

タカハラサンショウ組織培養苗木の増殖研究

中島美幸*・上辻久敏・坂井至通

Tissue culture investigation of the Takaharasanshou plant for seedling of cultivated Japanese pepper (*Zanthoxylum piperitum* DC.)

Miyuki NAKASHIMA, Hisatosi KAMITSUJI and Yoshimichi SAKAI

岐阜県高山市の高原川流域は、古くから「今見山椒」の産地としてサンショウ栽培が盛んであった。現在、サンショウの栽培品種は朝倉山椒（アサクラザンショウ）、葡萄山椒（ブドウザンショウ）が広く知られているが、岐阜県産のサンショウは、高原山椒（タカハラサンショウ）として栽培されるようになった。最近、タカハラサンショウ成木や接ぎ木苗の立ち枯れが発生して深刻な苗木不足に陥り、優良苗木の大量生産技術確立が要望されていた。

このため、組織培養法を検討した結果、炭素源としてトレハロースを用いたWP培地にベンジルアミノプリン(BAP)を添加することでシュート増殖に成功し、また、新規発根剤4-Cl-IAAによる浸漬処理で良好な発根を示した。3種の発根剤について培地への直接添加と浸漬処理を比較したところ、処理方法の違いにより発根率を高める効果やその有効濃度が異なることが分かった。培養容器内で成長した幼植体（苗木）を移植するとき、発根部分に付着する寒天やゲランガムが細菌繁殖の場となるため除去する必要がある。しかし、流水などで寒天やゲランガムを除去する場合、細根・毛根も切り除いてしまうため、継代培養物を発根剤（1ppm IBA）添加しフロリアイトを支持体としたWP培地で培養した。これにより移植可能なサンショウ苗木の量産化が可能となった。

キーワード：タカハラサンショウ、組織培養、クローン苗木、発根剤

I はじめに

サンショウ (*Zanthoxylum piperitum* DC) はミカン科サンショウ属の落葉低木（約3m）で、葉柄の基部に1対の刺があり、果実は、食用、香辛料のほか生薬原料として利用される。雌雄異株で、春、黄緑色の花を咲かせた後に雌株のみ実をつける。古くから刺のない「朝倉山椒（アサクラザンショウ, *Z. piperitum* f. *inermis*）」が優良品種として京都府、兵庫県等で栽培され（大沢, 1986）、近年は房状に大実をつける「葡萄山椒（ブドウザンショウ）」（佐々木, 1971；伊沢, 1972）が和歌山県などで栽培されるようになった。サンショウ栽培における品種・系統種の多くは、アサクラザンショウを基本に改良されてきた（内藤, 1986）。一方、岐阜県奥飛騨地域に流れる高原川流域で栽培されてきたサンショウは、「今見山椒」（津野, 1783；長谷川, 1829；富田, 1873）として歴史も古く、郷土の気候風土が育んだ「飛騨・美濃伝統野菜」として、平成17年に「高原山椒（タカハラサンショウ）」と認証された。

タカハラサンショウは、他の栽培品種に比べ、実が小ぶりで深い緑色をし、大変香りが良く、かつ長期保存が可能なることから調味料や香辛料の原料として出荷される。岐阜県飛騨地域のサンショウ栽培は、およその栽培面積22.5ha、生産者戸数380戸で、香辛料業者との契約栽培が中心で年間20t近く生産されている。

近年、タカハラサンショウ成木や接ぎ木苗に凍害の影響で立ち枯れが発生し、深刻な苗木不足となっている（中島・坂井, 2007）。これまで立ち枯れの対策として、接ぎ木苗の台木にヤマザンショウ（松浦ら, 1999）、カラスザンショウおよびフユザンショウ（前田ら, 2005）などを用いて苗木生産の改良が重ねられ、タカハラサンショウにおいても検討が進められている。しかし、接ぎ木法は採穂数の確保、熟練した技術や経験が求められ、苗木大量生産法としては限界があった。そのため、優良苗木の効率的な大量生産法としてサンショウ苗木の生産技術の確立が求められ、組織培養によるクローン増殖を検討した。

植物個体のクローン増殖法は既に多くの成書（福井・山田, 1985；最新バイオテクノロジー全書編集

* 現所属：岐阜県可茂農林事務所

員会, 1989) にまとめられているが, サンショウでは培地の褐変化, カルスのガラス化などが発生し, 容易に増殖できなかつた。これまでに炭素源としてトレハロースを用いたWP培地にベンジルアミノプリン(BAP)を添加することでシュート増殖に成功した(中島・坂井, 2006, 2008)が, 継代培養物の発根及び移植に適した支持体の選別(茂木・坂井, 2004, 2005)などの問題点が残されていた。今回, 継代培養物に新規発根剤(片山・景山, 2000)を用いた発根促進, 移植に適した支持体の利用を検討し, タカハラサンショウ苗木の大量生産を可能としたので報告する。

II 方法

1. 材料

平成17年6月に, 岐阜県高山市奥飛騨温泉郷で栽培されているタカハラサンショウ成木の当年枝(2006年)から採取した腋芽を用いた。切り口を濡れた紙で包み, さらにアルミホイルを巻き保冷庫に入れて搬入した。

2. 試薬および機器

(1) 試薬及び試料溶液の調製

殺菌剤は, 70%エタノール及び次亜塩素酸ナトリウムを用いた。植物ホルモン剤として, 多芽体誘導には, ベンジルアミノプリン(BAP: Wako製)とジベレリン(GA₃: Wako製)を, 発根には, インドール酪酸(IBA: Wako製), 4-Chloroindole-3-acetic acid (4-Cl-IAA: (株)東海化成製) および, 5,6-Dichloroindole-3-acetic acid (5,6-Cl₂-IAA: (株)東海化成製)をそれぞれ使用した。植物ホルモン溶液は, 各試薬を水に溶解して, IBA (0.0, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0ppm), BAP (0.0, 0.2ppm) とGA₃ (0.0, 0.5, 1.0 ppm)をそれぞれ調製した。培地の支持体には0.2%ゲランガム(Wako製)を使用した。

(2) WP培地及びホルモン添加培地の調製

WP基本培地に0.2%ジェランガムを添加した培地に2%炭素源とホルモン溶液を添加した。炭素源種はトレハロース, スクロースを使用した。植物ホルモン溶液はBAP (0.0, 0.2ppm), GA₃ (0.0, 0.5, 5.0ppm)を添加した。

(3) 育苗条件

育苗室の条件を培養温度22°C, 照度4000lux, 16時間日長として培養した。

3. クローン苗木培養方法

(1) 外植体の殺菌処理

採取した枝から腋芽毎に外植体を切り取り, 70%エタノール1分間処理後, 1%次亜塩素酸ナトリウム溶液で6分間浸漬して殺菌処理を行った。

(2) シュート増殖法

脇芽から切り出した幼芽は, WP培地を基本培地としBAP (0.0, 0.2ppm) とGA₃ (0.0, 0.5, 1.0ppm) の2種類の植物ホルモンと2% スクロースまたは2% トレハロースを糖質とし2%ゲランガムを添加したWP培地上に外植体を置床した。初代培養を48日間行ったのちの生育状態を観察した。2代培養では, 初代培養で得られた状態の良いシュートをBAP 0.2ppm, 0.2%ゲランガム, スクロースまたはトレハロースを2%添加した2種類のWP培地で30日間培養して生育状態を観察し, 初代培養とも併せてサンショウのクローン増殖について検討した。

(3) 発根法

発根試験には, ホルモン0.2ppm BAP, 炭素源2%トレハロースを添加したWP培地にて培養(22°C, 照度4000lux, 16時間日長)し, 不定芽を形成した増殖物を同条件の培地において, 継代培養した個体を用いて発根剤と発根についての条件検討は, 2%トレハロースを糖質としたWP培地に, IBA (0.0, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0ppm)をホルモン条件とし, それぞれの処理区について10本ずつ発根培養を行った。

(4) 支持体の選択

サンショウ組織培養物の順化に適する支持体を検討するために, 固形状支持体であるフロリアライト(サンエイ製)を用いた場合におけるサンショウ組織培養物の生育への影響を調査した。培養は200ml容培養ビンあたり縦2.5cm×横5cm×高さ2cmの大きさにカットしたフロリアライトに培養液を20ml添加して試験した。シュート長と生存率は120日目に測定した。比較対照としてゲル状支持体であるゲランガムを用いた。

(5) 測定と選別

増殖に関するホルモンと糖の影響に関する試験では, 初代培養48日, 二代培養30日目に生存数, 不定芽形成数およびシュート伸長量を測定した。発根剤種の効果に関しては, 培養開始後80日目に, シュート伸長量, 発根率を測定した。生存数, 不定芽形成数, シュート伸長量で最適条件を選別した。

Ⅲ 結果および考察

1. シュート増殖の検討

サンショウ腋芽を用いた組織培養における培地の条件を検討した結果を図-1に示した。初代培養では、BAP 0.2ppm, 2%トレハロースを加えたWP培地において、5.2倍の増殖率を示した。また、2代培養でも、同一の培地で多芽体の形成が見られたことから、サンショウ増殖培養には、BAP 0.2ppm, 2%トレハロースを加えたWP培地を用いて継代し、個体数を増殖した。

2. 発根剤の検討

サンショウ組織培養における発根剤の種類と添加方法の影響を検討するためにIBAと4-Cl-IAAおよび5,6-Cl₂-IAAの3種の発根剤を培地に添加した場合の組織内容物の生存率と発根についての結果を図-2に示した。IBA 0.5ppmおよび1.0ppm処理区において、培養40日目でそれぞれ20%、40%の発根率が得られ、120日目には70%となった。このことから、サンショウ組織培養における発根条件としては、WP培地にIBAを0.5~1.0ppm用いるのがよいと考えられた(中島ら, 2006)。培地へ発根剤を添加した試験では、IBAを添加した条件においてすべての添加濃度(1~20ppm)で発根が認められた(図-2)。特に1~5ppmのIBAの添加濃度において発根率が100%であった。一方、培地へ発根剤を添加せず、培地へ挿し付け前に組織培養物を発根剤溶液に浸漬処理した試験区では、5~10ppmの4-Cl-IAA溶液に浸漬処理した条件で100%の発根率であった(図-3)。4-Cl-IAAおよび5,6-Cl₂-IAAとの比較では(図-3)、4-Cl-IAAによる浸漬処理が良好な発根を示した。発根剤の種類と処理方法により発根への影響が異なることが観察された。

ゲランガムを用いた組織培養条件では、120日目までに枯死個体は発生せず、IBA濃度依存的に発根率が上昇する傾向が認められた。ホルモン濃度2ppm以上では、発根率は高いが組織培養物が褐変化し、組織培養物の生育には不適と考えられた。3種の発根剤について培地への直接添加と浸漬処理を比較したところ、処理方法の違いにより発根率を高める効果やその有効濃度が異なることが分かった。この培養容器内で成長した幼植体(苗木)を苗畑などの室外で移植栽培するときには、発根部分に付着する寒天やゲランガムが土壌細菌の発育要因となるため除去する必要がある(茂木・坂井, 2005)。

3. 支持体の検討

移植用苗木を生産するためには、順化、鉢揚げが必要である。これまで培地上での幼植体は、支持体としてゲランガムを使用し増殖条件を検討したが、ゲル状支持体として用いた培養では移植用に使用できないため、ゲランガム培地で発根した幼植体を取り出し、フロリアライトなど幼根を強く支持する育成用の培地に再移植する必要がある。また、移植に伴う幼根の損傷を回避することは困難なため、発根した組織培養物の根を損傷させずに順化を行うためにフロリアライトなど固形の支持体を用いた組織培養物の育成が考えられる。支持体への発根剤添加はゲランガム培地での有効濃度と異なる可能性がある。そこでゲランガム培地に添加して効果を示したIBAを直接フロリアライトに添加した場合と同様の効果を得ることができるのか検討した。固形状支持体であるフロリアライトを用いた条件下でサンショウ組織培養物の発根を促すIBA添加による生存率への影響を比較し、その結果、ゲランガムを支持体として用いた条件よりも、固形状支持体フロリアライトを用いた培養条件では、IBAを添加した

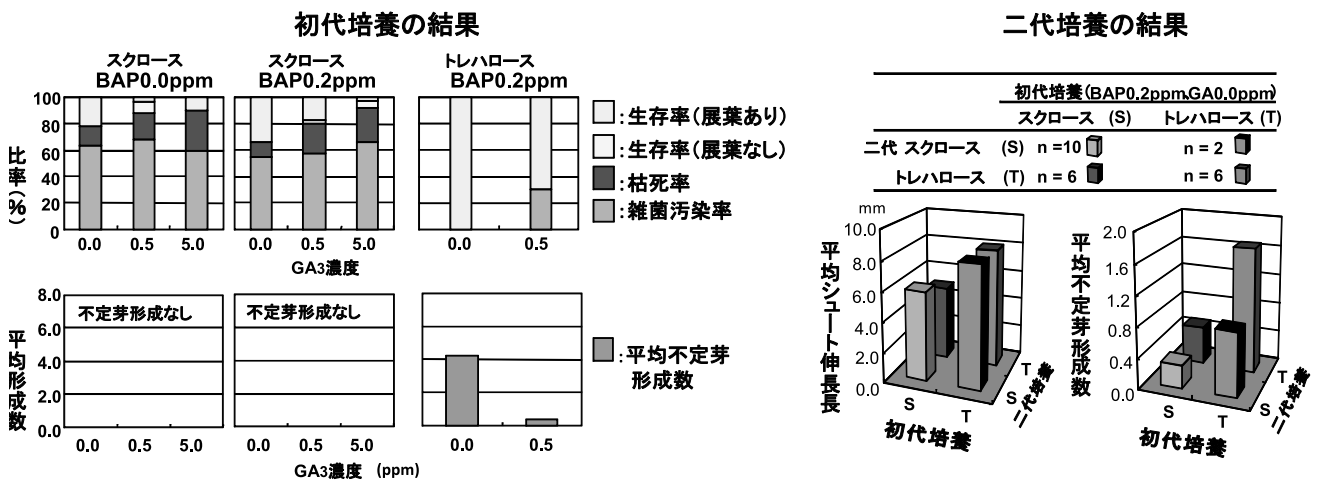


図-1 組織培養における多芽体の形成条件

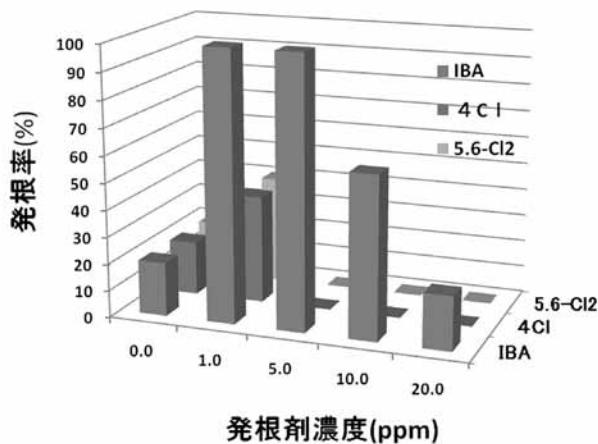


図-2 組織培養物の発根における発根剤培地添加の影響

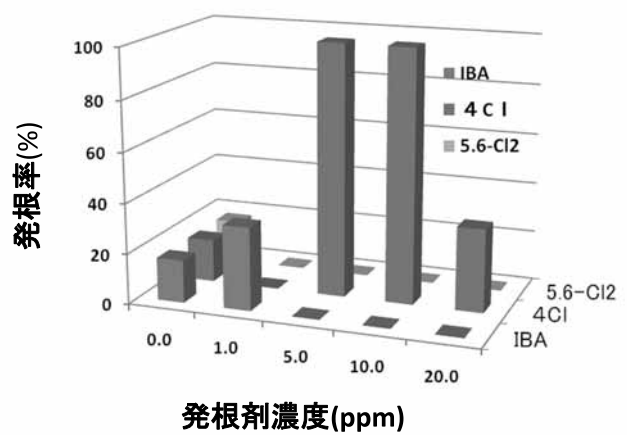


図-3 組織培養物の発根における発根剤浸漬処理の影響

IBA添加による影響



無添加 1ppm添加
支持体:フロリアライト

図-4 移植可能なクローン苗木

培養物で枯死が認められた。ゲル状支持体ゲランガムを用いた場合、120日目の組織培養物の生存率は100%である。支持体としてフロリアライトを用いた条件においては、IBA無添加条件では、ゲランガムを用いた場合と同じく生存率100%であった。しかし、フロリアライトを用いた培養物にIBA添加するとゲランガムを用いた場合と異なり、生存率が低下する傾向を示した。1ppm IBA を添加した条件では、生存率92%であり、IBA無添加条件に近い生存率を示し、移植可能な優良クローン苗木(図-4)を得た。

IV まとめ

最近、タカハラサンショウ成木や接ぎ木苗の立ち枯れが発生し、深刻な苗木不足となり優良個体のクローン増殖技術の確立が望まれていた。木本植物の組織培

養成功例を基本とし、サンショウの増殖条件を検討した結果、炭素源としてトレハロースを用いたWP培地にBAPを添加することでシュート増殖に成功した。さらに、新規発根剤4-Cl-IAAによる浸漬処理が良好な発根を示した。発根剤(1ppm IBA)を添加したフロリアライト支持体で継代培養物の培養も成功し、移植可能なサンショウ苗木の量産化が可能となった。

謝辞

本研究において新規発根剤(4-Chloroindole-3-acetic acidおよび5,6-Dichloroindole-3-acetic acid)を提供していただきました株式会社東海グローバルグリーンニング景山英治社長に深謝致します。

引用文献

- 福井三郎・山田康之(1985)植物培養細胞の変異と選抜. 講談社サイエンティフィク.
- 長谷川忠崇著(1829)・岡村利平解説(1909)飛州志, 魚果物菜穀こう地名類一今見山椒一. 岐阜県郷土資料刊行会, 57pp.
- 伊沢凡人編(1972)庭先に植える薬草・薬木の作り方・使い方. pp167-168, 家の光協会.
- 片山政人・景山英治(2000)特開2001-233713および2001-233714, 植物発根誘導剤とその処理方法.
- 前田隆昭・米本仁巳・萩原進(2005)台木の違いがブドウサンショウの枯死率と生長に及ぼす影響. 園学研4(2): 203-206.
- 松浦克彦(1999)カラスザンショウおよびフユザンショウ: ひょうご農技102.

- 茂木靖和・坂井至通(2004)組織培養によるハナノキのクローン増殖. 岐阜県森林研研報33, 19-22.
- 茂木靖和・坂井至通(2005)組織培養によるハナノキのクローン増殖(II)ー培養容器と糖濃度の違いによる発根の検討ー. 岐阜県森林研研報34, 27-32.
- 内藤一夫(1986)農文協特産シリーズ53, サンショウー実・花・木ノ芽栽培ー. pp30-38, 農山漁村文化協会.
- 中島美幸・坂井至通(2006)優良サンショウ苗の効率的な増殖方法に関する研究ー立ち枯れの原因究明と組織培養による増殖法の検討ー. 中森研54: 47-48.
- 中島美幸・坂井至通(2007)優良サンショウ苗の効率的な増殖方法に関する研究ーサンショウの耐凍性についてー. 中森研55: 13-14.
- 中島美幸・上辻久敏・坂井至通(2008)タカハラサンショウの挿し木・組織培養における発根剤の影響. 園学研7別1, 08[P果樹]: 317.
- 最新バイオテクノロジー全書編集委員会編(1989)木本植物の増殖と育種. 農業図書
- 佐々木一郎(1971)アサクラザンショウ, ブドウザンショウの栽培と利用. 植物研究雑誌46(5): 160-164.
- 富田礼彦(1873)斐太後風土記(卷之十五吉城郡高原郷今見村, 蘆田伊人編(2002)大日本地誌大系第二卷(2002), 斐太後風土記, 雄山閣, p97.
- 津野滄洲(1783)産物狂歌詠, 特産物ー今見山椒ー. 上宝村史刊行委員会, 305pp.
- 大沢章(1986)山菜栽培全科, 有望53種. pp148-159, 農山漁村文化協会.

