

用材・薬用として利用できる樹木の組織培養による増殖方法の検討

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
発行元	愛媛県林業技術センター
巻/号	24号
巻号補足	
掲載ページ	p. 1-6
発行年月	2006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



〈論文〉

用材・薬用として利用できる樹木の組織培養による増殖方法の検討

岡 田 恭 一

Kyouichi OKADA

用材や薬用として利用できるメグスリノキ、イチイ、イチョウ、コノテガシワ、クロガキ、そしてヤマグワの6種類の樹木を対象に、組織培養による増殖方法を試みた。その結果、メグスリノキ、ヤマグワは休眠芽をエタノール＋過酸化水素水で、イチイは当年伸長枝、イチョウは休眠芽、そしてクロガキはえき芽をエタノール＋次亜塩素酸ナトリウム水溶液で殺菌した場合に、次代へ継代できる個体の割合が最も高くなった。継代培養3ヶ月後の生存率は、成長調整物質としてIBAとTG-19を添加した場合に高くなった。培地の種類はメグスリノキ、クロガキは1/2NMS、ヤマグワはMS、イチイはCD、イチョウでWPMが優れていた。また、クロガキは1/2NMS、イチイはCDの場合に発根が認められ、ヤマグワは1/2NMSの場合に発根率が最も高くなった。

キーワード — 組織培養、樹木、培地、成長調整物質

1. 緒言

近年、林業を巡る情勢は木材価格の低迷から厳しさを増している。そのため、短期間で収入が得られ、用材のみならず薬用としてなど、様々な用途へ利用できる樹木への期待が高まっている。しかし、これらの樹木の中には、一般的なさし木や接ぎ木といった増殖が困難なものがある。また、優れた形質を有するクローンを大量に増殖するためには、組織培養による方法が最適であると考えられる。そのため本研究では、組織培養による増殖方法を試みた。

2. 試験の対象とした樹種

表-1の通り。

3. 方法

3.1 初代培養から次代へ継代できる個体の割合

3.1.1 供試した部位

メグスリノキについては、えき芽、休眠芽、胚を使用した。ヤマグワ、クロガキはえき芽、休眠芽、イチョウは休眠芽、コノテガシワは当年伸長枝、イチイは休眠芽、当年伸長枝を初代培養の材料として使用した。えき芽は3～4月に、休眠芽は11～12月に、当年伸長枝は4～6月に愛媛県林業技

表-1 試験に使用した樹種とその特徴

樹 種	科	分 布	材の用途	薬 用 効 果
メグスリノキ	カエデ	本州(宮城・山形県以南)、四国、九州。日本固有*7	器具材、薪炭材*2	樹皮や小枝には、成分として肝機能の改善効果のあるカテキンやエビ・ロードデンドリンが含まれ、乾燥させたもの1日量約20gを十分に煎じて飲むと、眼精疲労・かすみ目・充血・視力低下などに効果があり、肝臓にもよい*3
イチイ	イチイ	北海道、本州、四国、九州、アジア東北部*8	建築材、器具材、鉛筆用材*1	葉を採取し、水洗い後に乾燥させたものを、生薬名「一位」といい、民間薬として1日量3～6gを煎じて利尿薬とする*3
イチョウ	イチョウ	中国原産とされるが自生地は不明*8	碁盤、将棋盤、箱、彫刻、建築など*1	微量の胃酸配糖体を含み、銀杏約5個を火で炙って食べるか煎じて飲み腫咳・去痰剤に、また葉は高血圧症などの予防にお茶代わりに服用するとよい*3
コノテガシワ	ヒノキ	中国原産*8	棺材*1	葉や果実を薬用(止血剤)に利用する*1
ヤマグワ	クワ	北海道、本州、四国、九州、サハリン、朝鮮*6	建築材、天然木化粧合板、家具など*5	根皮のコルク層を除き、乾燥させたものを、漢方では消炎性利尿・解熱・鎮咳薬として用いる*3
クロガキ	カキノキ	本州(静岡県以西)、四国、九州、琉球、台湾、中国(東南部)の暖帯～亜熱帯*4	指物細工、建築内部造作など*4	全開した若葉には、特にビタミンCが多く含まれ、よく乾燥させたものを細切りにして「柿の葉茶」として常用し、高血圧症の予防に用いる*3

*1 北村・村田(1979) *2 小林(1985) *3 松井・田中(2000) *4 日本林業技術協会(1968)
*5 染郷(1985) *6 山と溪谷社(2000a) *7 山と溪谷社(2000b) *8 山と溪谷社(2001)

術センター内の温室で鉢植している個体から材料を採取した。また胚については、9～10月に富士銅業(株)から購入した種子を使用した。それぞれの材料の採取および調整方法は図-1のとおりとした。

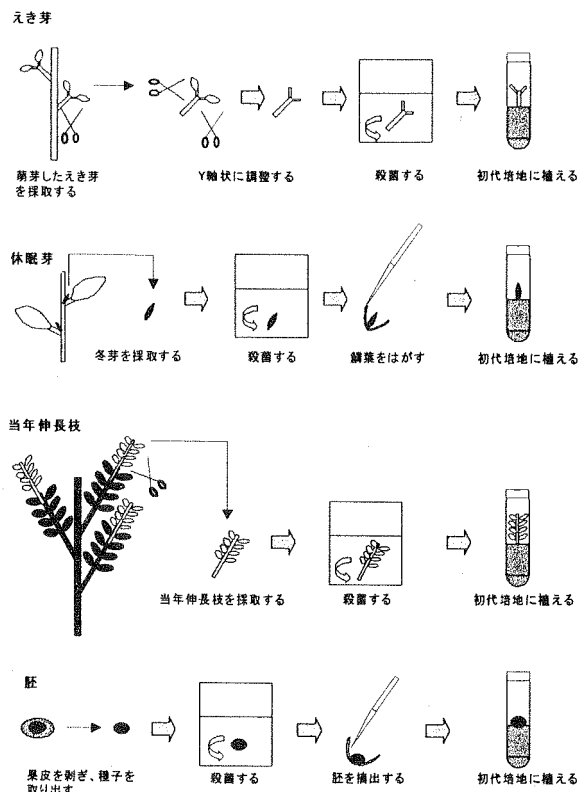


図-1 使用した部位と殺菌方法

3.1.2 殺菌方法

供試した部位ごとに、次の3通りの方法で殺菌を行った。

殺菌方法A

70%エタノール3分間+1%次亜塩素酸ナトリウム水溶液5分間

殺菌方法B

70%エタノール3分間+5%過酸化水素水5分

殺菌方法C

70%エタノール3分間

3.1.3 培養条件

初代培地はMS (Murashige, T. and Skoog, F., 1962) を使用し、成長調整物質は添加せず、炭素源としてスクロース (30g/l)、培地支持体として寒天 (10g/l) を加えた。材料を置床した培地は、照度4500lux、16時間日長、23℃一定のクリーン

ルーム内で培養を行った。材料は供試部位や殺菌方法などの条件ごとに30個体ずつ供試した。培地を置床してから2週間後に、供試した個体のうち次代へ継代できる割合（以下継代率と略）を調査した。試験は3回実施し、それぞれの継代率の平均値を求めた。

3.2 継代培養3ヶ月後に生存している個体の割合

材料は初代培養で生存している個体を用いた。

培地は、メグスリノキ、ヤマグワ、クロガキはMS、1/2NMS (MSの窒素成分を1/2にしたもの)、WPM (Lloyd, G. and McCown, B., 1981)、BTM (Chalupa, V., 1984) の4種類を、イチイ、イチョウ、コノテガシワはCD (Campbell, R. A. and Durzan, D. J., 1975)、MS、WPMの3種類を使用した。成長調整物質として、IBA (indole butyric acid) $0.5 \mu\text{M}$ + BAP (benzylaminopurine) $5 \mu\text{M}$ 、またはIBA $0.5 \mu\text{M}$ + TG-19 (N^6 -[2-(N -methoxy- N -methylamino)ethyl]-adenine) $5 \mu\text{M}$ を使用した。これらに炭素源としてスクロース (30g/l)、培地支持体として寒天 (10g/l) を加えた。材料を置床した培地は、照度4500lux、16時間日長、23℃一定のクリーンルーム内で3ヶ月間継代培養を行い、その間1ヶ月ごとに同じ組成の培地に植え替えた。なお、複数のシュートを生成した個体については、それらのうち1個体のみを次代へ継代した。材料はそれぞれの条件ごとに15個体ずつ供試した。試験開始から3ヶ月後に、供試した個体のうち生存している個体の割合（以下生存率と略）を調査した。試験は3回実施し、それぞれの生存率の平均値を求めた。

3.3 発根した個体の割合

材料は継代培養中のメグスリノキ、イチイ、クロガキ、ヤマグワを使用した。培地は継代培養と同じ組成のものを使用し、成長調整物質としてIBAを $5 \mu\text{M}$ 、炭素源としてスクロース (30g/l)、培地支持体として寒天 (10g/l) を加えた。材料を置床した培地は、照度4500lux、16時間日長、23℃一定のクリーンルーム内で培養を行った。材料はそれぞれの条件ごとに30個体ずつ供試した。

試験開始から2ヶ月後に、供試した個体のうち発根している個体の割合（以下発根率と略）を調査した。試験は3回実施し、それぞれの発根率の平均値を求めた。

4. 結果

4.1 初代培養から次代へ継代できる個体の割合

試験の結果を図-2に示す。

メグスリノキは、休眠芽+殺菌方法Bの場合に継代率が56%と最も高くなった。イチイは、当年伸長枝+殺菌方法Aの場合に100%、イチヨウは、殺菌方法Aの場合に48%、コノテガシワは殺菌方法Cの場合に22%、クロガキはえき芽+殺菌方法

Aの場合に100%、ヤマグワは休眠芽+殺菌方法Bの場合に継代率が40%と最も高くなった。

4.2 継代培養3ヶ月後に生存している個体の割合

試験の結果を図-3に示す。

メグスリノキは、1/2NMS+IBA・TG-19の場合に継代率が53.3%と最も高くなった。イチイは、CD+IBA・TG-19の場合に60.0%、イチヨウは、WPM+IBA・TG-19の場合に24.4%、クロガキは、1/2NMS+IBA・TG-19の場合に86.7%、ヤマグワは、MS+IBA・TG-19の場合に継代率が44.4%と最も高くなった。コノテガシワは継代培養中にすべて枯死した。

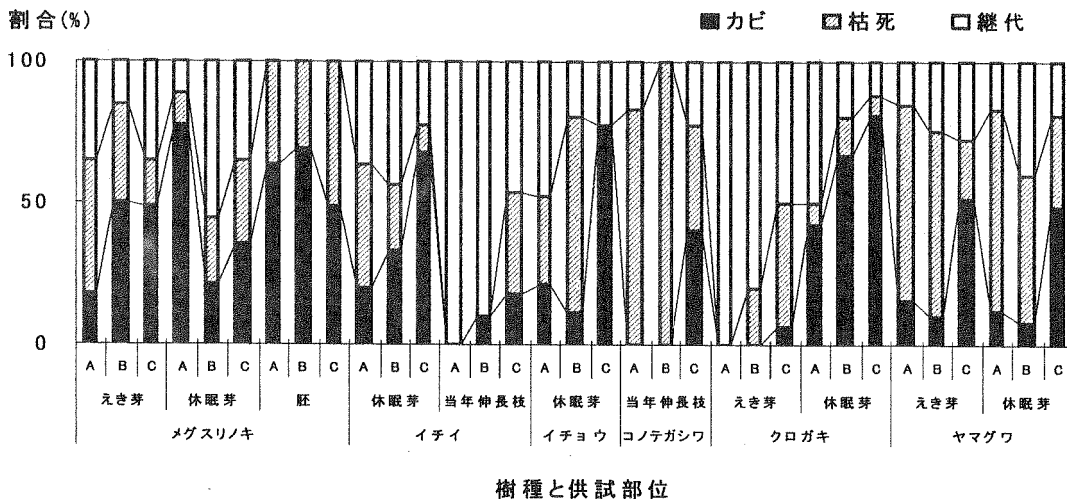


図-2 樹種・供試部位ごとの初代培養結果 (n=30)

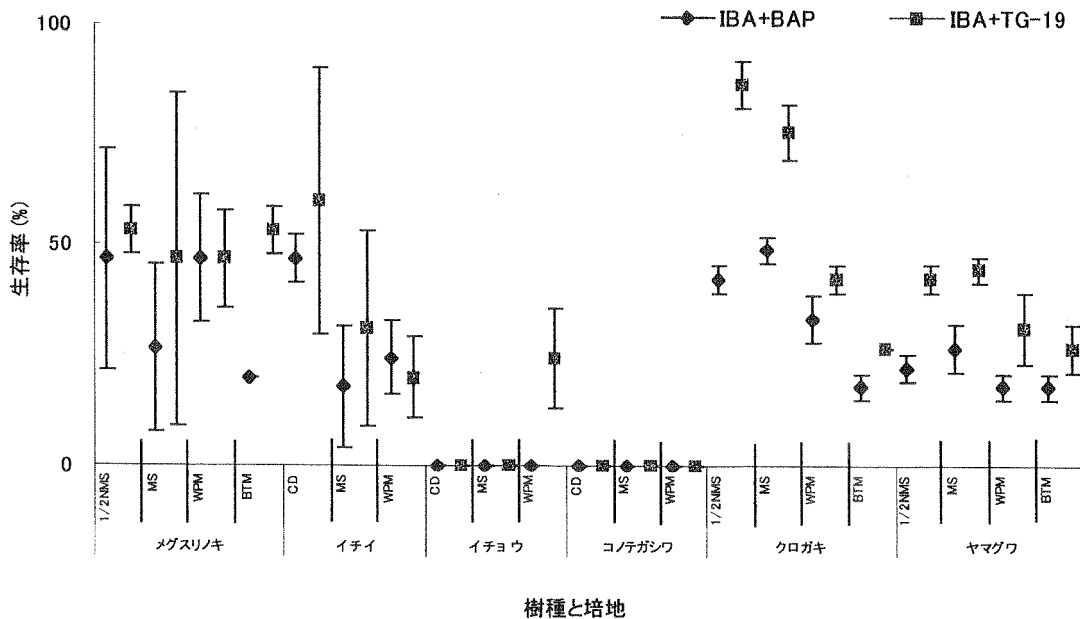


図-3 樹種・供試部位ごとの初代培養結果 (n=15)

4.3 発根した個体の割合

試験の結果を図-4に示す。

ヤマグワは、使用したすべての培地で発根が認められたが、1/2NMSの場合に発根率が最も高く62.2%となった。イチイはCD、クロガキは1/2 NMSの場合にのみ発根が認められ（写真-1,2）、その値はそれぞれ18.9%、1.1%であった。メグスリノキは、いずれの培地でも発根した個体は認められなかった。

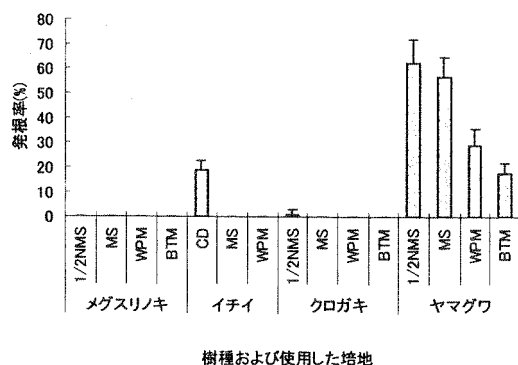


図-4 樹種・培地の種類と発根率 (n=30)

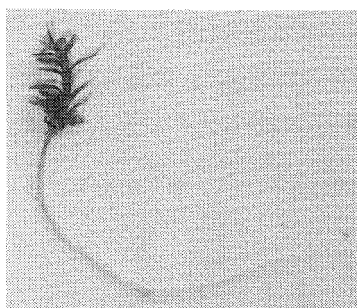


写真-1 イチイ発根個体

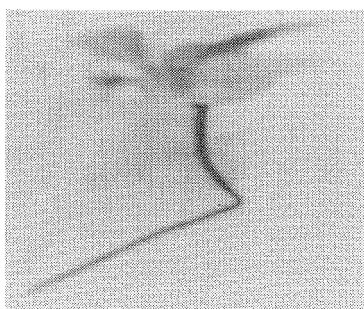


写真-2 クロガキ発根個体

5. 考察

5.1 初代培養に適した培養条件

滅菌にしばしば用いられる薬剤には、次亜塩素酸カルシウム（サラシ粉）溶液（1～10%溶液の濾液）、次亜塩素酸ソーダ溶液（0.5～10%）、エタノール（70～95%）、過酸化水素水（3～10%）、逆性石けんなどがある（加藤, 1979）。このうち、次亜塩素酸カルシウム水溶液、次亜塩素酸ナトリウム水溶液は、頂芽、えき芽、茎軸などの表面殺菌に用いられ、過酸化水素水は主にタネや茎軸の殺菌に、エタノールを単独で使用する場合は、茎軸を殺菌後剥皮して外植体にするとか、冬芽などの芽鱗を剥いで外植体にする時などに使用される（佐藤, 1989）。

カビに冒される個体の割合は、全体的に次亜塩素酸ナトリウム水溶液で殺菌した場合に少なくなった。これは、ナトリウムやさらし粉などの塩素剤の殺菌効果は非常に高い（高山, 1989）という報告と一致した。しかし、メグスリノキの休眠芽・胚、イチヨウの休眠芽、ヤマグワのえき芽などにおいては、過酸化水素水あるいはエタノールの場合の方が、カビに冒される個体の割合は少なくなった。この原因としては次の2点が考えられた。(1) 植物体の表面が疎水的な性質を持っていたり、細毛が生えている、あるいは細かな凹凸があるなどのために、滅菌の際表面に気泡がついてしまい、薬剤にふれない部分が残って滅菌不十分となったか、有効な塩素量が低下していた（加藤, 1979）。(2) 溶液のpHが高くなったため、主成分のClOの活性がなくなってしまった（佐藤, 1989）。

一方、次亜塩素酸ナトリウムで殺菌した場合には、枯死する個体の割合も高くなった。塩素剤の殺菌効果は組織の損傷が激しく（高山, 1989）、また植物体に付着したものが容易に除去されず毒性が残っていた（加藤, 1979）ためと考えられた。また、コノテガシワやイチヨウの休眠芽などのように、過酸化水素水で殺菌した場合や、メグスリノキの胚などのようにエタノールのみの殺菌でも枯死する個体の割合が高くなった。これは、作業

中に組織を傷つけたため、組織内部が薬害を受けたことや、あるいは採取した材料がまだ十分に固まっていなかったためではないかと考えられたが、はっきりした原因は判明しなかった。

5.2 継代培養に適した培養条件

ほぼすべての樹種において、同一の培地でIBA+TG-19の場合に生存率が高くなる傾向が見られた。また培地は、ヤマグワはMS、クロガキは1/2NMS、イチイはCD、イチヨウでWPMが最も高くなったが、メグスリノキは特に培地による違いは見られなかった。岡（1989）のクワでの培養や、近藤ら（1996）のオガサワラグワでの培養でも基本培地としてMSが使用されており、ヤマグワもこれらと同じくMSを基本とする培地が適しているのではないかと考えられた。イチイのカルス誘導（小山, 1992）やキャラボクのカルス誘導（岡村ら, 1993）では、基本培地としてMSまたはそれをベースにした培地が使用されている。今回は、試験の材料として当年伸長枝を使用しており、カルスとは要求する栄養の種類や量が異なるため、CD培地の生存率が最も高くなったのではないかと考えられた。同様にイチヨウのカルス誘導（福田・伊佐地, 1991）では、MSを基本とした場合に最もカルスの形成率が高くなったことが報告されているが、これもイチイと同様、供試した部位が異なるため、WPMの生存率が高くなったのではないかと考えられた。またメグスリノキについては、特定の養分に対する要求度が高くないため、培地の違いがみられなかったと考えられたが、今回の試験では特にはっきりした原因は判明しなかった。

成長調整物質については、イネ葉切片を用いた試験においては、TG-19はBAよりも移動性がよい（Maruyama et al., 1993）と報告されているため、より強いサイトカイニン活性により生存率が高くなったのではないかと考えられた。また、クヌギのシュートおよび二次不定胚の増殖において、BAPよりもTG-19の方が効果的である（Sasaki et al., 1993）と報告されている。一方、

oak (*Quercus lobur* L.) のシュート伸長においては、BAPはkinetinよりも効果的であるが、高濃度であるとシュートが短くなると報告されている（Chalupa, V., 1984）。そのため、今回の試験においてもTG-19が効果的であったものと考えられた。

5.3 発根に適した培養条件

オガサワラグワでは、MS培地の窒素成分を1/4、その他の成分を1/2とした培地を使用したところ、NAAの添加の有無によらず平均して75%以上の発根が認められたと報告されている（近藤ら, 1996）。今回の試験では、最も高かった場合で、1/2NMSの場合の62.2%と全体的に低い結果となった。今回の試験の対象ではないが、ヒノキの苗条の発根では、前培養でBAPを添加した苗条は発根性が悪く、根の成長は抑制されることが報告されている（田中, 1999）。そのため、ヤマグワの場合も残留しているBAPの影響が考えられた。イチイについては、CD培地の場合に発根はみられたが、発根するまでに約3ヶ月ほどかかった。イチイの胚の反応は著しく遅い（小山, 1992）といわれており、また現在報告のあるほとんどはカルス培養の例であるため、今回行った培地条件などが適当であったかどうか更に検討する必要がある。またクロガキについては、1/2NMSの場合にわずかに1個体の発根がみられたのみであり、今後更に検討する必要がある。

6. 結言

今回の試験では次の知見を得た。

- (1) 初代培養に適した殺菌方法は、メグスリノキ、ヤマグワの休眠芽はエタノール+過酸化水素水、イチイの当年伸長枝、イチヨウの休眠芽、クロガキのえき芽はエタノール+次亜塩素酸ナトリウム水溶液であった。
- (2) 継代培養に適した培地は、メグスリノキ、クロガキは1/2NMS、ヤマグワはMS、イチイはCD、イチヨウはWPMであった。また成長調整物質は、いずれもIBA+TG-19であった。
- (3) 発根に適した培地は、ヤマグワは1/2NMSで

あった。またクロガキでは1/2NMS、イチイではCDの場合に発根が認められた。

- (4) 初代、継代、発根に適した条件は、樹種によって異なるため、各樹種に適した培養方法を用いる必要がある。

7. 引用文献

- Campbell, R.A. and Durzan, D.J. (1975) Induction of multiple buds and needles in tissue cultures of *Picea glauca*. *Can. J. Bot.* Vol. **53** : 1652-1657.
- Chalupa, V. (1984) *In vitro* Propagation of Oak (*Quercus robur* L.) and Linden (*Tilia cordata* MILL.). *Biologia Plantarum* (Praha). **26**(5) : 374-377.
- 福田忠徳・伊佐地万里子 (1991) イチョウの組織培養. 第41回 日本木材学会大会研究発表要旨集 : 438.
- 加藤博之 (1979) 初代培養. (新植物組織培養. 竹内正幸ほか編, 411pp, 朝倉書店, 東京). 27-54.
- 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
- 近藤禎二・岡村政則・峠田宏 (1996) オガサワラグワ芽生えからの試験管内増殖. *日林論* **107** : 265-266.
- 小林義雄 (1985) メグスリノキ (有用広葉樹の知識. (財) 林業科学技術振興所, 514pp, (財) 林業科学技術振興所, 東京). 362-363.
- 小山真澄 (1992) イチイの組織培養. 103回日林論 : 489-490.
- Lloyd, G and McCown, B. (1981) Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. *Proc. Inc. Proc. Int. Plant Prop. Soc.* **30** : 421-427.
- Maruyama, T., Tanaka, A., Oda, M., Suzuki, T., and Oritani, T. (1993) Synthesis and Biological Activity of New Water-soluble Cytokinins. *Biosci. Biotech. Biochem.* **57** (5) : 803-807.
- 松井宏光・田中信也 (2000) 愛媛の薬用植物図鑑. 334pp, 愛媛新聞社, 愛媛
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant.* **15** : 473-497.
- 日本林業技術協会 (1968) 原色日本林業樹木図鑑 第2巻. 265pp, 地球出版, 東京.
- 岡 成美 (1989) クワ. (木本植物の増殖と育種. 最新バイオテクノロジー全書編集委員会編, 269pp, 農業図書, 東京). 129-132.
- 岡村知帆・渡辺悦子・伊藤和貴・沖妙・橘 燦郎 (1993) イチイ科樹木の組織培養 (I) キャラボクの組織培養によるタキソールの生成. 第43回 日本木材学会大会研究発表要旨集 : **101**.
- Sasaki, Y., Shoyama, Y., Maruyama, T., and Oda, M. (1993) Effects of TG-19, a New Cytokinin, on Shoot and Secondary Somatic Embryo Propagation of *Quercus acutissima*. *J. Jpn. For. Soc.* **75** : 150-153.
- 佐藤亨 (1989) 組織・器官の培養法. (木本植物の増殖と育種. 最新バイオテクノロジー全書編集委員会編, 269pp, 農業図書, 東京). 33-39.
- 染郷正孝 (1985) ヤマグワ (有用広葉樹の知識. (財) 林業科学技術振興所, 514pp, (財) 林業科学技術振興所, 東京). 167-171.
- 高山真策 (1989) クローン増殖と人工種子. 190pp, オーム社, 東京
- 田中正臣 (1999) 前培養で添加されたベンジルアミノプリン (BAP) と光質が発根培養中のヒノキ (*Chamaecyparis obtusa*) に及ぼす影響. 奈良県林試研報 No29 : 36-40.
- 山と溪谷社 (2000a) 樹に咲く花 離弁花①. 719pp, 山と溪谷社, 東京
- 山と溪谷社 (2000b) 樹に咲く花 離弁花②. 719pp, 山と溪谷社, 東京
- 山と溪谷社 (2001) 樹に咲く花 合弁花・単子葉・裸子植物. 719pp, 山と溪谷社, 東京