

組織培養における桑苗生産

2. 養液培養における増殖効果と品種別生育反応

及川 直人・壽 正夫

近年、桑葉生産性の飛躍的な向上を図るため、多収性桑品種による桑園の密植あるいは多植化が推進され多収性優良桑苗の需要が増加している。しかし、従来の育苗方法では短期間に供給することは困難であり、短期間に大量の多収性優良桑苗を安定して生産できる育苗法の開発が望まれている。

そこで、組織培養を利用したクワの増殖法について検討しているが、寒天培地による培養技術としては、岡³⁾らによって冬芽・頂芽・腋芽を用いた分離芽による培養法がほぼ確立され、個体育成も行われている。また、著者ら¹⁾は試験管内で培養したクワの分離芽を馴化・露地移植して苗木の育成も行っている。

しかし、一般に、組織培養では寒天培地に比べ液体培地による培養は、培養物の生育が早いと言われており、クワにおいても養液培養が培養物の生育及び増殖の効率を高めることが考えられることから、液体培地による振盪培養の増殖効果とクワ品種別の生育反応について検討した。

また、上記の寒天培地による苗木育成では、増殖培地で培養したシュートを切り取り発根培地に植替し、培養シュートの継代培養では頂芽を置床する方法が一般的である。これらの場合残った腋芽は増殖にあまり役立っていない。そこで、この培養腋芽を有効に利用して増殖効率の向上を図るため培養腋芽の養液培養についても併せて検討した。

1. 試験方法

1) 試験 1. 養液培養の増殖効果

「ゆきしのぎ」の冬芽を既報²⁾の方法で初代培養し、得られたシュートの頂芽を継代培養して材料を育成した。

培地は、Murashige - Skoog (以下MS培地)の基本組成にベンジルアデニン(BA)とフラクトースを所定量添加した後pHを5.8に調整し、寒天0.8%を添加した寒天培地と寒天を加えない液体培地とした。培養容器は寒天培地が100 mlコニカルビーカー、液体培地は300 ml三角フラスコを用い、それぞれ20 ml、100 mlの培地を入れ、120°Cで15分間高圧滅菌した。

継代培養したシュートから頂芽を採取し、1容器当たりコニカルビーカーには3芽、三角フラスコには5芽を置床し、培養条件を温度は $27 \pm 1^\circ\text{C}$ 、照明は3,000 ~ 4,000 luxで12時間明12時間暗とし、養液培養では80~90回/分の水平振盪を行なった。調査は、培養40日目に実施した。

2) 試験 2. 養液培養におけるクワ品種別生育反応

1987年6月下旬に当场構内圃場から採取したあおばねずみ、改良岬返、一の瀬(以上カラヤマグワ系統)、しんけんもち、ゆきしのぎ、剣持(以上ヤマグワ系統)の新梢先端部を、中性洗剤で水洗し、70%エタノールに1~2秒間、10%次亜塩素酸ナトリウムの10倍希釈液に20分間浸漬した後、滅菌水で3回洗浄した。滅菌処理した新梢先端部から約1 mmの大きさで茎頂部を摘出し外植体とした。培養液はMS培地を基本に、BA 0.1mg/lとフラクトース3%を添加後、pHを5.6に調整して培養容器の試験管(直径24 mm、長さ150 mm)に20 mlと三角フラスコ(300 ml)に100 mlずつ分注し、120°Cで15分間高圧滅菌した。培養条件は試験1と同様であるが、振盪方法は

試験管が3.3回/分の回転振盪、三角フラスコは80～90回/分の水平振盪とした。調査は培養開始20日後に実施した。

3) 試験3. 培養クワ腋芽の植替え方法別増殖状況

試験1と同様に育成したシュートを8～9開葉時に図1のとおり発根培地への移植部位(2～3枚の展開葉付き先端部、以下同じ)を除き、残ったシュートを節間で切断して1芽及び3芽の腋芽付きシュートに調整し材料とした。

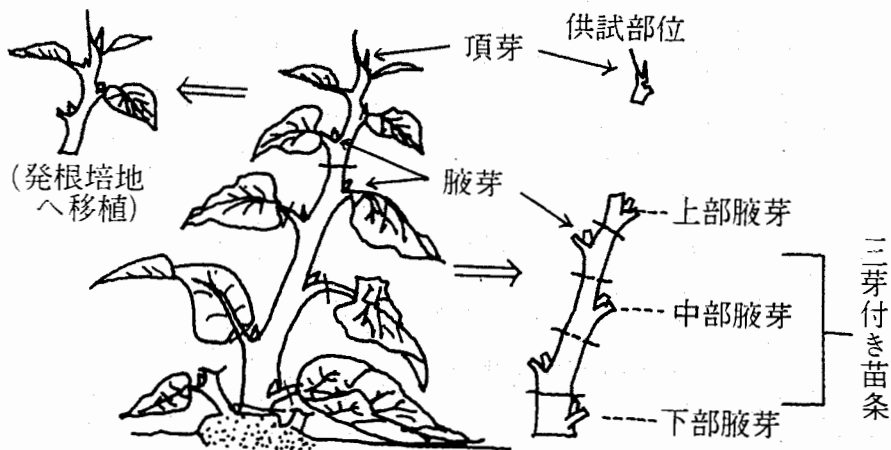


図1. 供試苗条の形態

培養液はMS培地にBA 0.05 mg、0.1 mg/l とフラクトース2%、3%を添加し、pH 5.6に調整した後試験2と同様に培養容器に分注し、高圧滅菌した。

培養条件は試験1・2と同様であるが、振盪方法は試験2と同様に回転振盪と水平振盪で行った。また、1容器当たりの培養腋芽数は試験管が2芽、三角フラスコは3芽とし、培養20～40日目に調査した。

2. 試験結果および考察

1) 試験1. 養液培養の増殖効果

一般に組織培養では寒天培地に比べ液体培地で培養物の生育が早いと言われている。そこで、クワにおける液体培地の培養効果を確認するために、寒天培地と液体培地で「ゆきしのぎ」の培養頂芽を培養したところ、表1に示す結果が得られた。すなわち、両培地とも外植片すべてにシュートが確認されたものの、シュートには生育差があり、本数では寒天培地が勝り、長さや展開葉数では液体培地が勝った。特に液体培地の伸長は良好で、それに伴い展開葉数も増加したが、節間も長く、シュート長の差に比べ展開葉数の差は小さかった。これらのシュートの先端から発根培地への移植部位(展開葉3枚)を除き、残った腋芽数(展開葉数)を外植片1個当たりで見ると、寒天培地に対し液体培地のBA 0.1 mg/l で160%であった。

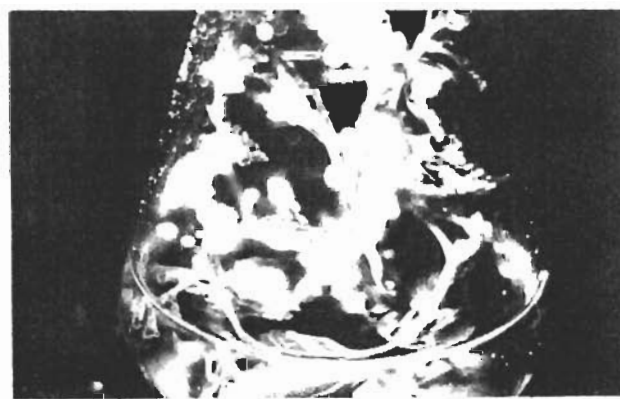
これらのことから、クワにおいても液体培地による振盪培養は寒天培地に比べ培養物の生育が早いことを追認するとともに、増殖効率も高いことを確認した。

表 1. 培地別クワ頂芽の発育状況

培		地	培養芽数 (芽)	シュート確認 された芽数 (芽)	シュートの状況 (平均)		
寒天 (%)	BA(mg/l)				果糖 (%)	本数 (本)	長さ (mm)
0.8	1.0	3	15	15 (100)	2.1 (100)	27 (100)	5.6 (100)
0.0 (液体)	0.05	2	15	15 (100)	1.0 (48)	67 (248)	6.6 (118)
	0.1	2	15	15 (100)	1.7 (81)	94 (348)	8.2 (146)
		3	15	15 (100)	1.7 (81)	110 (407)	8.2 (146)



寒天培地



液体培地

写真 1 培地別増殖状況

2) 試験 2. 養液培養におけるクワ品種別生育反応

寒天培地による培養では、クワ品種間に生育差異が認められており、²⁾ 液体培地においても品種による生育差が考えられる。そこで、養液培養におけるクワ品種別の生育状況について調査したところ、表 2 のとおりヤマグワ系統がカラヤマグワ系統に比べシュートの形成割合が高く、莖長および着葉数も勝る傾向が見られたが、同一品種の固体別生育差の大きいことも認められた。また、振盪方法別の生育状況は、回転振盪に比べ水平振盪の生育が速い傾向を示したが、クワ品種の系統別生育特徴は両振盪法とも同傾向であった。

なお、図 2 から培養期間を延長することによりシュートの形成割合が向上すると考えられる。

これらのことから、養液培養においても系統品種間に寒天培地による培養と同傾向の生育差異があることを確認した。

表 2. 振盪培養によるクワ頂芽培養

(培養期間20日)

振盪方法	桑品種	供試芽数(芽)	発育状況			シュート状況 (Aの平均)						
			A(芽)(%)	B(芽)	C(芽)	本数(本)	長さ(mm)	開葉数(枚)	分布 (%)			
									~5mm	~10mm	~20mm	~
回	あおばねずみ	16	4(25)	10	2	1.0	2.5	1.0	100	0	0	0
	改良嵐返	16	8(50)	8	0	1.0	9.0	2.6	25	38	37	0
	一ノ瀬	16	11(69)	5	0	1.0	5.9	2.0	82	9	9	0
転	しんけんもち	16	8(50)	4	4	1.0	9.2	2.6	38	25	25	12
	ゆきしのぎ	16	8(50)	8	0	1.0	8.2	3.0	50	25	13	12
	剣持	16	11(69)	5	0	1.0	11.9	2.3	27	27	18	28
水	あおばねずみ	10	8(80)	2	0	1.0	3.5	1.8	100	0	0	0
	改良嵐返	10	4(40)	3	3	1.0	16.3	4.6	25	25	0	50
	一ノ瀬	10	4(40)	4	2	1.0	2.0	1.0	100	0	0	0
平	しんけんもち	10	8(80)	2	0	1.0	10.8	2.0	50	25	0	25
	ゆきしのぎ	10	8(80)	2	0	1.0	3.5	1.5	75	25	0	0
	剣持	10	8(80)	2	0	1.0	13.0	2.8	13	37	25	25

発育状況：Aはシュートが確認された芽数、Bは葉の展開のみでシュートの伸長が見られない芽数、Cは殆ど発育の見られない芽数

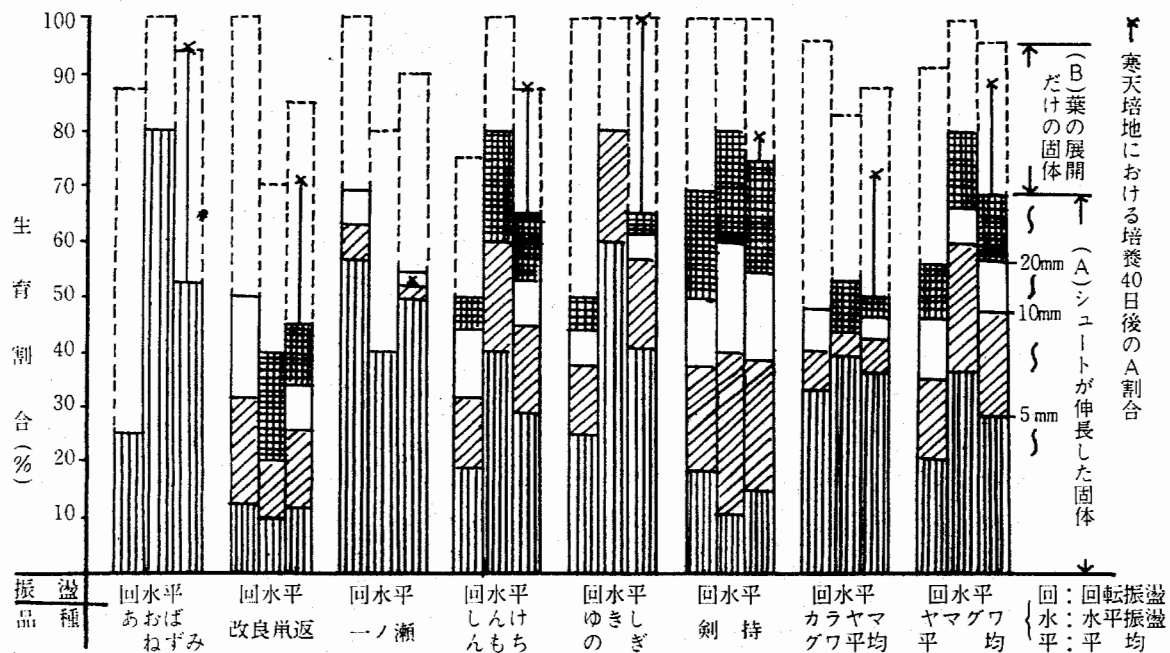


図 2. 振盪培養による頂芽培養の生育状況

3) 試験3. 培養クワ腋芽の植替え方法別増殖状況

培養シュートの効果的な増殖を図るため、発根培地への移植部位を除いた腋芽の有効利用を考え図1のように腋芽を1芽付きシュート（以下1芽付き）と3芽付きシュート（以下3芽付き）に調整して振盪培養したところ、表3のとおり1芽付きは着生部位による生育差は小さいが、各部位とも3芽付きに比べ生育状況、シュートの状況とも劣った。また、3芽付きの増殖は頂芽の増殖に比べシュートの長さでは劣ったが、本数・展開葉数では大差なく、培養1芽当たりの着芽数で比較すると、3芽付きに対し頂芽108%であった。

表3. 養液培養における部位別苗条の増殖状況

(培養期間：22日)

苗 条		培養芽数(芽)	生育状況(芽)			シュート状況(平均)		
			A	B	C	本数(本)	長さ(mm)	開葉数(枚)
腋芽 3芽付		30	30	0	0	1.0 (100)	15.7 (100)	2.5 (100)
腋芽 1芽付	上部位	20	12	4	4	0.6 (60)	13.8 (88)	2.3 (92)
	中 "	20	14	3	3	0.7 (70)	11.2 (71)	2.2 (88)
	下 "	20	11	4	5	0.6 (60)	12.9 (82)	2.3 (92)
		20	12.3	3.7	4.0	0.6 (60)	12.6 (80)	2.3 (92)
頂芽 付		20	20	0	0	1.0 (100)	19.2 (122)	2.7 (108)

BA及びフラクトースの添加量の異なる液体培地で1芽付きと3芽付きを振盪培養した結果、表4のとおりBAでは0.05 mg/l に比べ0.1 mg/l の生育が良く、フラクトースはBAが0.05 mg/l で2%が、0.1 mg/l では3%が良い傾向を示した。また、培養腋芽の形態別ではいずれの培地でも1芽付きに比べ3芽付きが勝った。総合的にはBA 0.1 mg/l、フラクトース3%、3芽付きが最も良好な増殖状況を示した。

表4. 養液培養におけるクワ腋芽の培地別・植替方法別増殖状況

(培養期間：40日)

BA mg/l	果糖 (%)	培養 苗条	培養 芽数 (芽)	シュート 確認芽数 (芽)	シュート状況(平均)		
					本数(本)	長さ(mm)	開葉数(枚)
0.05	2	1芽付	15	15	1.0 (100)	55 (100)	6.8 (100)
		3	15	15	1.0 (100)	73 (133)	7.3 (107)
	3	1芽付	15	12	0.8 (100)	53 (100)	6.8 (100)
		3 "	15	15	1.0 (125)	55 (104)	7.0 (103)
0.1	2	1芽付	15	11	0.7 (100)	35 (100)	4.0 (100)
		3 "	15	15	1.0 (143)	128 (366)	9.3 (233)
	3	1芽付	15	15	1.0 (100)	60 (100)	6.0 (100)
		3 "	15	15	1.0 (100)	120 (200)	9.7 (162)



1 芽付腋芽の回転振盪



3 芽付腋芽の回転振盪



1 芽付腋芽の水平振盪



3 芽付腋芽の水平振盪

写真2. 養液培養における培養腋芽の増殖状況

摘 要

養液培養におけるクワの増殖効率とクワ品種別の生育反応をみるために、液体培地による振盪培養を試みた。

その結果、クワにおいても液体培地による振盪培養は寒天培地に比べ培養物の生育が早く、増殖効率の高いことが確認され、その生育状況にはクワ系統別品種間に寒天培地による培養と同傾向の生育差異が認められた。

また、増殖用培地で培養したシュートの継代および発根培地へ植替えする場合の残った腋芽を利用して増殖の効率化を図るために、この培養腋芽を液体培地で培養したところ、総ての腋芽が有効に利用できる、液体培地での複数腋芽付きシュートの振盪培養は、生育が早く効率の良い増殖方法であることが確認された。

文 献

- 1) 壽 正夫・高木武人・及川直人(1985)：東北蚕糸研究報告、10、33
- 2) 及川直人・榎本末夫・大山勝夫(1985)：東北蚕糸研究報告、10、31
- 3) 岡 成美(1985)：蚕試報、29、47 - 852