価値があり、その地域のシンボルとして親しまれている樹木が数多く存在している。そして、地域住民の間から、保存を求める声があがっているが、これらの樹木の多くは老齢化しており、中には病虫害に冒されている等樹勢が弱っているため、従来の挿し木や接ぎ木などといった方法では増殖させることが困難な場合が多い。

そのため今回の試験では、他地域において個体再生の実績があり、また樹体への負担が少ない組織培養による増殖方法を試みた。保全を必要とする樹木は多いが、今回はサクラの増殖を目的として試験を行った。

なお、本試験は「組織培養による貴重樹木の増殖研究」において実施したものである。

2. 試験に用いた材料

試験の対象として、次の4種類のサクラを使用した。



写真-1 サイホウジザクラ

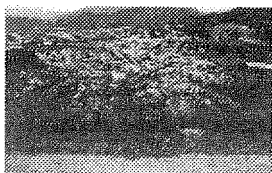


写真-2 陽春



写真-3 上村



写真-4 露峰

①サイホウジザクラ(写真-1)

松山市下伊台 西法寺にあるサクラで、イヨウスズミザクラとソメイヨシノが自然交配してできたといわれている個体

②陽春(写真-2)

丹原町来見にあるサクラで、ソメイヨシノの変種

③上村(写真-3)

重信町上村 伝宗寺にあるシダレザクラ

④露峰(写真-4)

久万町露峰 法蓮寺のシダレザクラ

3. 調査項目

殺菌方法による汚染率の違い、培地及び培養条件によるシュート伸長や発根率の違いについて検討を行った。

3.1 殺菌方法についての検討

材料として、サイホウジザクラ、陽春、上村、露峰の4種類のサクラを使用した。サイホウジザクラ、陽春については2月から3月にかけて母樹から長さ50~60cmの枝を採取し、それを温室内に設置した水槽へ基部を浸水して、萌芽したえき芽を使用した。そして70%エタノールで45秒殺菌した後、滅菌水で3回洗浄して初代培地へ置床した。

上村、露峰については、冬季に野外の苗畑で接ぎ木されている個体から採取した冬芽を試験の材料として使用した。採取した冬芽を以下のように殺菌を行った後に、滅菌水で3回洗浄し、芽鱗を剥がした後に初代培地へ置床した(表-1)。

培地へ置床してから約1ヶ月後に、供試した材料のうちカビにより枯死した個体の割合(以下汚染率という)について調査を行った。

表-1 試験の条件と供試数

品種名	採取部位	殺菌方法	供試数
サイホウジザクラ	腋芽	70%エタノール45秒	100
		70%エタノール45秒	337
		70%エタノール3分	27
		70%エタノール5分+1%アンチホルミン15分	55
陽	春	70%エタノール5分+5%過酸化水素水5分	24
		70%エタノール3分+5%過酸化水素水3分	25
		70%エタノール5分+1%アンチホルミン15分	43

3.2 シュートの伸長量についての検討

材料として、サイホウジザクラと陽春を使用し、次の項目について検討を行った。①糖源の種類、②活性炭の施用、③BAPの濃度、④液肥の種類、⑤二酸化炭素の施用、⑥光質の種類。

このうち④以外は、無菌下で寒天培地を支持体に用いて試験を行い、④については有菌下でバーミキ

*1 現愛媛県八幡浜地方局林業課, *2 現愛媛県西条地方局伊予三島林業課

ユライトを支持体に用いて試験を行った。培養容器としては、キノコ袋栽培用通気フィルターを取り付けた、ポリカーボネイト製の透明の通気性容器(直径8 cm、高さ10 cm、通気孔1.5 cm)を使用した。いずれの容器もシュートを置床した後は室温23℃、16時間日長、白色蛍光灯下(約4500ルクス)の培養室で培養を行った。

3.2.1 糖源の種類とシュート伸長量

試験の材料として、平成8年度から継代培養を行っている陽春を使用した。シュートを長さが1~2 cmとなるよう切り分け、1容器あたり1~5本のシュートを置床した。糖源と培地の組み合わせ及び供試数は表-2の通りとし、調査は試験開始から3ヶ月後に行った。

3.2.2 活性炭と伸長量

試験の材料として、平成8、9年度から培養を行っている陽春を使用した。シュートを長さが1~2 cmとなるよう切り分け、1容器あたり4本を置床した。活性炭の施用と培地の種類及び供試数については表-3の通りとし、調査は試験開始から2ヶ月後に行った。

3.2.3 BAPの濃度と伸長量

試験の材料として、平成8年度から培養を行っている陽春を使用した。シュートを長さが1~2 cmとなるよう切り分け、1容器あたり3ないし4本を置床した。BAPの濃度と培地及び供試数は表-4の通りとし、調査は試験開始から5ヶ月後に行った。

表-2 試験の条件と供試数

糖源の種類	培地の種類	供試数
トレハロース	MS+BAP5 μ M+IBA0.5 μ M	20(4)*
	MS+BAP5 μ M+NAA0.316 μ M	25(5)
サッカロース	MS+BAP5 μ M+IBA0.5 μ M	20(4)
	MS+BAP5 μ M+NAA0.316 μ M	25(5)

* () 内はポット数

表-3 試験の条件と供試数

活性炭の有無	培地の種類	供試数
有	MS+BAP5 μ M+IBA0.5 μ M	20(5)*
	MS+BAP5 μ M+NAA0.316 μ M	20(5)
無	MS+BAP5 μ M+IBA0.5 μ M	20(5)
	MS+BAP5 μ M+NAA0.316 μ M	20(5)

* () 内の数字はポット数

表-4 試験の条件と供試数

BAPの濃度 (μ M)	使用した培地	供試数
0	MS+IBA0.5 μ M	51(15)*
0.1		48(15)
5		52(15)
0	MS+NAA0.316 μ M	60(15)
0.1		60(15)
5		60(15)

* () 内の数字はポット数

3.2.4 液肥の種類と伸長量

試験の材料として、平成8年度から培養を行っているサイハウジザクラと陽春を使用した。シュートを長

さが1~2 cmとなるよう切り分け、基部に発根促進剤(石原産業(株)製 ルートン)を塗布した後バーミキュライトに挿しつけ、発根が認められた個体は約100mlのバーミキュライトを入れた培養器へ移植し、2ヶ月間育成してその間のシュート伸長量を測定した。使用した液肥と供試数は表-5の通りとした。培養中は、適宜液肥を添加し、表土が乾燥しないようにした。培養物は1容器あたり1ないし2本挿しつけた。

表-5 試験の条件と供試数

液肥	クローン名	供試数
5-10-5*	サイハウジザクラ	64
	陽春	19
10-3-3*	サイハウジザクラ	40
	陽春	8

*1 (株)ハイポネクスジャパン製の液肥で、N:P₂O₅:K₂Oが5:10:5のもの

*2 (株)ハイポネクスジャパン製の液肥で、N:P₂O₅:K₂Oが10:3:3のもの

表-6 試験の条件と供試数

CO ₂	培地	供試数
添加	無機物	20
	通常	10
無添加	無機物	20
	通常	10

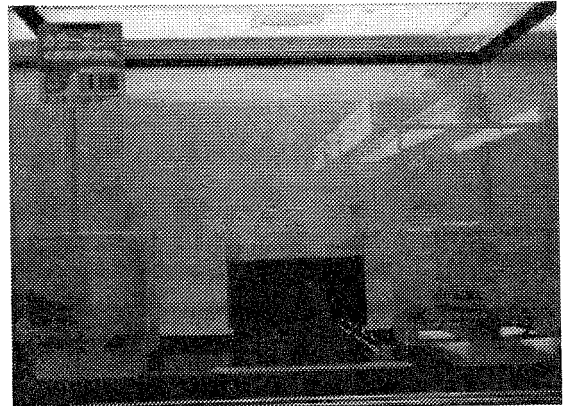


写真-5 培養状況

3.2.5 二酸化炭素の施用と伸長量

試験の材料として、平成8年度から培養を行っているサイハウジザクラを使用した。シュートを長さが1~2 cmになるように切り分け、MS培地(以下通常培地という)とMSの無機物のみを添加した培地(以下無機物培地という)に、各ポット当たり5本ずつ置床した。培養は市販の観賞魚用水槽(398×254×280mm)に透明のプラスチックの蓋をした中で行った(写真-5)。一方の水槽には、1日1回市販の入浴剤を約800mlの水に入れた容器を入れ、他方には入れなかった(表-6)。調査は試験開始から30日後に行った。

3.2.6 光質と伸長量

試験の材料として、平成8年度から培養を行っているサイハウジザクラを使用した。シュートを長さが1~2 cmになるように切り分け、無機物培地に各ポット5本ずつ挿しつけた(表-7)。培養は市販の観賞魚用水槽(398×254×280mm)に透明のプラスチックの蓋

をした中で行い、一方は通常の白色蛍光灯下(4500ルクス)に設置し、他方は発光ダイオード下(ピーク波長 660nm 光下 10 cmの光合成有効光量子束密度 $100 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{S}$)に設置した(写真-6)。調査は試験開始から 30 日後に行った。

3.3 発根率向上の検討

成長調整物質や培地、発根処理剤の種類を変えて、供試した個体のうち発根した個体の割合(以下「発根率」と略)について検討を行った。成長調整物質として IBA を使用した試験では、無菌条件下で寒天培地を使用して試験を実施したが、その他については有菌下で寒天以外の培地を使用して試験を実施した。

3.3.1 IBA の濃度と発根率

試験の材料として、平成 8 年度から培養を行っている陽春を使用した。シュートを長さが 1~2 cmに切り分け、1 容器あたり 5 本前後を置床した。培地は MS の無機物と糖分を 1/2にしたもの(以下 1/2MSという)を使用し、IBA の濃度や供試数は表-8の通りとした。調査は置床してから 60 日後に行った。

3.3.2 発根促進剤の種類と発根率

試験の材料として、平成 8 年度から培養を行っているサイホウジザクラを使用した。シュートを長さが 1~2 cmとなるように切り分け、発根処理を施した後に、液肥として 5-10-5 を添加したバーミキュライト培地に 1 ポット当たり 4~5 本を挿しつけた。発根処理の方法と供試数は表-9の通りとした。調査は試験開始約 40 日後に堀取りにより行った。

3.3.3 培養土の種類と発根率

試験の材料として、平成 8 年度から培養を行っているサイホウジザクラを使用した。シュートを長さが 1~2 cmとなるよう切り分け、液肥 5-10-5 に IBA を $0.1\text{mg}/\text{l}$ 添加した培養土に挿しつけた。培養土は市販のプランターの土、赤玉土、そしてバーミキュライトの 3 種類を使用した(表-10)。市販のプランターの土、赤玉土は事前にオートクレーブで滅菌(121°C 、20 分)を行い、バーミキュライトはそのまま使用した。調査は、試験開始約 60 日後に堀取りにより行った。

3.3.4 液肥の種類と発根率

材料は、平成 8 年度から培養を行っている陽春を使用した。シュートを長さが 1~2 cmになるように切り分け、基部に市販の IBA の粉末を添加した後、液肥を添加したバーミキュライト培地に挿しつけた。液肥は 5-10-5、10-3-3、2-5-5 の 3 種類を使用した(表-11)。調査は試験開始約 40 日後に堀取りにより行った。

3.3.5 光質と発根率

試験の材料として、平成 8 年度から培養を行っているサイホウジザクラを使用した。シュートを長さが 1~2 cmになるように切り分け、無機物培地に各ポット 5 本ずつ挿しつけた。

培養は市販の観賞魚用水槽($398 \times 254 \times 280\text{mm}$)に透明のプラスチックの蓋をした中で行い、一方は

通常の白色蛍光灯下(4500 ルクス)に設置し、他方は発光ダイオード下(ピーク波長 660nm 光下 10 cmの光合成有効光量子束密度 $100 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{S}$)に設置した(表-12)。調査は試験開始から 30 日後に行った。

表-7 試験の条件と供試数

光質	供試数
蛍光灯	20(4)*
LED	30(6)

* () 内はポット数

表-8 試験の条件と供試数

IBAの濃度 (μM)	供試数
0.25	66
0.5	54

表-9 試験の条件と供試数

発根処理方法	供試数
市販のIBAの粉末を基部に添加する	63
市販の挿し木用発根剤(オキシベロン)の原液に、基部を約10秒浸水する	84
液肥として添加する5-10-5に、濃度が0.5 μM となるようにIBAを添加する	59

表-10 試験の条件と供試数

培養土	供試数
プランター土	29
赤玉土	23
バーミキュライト	38

表-11 試験の条件と供試数

液肥	供試数
5-10-5	32
10-3-3	66
2-5-5	16

表-12 試験の条件と供試数

光質	供試数
蛍光灯	20
LED	30

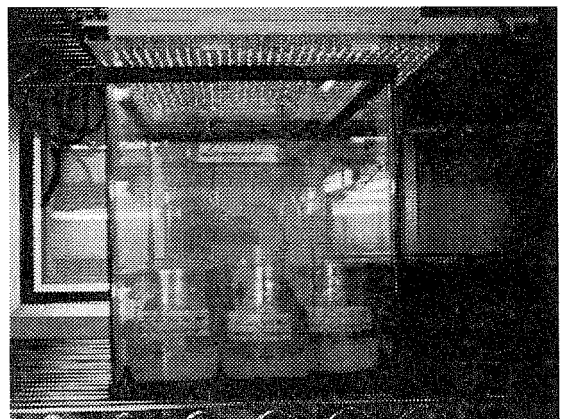


写真-6 培養状況

4. 結果及び考察

4.1 殺菌方法の検討

サイハウジザクラでは汚染率は1%(供試した100個体のうち1個体(以下「1/100」と略)、陽春では2.7%(9/337)となり、ほぼカビによる汚染を抑えることができた。

上村については、70%エタノールで5分殺菌した後、5%過酸化水素水で5分殺菌した場合に汚染率は41.7%(10/24)と最も低くなり、また露峰については、70%エタノールで3分殺菌した後、5%過酸化水素水で3分殺菌した場合に、汚染率は32%(8/25)と最も低くなった。しかし、依然として汚染率が高く実用には適さないため、更に殺菌方法や採取時期について検討する必要が認められた(図-1)。

4.2 シュートの伸長量についての検討

4.2.1 糖源の種類とシュート伸長量

試験を行った結果、いずれの場合もシュートの先端が枯死し、糖源による効果は認められなかった。中島ら(1999)によると、オオヤマザクラの培養においては、サッカロースはシュート伸長量を促進し、トレハロースはシュート形成を促進する傾向が認められたと報告されているが、今回行った試験ではその効果は認められなかった。これは、中島らの試験では成長調整物質としてBAPとGA3を使用しており、今回行った試験とはその組み合わせが異なっていたことや、供試した試験体の種類により、糖源による培養特性に差があるためではないかと考えられた(図-2)。

4.2.2 活性炭と伸長量

試験の結果、活性炭を添加したポットはすべて枯死し、活性炭による効果は認められなかった。近藤ら(1988)は、クロマツの胚培養において活性炭を添加した場合にはシュート長が無添加に比べて高くなったと報告しており、井出ら(1987)も、ヒノキの小枝葉の培養において、活性炭を添加した場合にシュート伸長が高くなったと報告している。今回の調査で効果が認められなかったのは、針葉樹と広葉樹という樹種の違いによるものか、あるいは他に添加している物質の影響によるものかは判明しなかった。

4.2.3 BAPの濃度と伸長量

オーキシンとしてIBAを添加し、BAPを添加しなかったポットは、すべて枯死した。

それ以外のポットについては、BAPを5 μ M添加した場合にシュート伸長量は最も高くなった($P<0.01$)。

4.2.4 液肥の種類と伸長量

液肥として、5-10-5を添加した場合の平均シュート伸長量は約1.96 cm、10-3-3を添加した場合には約0.44 cmとなり、5-10-5を施用した場合の方がシュート伸長量は高くなった($P<0.01$)。近藤(1995)がミズメ組織培養苗を使用して行った試験においても、試験開始後50日間のシュート伸長量は、5-10-5を使用した場合の方が10-3-3よりも有意に高いことが報告されている。10-3-3の特徴として、全窒素量に対するアンモニア態窒素及び硝酸態窒素の割合が低く、尿素の割合が高いことがあげられるが、このような成分組成の違いが、植物体の吸収に違いを及ぼし、ひい

てはシュート伸長量に差が出たのではないかと考えられた。

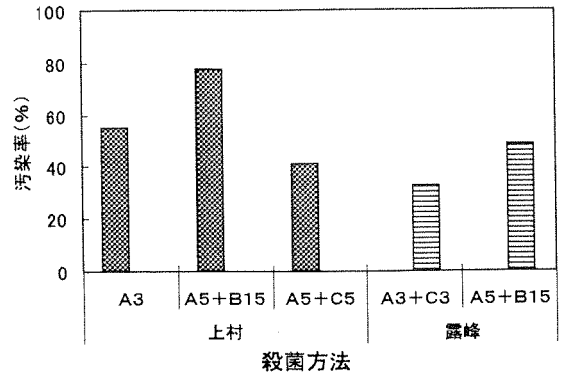


図-1 殺菌方法と汚染率

注:殺菌方法のA、B、Cはそれぞれエタノール(70%)、次亜塩素酸ナトリウム(1%)、過酸化水素水(5%)を表し、アルファベットの隣の数値は殺菌を行った時間(分)を表す。

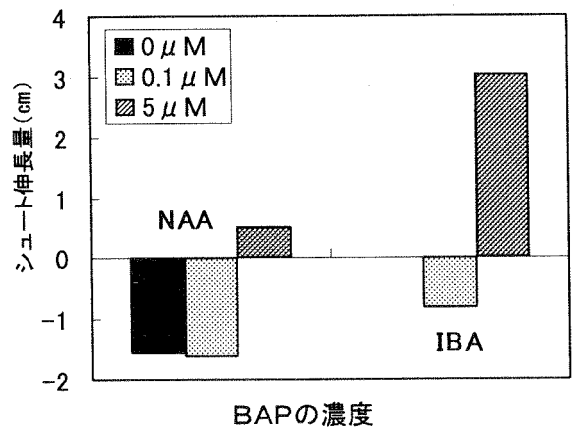


図-2 BAP濃度とシュート伸長量

4.2.5 二酸化炭素の施用と伸長量

シュートの平均伸長量は、二酸化炭素を施用した場合、通常培地では3.4 mm、無機物培地では1.4 mmとなった。また二酸化炭素を施用しない場合では、通常培地では2.9 mm、無機物培地では0.8 mmとなり、いずれの場合も二酸化炭素を添加した場合の方が伸長量は高くなったが、有意差は認められなかった(図-3)。白旗ら(1992)によると、高濃度の二酸化炭素の施用により、一時的に光合成が阻害されることが報告されている。そのため、今回の試験では、添加した入浴剤の量が多かったため、発生した二酸化炭素の濃度が高くなり、岡田(2003)が通常培地を使用して行った試験のようなシュート伸長に対する効果が認められなかったのではないかと考えられた。

4.2.6 光質と伸長量

シュートの平均伸長量は、蛍光灯を照射した場合が1.6 mm、発光ダイオードを照射した場合は0.6 mmとなり、蛍光灯区の方が高くなった($P<0.05$)。これは、現行の蛍光灯の光量で生育には十分であるのか、それとも二酸化炭素その他の条件が十分でないために、LEDの光量が光合成に十分に生かされなかつ

たのかという点が考えられたが、今回の試験では判明しなかった。

4.3 発根率向上の検討

4.3.1 IBA の濃度と発根率

IBA を 0.05mg/l 添加した場合の発根率は 42.4%(66 個体中 28 個体、以下「(28/66)と略」、0.1mg/l 添加した場合には 14.8%(8/54)となり、IBA を 0.05mg/l 添加した場合の方が発根率は高かったが、有意差は認められなかった。

4.3.2 発根促進剤の種類と発根率

IBA 粉末を使用した場合の平均の発根率は 17.5%、市販の挿し木用発根剤の場合は 51.2%、IBA を液肥中に溶かして添加した場合には 33.9%となり、市販の挿し木用発根剤を使用した場合に発根率が最も高くなった($P<0.01$)(図-4)。これは、発根に必要な有効成分が、長く植物体内に止まり、発根が促進されたためではないかと考えられた。

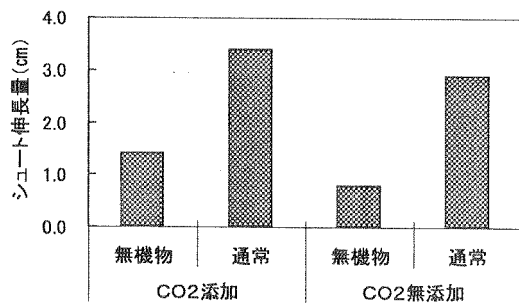


図-3 二酸化炭素の施用とシュート伸長量

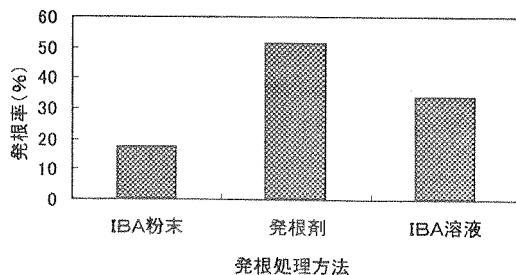


図-4 発根処理方法と発根率

4.3.3 培養土の種類と発根率

市販のプランター土を使用した場合の平均の発根率は 17.1%、赤玉土の場合は 68.6%、バーミキュライトの場合は 34.7%となり、赤玉土を使用した場合に発根率は最も高くなった(図-5)が、有意差は認められなかった。

4.3.4 液肥の種類と発根率

5-10-5 を使用した場合の平均発根率は 61.7%、10-3-3 の場合は 15.6%、2-5-5 の場合は 5.6%となり、5-10-5 を使用した場合に発根率は最も高くなった(図-6) が有意差は認められなかった。

4.3.5 光質と発根率

蛍光灯を照射した場合に発根率は 25%となったが、発光ダイオードを照射した場合では発根した個体は

認められなかった。

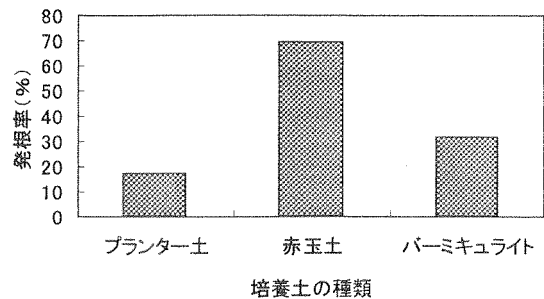


図-5 培養土の種類と発根率

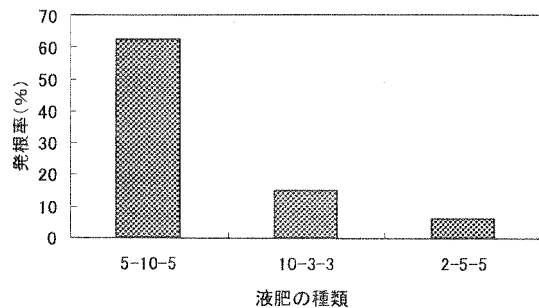


図-6 液肥の種類と発根率

5. 結論

本研究において以下の知見を得た。

- (1)基本培地として 1/2MS に IBA を $0.5 \mu\text{M}$ 添加したものを使用した場合、BAP を $5 \mu\text{M}$ 添加した時にシュート伸長量は最も高くなった。
- (2)バーミキュライトで育成中の個体に窒素:リン酸:カリの割合が 5:10:5 の市販の液肥を使用した場合、シュート伸長量は最も高くなった。
- (3)有菌下でバーミキュライト培地で発根を行う場合、基部を市販の挿し木用発根促進剤に 10 秒程浸水した場合に置床すると、発根率は最も高くなった。

参考文献

- 井出雄二・山本茂弘(1987)ヒノキの試験管内微小さし木における活性炭及び NADP の効果. 日林中支研論集 35:5-7.
- 近藤晃(1995)ミズメ組織培養苗の順化と初期成長に及ぼす液肥組成の影響. 日林論 106:419-422.
- 近藤禎二・九島宏道(1988)クロマツの胚培養(III)-活性炭の培地への添加による芽の伸長効果-. 日林論 99:455-456.
- 中島美幸・茂木靖和(1999)組織培養によるオオヤマザクラの大量増殖. 中森研 47:21-22.
- 岡田恭一(2003)入浴剤から発生させた二酸化炭素を添加したサクラ小植物体のシュート伸長、発根率の検討. 植物工場学会誌 15(1):39-42.
- 白旗学・橋本良二(1992)通常濃度 $\sim 5000\text{ppm}$ までの二酸化炭素濃度に対する数種針葉樹の光合成反応. 日林論 103:415-416.