

腋芽を用いた組織培養によるサンショウの増殖条件

山本茂弘・加藤徹

農林技術研究所森林・林業研究センター

In vitro plantlet regeneration from axillary buds of Japanese pepper saplings (*Zanthoxylum piperitum*)

Shigehiro Yamamoto¹⁾ and Toru Kato¹⁾

¹⁾Forestry and Forest Products Research Institute/Shizuoka Pref.Res.Inst.of Agri.and Forest

Abstract

There is a Japanese pepper (*Zanthoxylum piperitum*) that is one of the various mountain herbs in the Mt. Fuji region. It is thought that activation of the region could be attempted by selecting and using excellent individuals that have unique traits in the region. Then, two individuals with few thorns were selected in this region. In this study an efficient micro-propagation condition by tissue culture of axillary buds was examined for each individual. For shoots elongation, the most appropriate plant hormone was examined. For the rooting of the shoots, the sugar densities were examined. Moreover, an environmental acclimation was done, and the plantlets were able to be promoted outdoors. As a result, efficient propagation of two individuals became possible.

キーワード：サンショウ, 組織培養, 伸長, 発根, 順化

I 緒言

富士山地域に広がる森林には多種多様な山菜があるが十分活用されていない¹⁾。これらを活用することは富士山の魅力を高め、地域の森林・林業の活性化を図るための方策の一つになると考えられる。富士山地域における代表的な山菜のひとつにサンショウ (*Zanthoxylum piperitum*) がある。サンショウは北海道から九州、朝鮮半島の温帯から暖帯に生育する落葉低木であり²⁾、若葉や果実等を食用や香辛料、薬用に広く利用されている。日本各地に収量、香味、刺のない等に関し優れた形質を持つ多くの品種が栽培されている³⁾。富士山地域では「佃煮」といった特徴的な利用方法があるが材料は天然採取によっている⁴⁾。そのため佃煮等の加工特性や風味に優れた地域に特色のある品種系統の選抜・利用が有効と思われる。そうしたなか、2009年に富士山地域において「佃煮」に利用される葉の採取のし易い、刺のきわめて少ないと期待される2個体を選抜した。選抜個体の速やかなクローン苗木の普及を

図る必要がある。しかし、一般的には接ぎ木増殖が行われるが⁵⁾手間がかかり、挿し木発根性は中へやや難⁶⁾で必ずしも効率的な苗木生産ではない。一方、組織培養によるサンショウの増殖については、培地の植物ホルモンとして6-ベンジルアミン (BAP) を加え、糖質としてトレハロースを用いることにより不定芽の効率的な増殖の可能性が示されている⁷⁾。そこで本研究では、選抜した刺の少ないサンショウの効率的なクローン増殖のため、腋芽を用いた組織培養によるシュート伸長に適した植物ホルモンの種類、トレハロースの発根促進効果を検討するため、発根培地への添加濃度について検討した。また、幼植物体の順化を試みた。

II 材料及び方法

1 シュート伸長培地での植物ホルモンの検討

2009年4月下旬に静岡県駿東郡小山町に自生するサンショウの中から選抜したきわめて刺の少ない2個体 {A

個体, B 個体 (図 1), 共に高さ約 2m) の当年枝を採取し, 70%エタノールで 30 秒間, 1%次亜塩素酸ナトリウム溶液で 3 分間, 1.5%過酸化水素水で 3 分間表面殺菌した後, 腋芽を含む長さ約 10mm 程度の茎軸に切り分け外植体とした。これを, 樹木の組織培養で一般に用いられ⁹⁾, サンショウでも培養成績の良好な⁷⁾ Woody Plant Medium (WP 培地)³⁾ を用い, BAP を 0.5mg/L 添加した 0.8%の寒天培地に挿し付けて腋芽からシュートを伸長させた。これを約 2 ヶ月ごとに, 腋芽を含む長さ約 10mm 程度の茎軸に切り分け外植体とし, 再度同じ培地に差し付けて伸長させることを繰り返し, シュートを増殖させた。そして, 培養開始から 15 ヶ月後, 腋芽からのシュート伸長に適したサイトカイニンの種類を検討するため, WP 培地に BAP, ゼアチン, 2-イソペンテニルアデニン(2iP)をそれぞれ単独で 0.5mg/L 添加した培地及び BAP とジベレリン A₃ (GA₃)とを各 0.5mg/L 組合せて添加した培地の計 4 種類の培地を用いた。これらに腋芽を含む長さ約 10mm 程度の外植体を, 各個体から 20 本ずつ挿し付けた (表 1)。培養 68 日後に, シュート長及び外植体の葉脈 1 カ所から伸張した長さ 20mm 以上のシュート本数を計測した。



図 1 通常の刺のある個体(左)と刺の少ないB個体(右)

表 1 各伸長培地の植物ホルモンの種類と供試外植体本数

個体	植物ホルモン (各 0.5mg/L)			
	BAP	ゼアチン	2iP	BAP+GA ₃
A	20	20	20	20
B	20	20	20	20

2 発根培地のトレハロース濃度の検討

発根培地の糖として添加するトレハロースの濃度による発根性の差異を調べるため, WP 培地にインドール酪酸 (IBA) 0.5mg/L とナフタレン酢酸 (NAA) 0.02mg/L を添加し, トレハロースを 0, 5, 10, 20g/L の濃度で加えた

4 種類の発根培地を用いた。このとき, 発根培地の支持体には, これまで, ジブウカンバ¹⁰⁾, イタヤカエデ¹¹⁾, ナガボナツハゼ¹²⁾ といった複数の樹種で発根培地支持体として適していたバーミキュライトを用いた。供試したシュートは, BAP 0.5mg/L を添加した WP 培地で約 2 ヶ月ごとに継代し, 18 ヶ月間培養して増殖させた A 個体及び B 個体のシュート先端約 20mm を用い, 各バーミキュライト培地に 20 本ずつ挿し付けた。培養 20 日後から 90 日後まで 10 日間ごとに, 根が試験管のガラス面に達したものを発根したとみなし, 発根率を調べた。

培養には口径 25mm, 長さ 150mm のガラス試験管を用いた。培地は, 試験管に 10mL 注いだ後 121°C で 15 分間高圧蒸気滅菌した。なお, バーミキュライト培地では寒天を含まない培地液量 10mL を試験管内の 10mL のバーミキュライトに注いだ後同様に滅菌した。培地の pH は 5.8 に調整した。培養条件は, 約 5,000Lx, 16 時間日長, 室温 25°C とした。

3 幼植物体の順化

発根した幼植物体を, 発根培地挿し付け 147 日後の 2011 年 4 月上旬に試験管から取り出し, 水道水で根を軽く洗い流した。赤玉土, バーミキュライト及びピートモスを 3:1:1 の容積比で混合した用土を用い, 口径 60mm のビニールポットに移植した。このとき未発根のシュートや枯死したものは移植しなかった。次に, これを透明な蓋つきのプラスチック製の容器に入れて, 気温 25°C の空調された室内の約 5,000Lx, 16 時間日長下で, 7 日間密閉状態 (湿度や区 100%) に置いた後, 周囲の湿度を下げるため, さらに 7 日間蓋をずらした状態 (湿度約 70%) に置いた。その後, 約 80% 遮光した屋外の網室内に移し, ミストかん水による管理を行った。ポットに移植 90 日後の幼植物体の生存数を調べた。

III 結 果

1 シュート伸長培地での植物ホルモンの検討

培地に添加した植物ホルモンの種類によってシュート長に差が見られた (図 2)。培養開始から 68 日後の植物ホルモンの種類とシュート長を図 3 に, 20mm 以上のシュート数を図 4 に示す。シュート長は, A 個体では 12.9~26.0mm でゼアチン添加培地が最も大きく, B 個体では 6.1~34.0mm と, BAP と GA₃ との組合せ添加培地で最も大きかった (図 3)。しかし, Scheffe の多重比較検定の結果, シュート長について, A 個体ではゼアチン添加培地と有意差が見られたのは 2iP 添加培地のみで, 他の培

地とは差はなかった。B 個体では BAP と GA₃ との組合せ添加培地はゼアチン添加培地と 2iP 添加培地と有意差が見られたものの、BAP 添加培地とは差はなかった。1ヶ所の葉腋から伸長した 20mm 以上のシュート数も培地に添加した植物ホルモンの種類によって差が見られ、A 個体では 0.30~1.35 本となりゼアチン添加培地で最も多く、B 個体では 0.05~1.05 本となり BAP 添加培地で最も多かった (図 4)。Scheffe の多重比較検定の結果、A 個体ではゼアチン添加培地と 2iP 添加培地との間だけにシュート数に有意差が見られた。B 個体では BAP 添加培地は BAP と GA₃ との組合せ添加培地と差はないものの他の培地と比較して有意に多かった。

同様の培養条件で伸長させた通常の刺のある個体と刺の少ない B 個体のシュートの状態を図 5 に示す。培養シュートにおいても通常の刺のある個体では刺が多く、B 個体では刺はほとんど見られなかった。

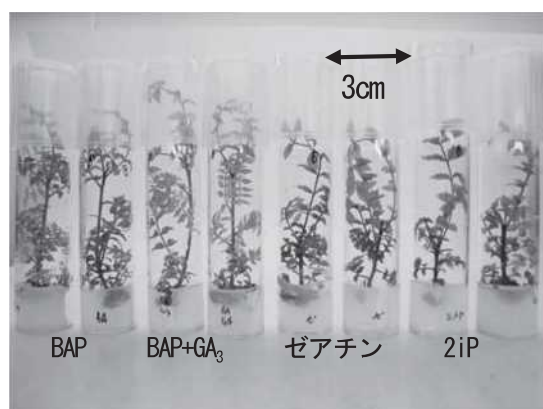


図 2 伸長培地の植物ホルモンと伸長状況 (B 個体)

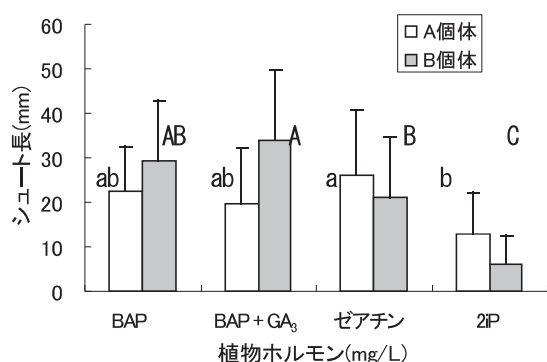


図 3 植物ホルモンと腋芽の伸長状況 (68 日後)

エラーバーは標準偏差を示す。異なる符号間には 5%水準で有意差あり (Scheffe の多重比較検定)。

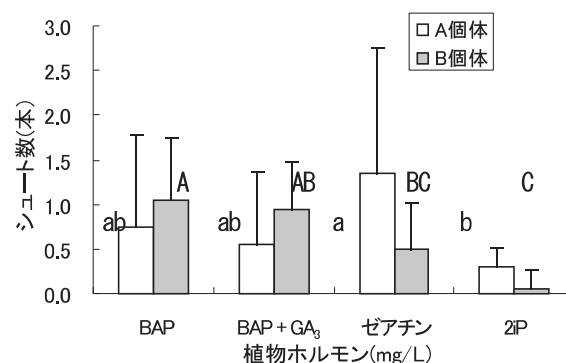


図 4 植物ホルモンと 20mm 以上のシュート数 (68 日後)
エラーバーは標準偏差を示す。異なる符号間には 5%水準で有意差あり (Scheffe の多重比較検定)。



図 5 通常の刺のある個体 (左) と刺の少ない B 個体 (右) のシュートの状態

2 発根培地のトレハロース濃度の検討

A 個体及び B 個体について、発根培地に添加したトレハロース濃度別に、挿し付け後 10 日間隔で調査した発根率の推移を図 6 及び図 7 に示す。A 個体ではトレハロース 5 g/L または 10g/L の濃度の培地では 30 日後の発根率が急速に高まりその後も緩やかに増加した。発根が収束したと思われる 90 日後には共に 80% の高い発根率となった。一方、トレハロースを含まない培地や 20g/L の高い濃度の培地では 90 日後それぞれ 20% と 40% と低い発根率であった (図 6)。B 個体では、トレハロース 20g/L の高濃度ではほとんど発根しなかったが、0~10g/L の濃度では 90 日後 80% 以上の高い発根率となり、10g/L の濃度では 100% の発根率であった (図 7)。

3 幼植物体の順化

ポット移植 90 日後の幼植物体の生存数を表 2 に示す。また、順化後の状態を図 8 に示す。A 個体では、トレハロース 10g/L の発根培地で発根した幼植

物体生存本数が最も多く、発根培地挿し付けシュート数の60%であった。B個体についても、トレハロース10g/Lの発根培地由来の幼植物体生存本数は挿し付け数の100%と最も高かったが、トレハロース0mg/L、5mg/Lの発根培地でも挿し付け数の80%以上の高い幼植物体生存本数であった。

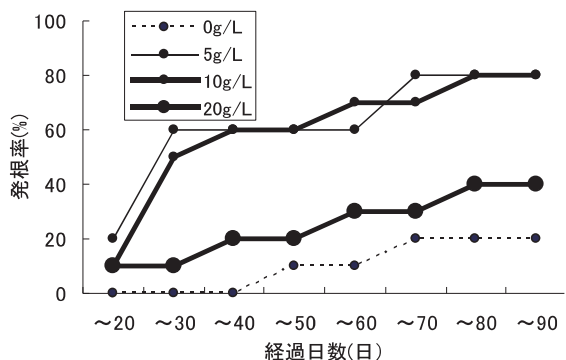


図6 発根培地のトレハロース濃度と発根率 (A個体)

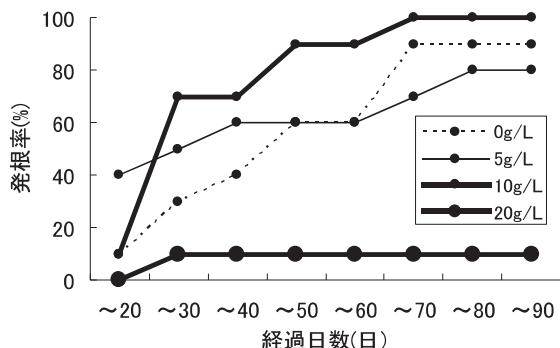


図7 発根培地のトレハロース濃度と発根率 (B個体)

表2 発根培地のトレハロース濃度と順化90日後の生存数

個体	トレハロース濃度 (g/L)	発根培地差付数 (本)	90日後の発根数 (本)	147日後の鉢上数 (本)	順化後の生存数 (本)
A	0	10	2	2	2
	5	10	8	7	5
	10	10	8	8	6
	20	10	4	2	0
B	0	10	9	9	9
	5	10	8	8	8
	10	10	10	10	10
	20	10	1	1	1

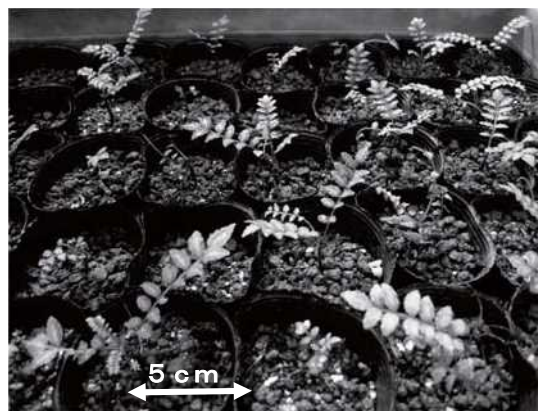


図8 順化後の幼植物体 (A, B個体, 鉢上90日後)

IV 考 察

サンショウ選抜個体の腋芽の組織培養による増殖を目的に、シュートの伸長に適した植物ホルモンの種類を調べたところ、A個体、B個体について、伸長培地の植物ホルモンの違いによる伸長量及び20mm以上のシュート数には有意差が見られ、個体によりシュート伸長に適する植物ホルモンの種類が異なることが認められた。伸長の良さ、シュート数については、A個体、B個体とも2iPは有意に劣り伸長には適さないことが分かった。シュートの伸長量やシュート数の多さから、伸長に適した植物ホルモンとして、A個体ではゼアチンが、B個体では、BAP単独またはBAPとGA₃との組み合わせが適していると考えられる。

また、刺の少ない個体では、培養した場合でもシュートに刺が少なく、遺伝的に刺の少ない性質であることが示唆された。

A個体、B個体のシュートの発根について、発根培地のトレハロースの濃度と発根性を検討したところ、どちらの個体も5g/Lまたは10g/Lの濃度で比較的早い時期に発根率が高まり、発根が収束したと思われる90日後の発根率が最も高く、この濃度で発根性が高まると考えられる。また、両個体とも20g/Lの濃度では発根は高まらなかった。ただし、トレハロース無添加培地の場合、B個体では高い発根率であったのに比べ、A個体では低い発根率となった。糖は発根の促進物質とされる²⁾が、糖濃度に対する発根特性には個体差がみられた。高濃度の糖での発根阻害については、シラカンバでも高濃度では発根率が低く、根の本数も少なくなることから、根の原基の形成が多少阻害されると考えられており³⁾、サンショウでも高濃度のトレハロースの添加により同様の発根阻害が起きたことが予想される。

幼植物体の順化は、室内で 2 週間程度、湿度を低下させた後、野外の網室等の栽培施設で、遮光条件下で灌水を十分行えば比較的容易に順化が行えると思われた。

伸長培地の植物ホルモンの種類、発根培地での糖濃度など、伸長やシュート数の増加、発根期間の短縮や発根率の向上等により増殖効率を高めるためには、上述のように適した条件に個体差のあることが推測されるため、今後選抜される可能性のある風味等品質の優良な個体についても、個体ごとの適正培地等培養条件の他、外植物体の採取時期や培養部位等の検討が必要と思われる。

富士山地域に特色のある優良品種系統の選抜、栽培化等による地域活性化の一助として本研究の成果が活用されることが期待される。

V 摘 要

富士山地域で選抜された刺の少ないサンショウ 2 個体 (A 個体, B 個体) の腋芽を用いた組織培養による増殖条件を検討した。腋芽の伸長に適した植物ホルモンの種類を調べた。個体ごとのシュートの発根に適した発根培地に添加するトレハロースの濃度を調べた。また、幼植物体の野外への順化を行った。その結果本試験の範囲内では次の結果が得られた。

- 1 シュートの伸長と本数の増加には、A 個体ではゼアチン、B 個体では BAP 単独または BAP と GA_3 との組合せが適していた。
- 2 発根培地のトレハロース濃度としては、A 個体、B 個体共に 5g/L または 10g/L で早期に発根し、発根率も高く、この濃度で発根性が高まる傾向が見られたが、高濃度では発根性が低かった。A 個体ではトレハロース無添加ではきわめて低い発根率であった。
- 3 幼植物体の順化は、湿度を低下させることにより 2 週間で容易に行えた。

引 用 文 献

- 1) 井出雄二(1987) : シラカンバの組織培養による個体大量増殖法に関する研究. 静岡県林研報 16, 56pp.
- 2) 北村二郎・村田源(1979) : 原色日本植物図鑑・木本編 II. 保育社, 大阪, 545pp.
- 3) Lloyd, G. and McCown, B. (1980) : Commercially feasible micropropagation of mountain laurel (*Kalmia latifolia*) by use of shoot tip culture. Proc. Inc. Proc. Int. Prant Prop. Soc. 30, 421~427.

- 4) 町田英夫(1975) : さし木のすべて. 誠文堂新光社, 東京, 261pp.
- 5) 森下義郎・大山浪雄(1972) : 造園木の手引き—さし木の理論と実際. 地球出版, 東京, 367pp.
- 6) 内藤一夫(2004) : 新特産シリーズ サンショウ—実・花・木ノ芽—の安定多収栽培と加工利用. 農文協, 東京, 190pp.
- 7) 中島美幸・坂井至道(2006) : 優良サンショウ苗の効率的な増殖法に関する研究—立ち枯れの原因究明と組織培養による増殖法の検討—. 中森研 No.54, 47-48.
- 8) 静岡県産業部振興局研究調整室編(2010) : 静岡県戦略課題研究「富士山」研究報告書 (概要版) . 23pp.
- 9) 竹内正幸・中島哲夫・古谷力編集(1984) : 植物組織培養の技術. 朝倉書店, 東京, 227pp.
- 10) 山本茂弘・山田晋也・片井秀幸・袴田哲司(2008) : 冬芽培養によるジゾウカンバ幼植物体の再生. 静岡県農技研報 1, 71-78.
- 11) 山本茂弘・山田晋也・片井秀幸・袴田哲司(2009) : 若い実生の冬芽培養によるイタヤカエデ幼植物体の再生. 静岡県農技研報 2, 81-86.
- 12) 山本茂弘・山田晋也・袴田哲司(2011) : 絶滅危惧種ナガボナツハゼの組織培養による増殖. 静岡県農技研報 4, 87-94.