

ギフチョウの食草カンアオイに関する研究 (Ⅳ) —組織培養によるヒメカンアオイの増殖について—

太田 和子

家政学部健康栄養学科

(2008年11月5日受理)

Studies on some Diet Plants in *Heterotropa* for *Luehdorfia japonica* (Ⅳ). —Propagation of *Heterotropa takaoi* by Tissue Culture—

Department of Health and Nutrition, Faculty of Home Economics,
Gifu Women's University, 80 Taromaru, Gifu, Japan (〒501-2592)

OTA Kazuko

(Received November 5, 2008)

緒言

ギフチョウ (*Luehdorfia japonica*) はアゲハチョウ科に属し、秋田以西の本州に広く分布する日本固有種の蝶である。岐阜県で最初に発見されたのでこの名がある。幼虫はカンアオイ類の植物を食草とし、各地域によって選択性に違いがみられる。カンアオイの仲間は、ウマノスズクサ科の多年生草本で、一属 (*Asarum*) に分類することが多い¹⁾が、前川²⁾は5属に分類している。温帯・暖帯に約100種が知られていて、日本には約50種が自生している。

カンアオイ類は里山に生育し、近年の里山の開発や乱獲により自生地が激減しつつある。そこでギフチョウの絶滅も懸念され、環境省のレッドデータリストではギフチョウは絶滅危惧Ⅱ類に挙げられている³⁾。カンアオイ類は非常に生長速度の遅い植物で、増殖は株分けや実生で行われているが増殖率は低い。そこで、ギフチョウの保護を目的に、組織培養を用いてカンアオイを大量に増殖する

方法を検討した。Ⅱ報⁴⁾では、予備実験としてギフチョウ幼虫があまり好まないオナガカンアオイを用いたが、今回は岐阜市近辺のギフチョウの主な食草であるヒメカンアオイを材料に増殖を検討した。

材料および方法

1. 材料および培養の概要

材料として岐阜県各務原市に自生のものおよび本学飼育室内で鉢栽培しているヒメカンアオイ (*Heterotropa takaoi* F. Maekawa) (図1) の茎頂部と種子を主に用いた。



図1 ヒメカンアオイ

図2に示すように茎頂培養または無菌播種により無菌的に培養したヒメカンアオイ株をNAAとBAの組合せ実験と糖の有無の実験に用いた。また、無菌株の根片を用いて、カルスを形成させ、再び芽と根を再分化させて増殖させる実験も行った。そして、最終的には、培養器より出して鉢に植え付け順化を行うが、順化実験については次回に報告する予定である。

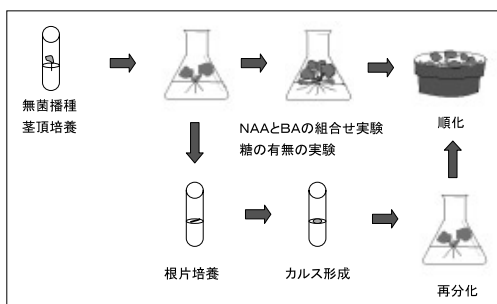


図2 組織培養の概要

2. 茎頂培養および無菌播種

茎頂培養は1992年～1996年に毎年植え付けを行った。ヒメカンアオイの芽の部分を取り取って採取し、エタノールおよび次亜塩素酸ナトリウム溶液（有効塩素2～5%）で15～30分の殺菌を行った。2～3%ショ糖、8%寒天を加えたMS（ムラシゲ・スクーグ）培地を基本に用いて培養を行った。生長調節物質としては、ナフタレン酢酸（NAA）、ベンジルアデニン（BA）、を0～100 μ M加えた。培養は、温度20 $^{\circ}$ C、日長8時間、照度2000ルクスの人工気象器内で行った。

無菌播種は1992年、1995年、1996年、1998年に行った。ヒメカンアオイの種子は硬く、汚染率も高いので、1995年にナイフと海砂による磨傷処理とアルコールと濃硫酸による薬品処理の試験を行った。培地は茎頂培養と同様でホルモンフリーで行った。

また、培地に加えた生長調節物質の影響に

についても試験し、1995年は予備的にBA1 μ MとジベレリンA₃（GA₃）1 μ Mを組み合わせた4種の培地で無菌播種を行った。1996年には、GA₃1 μ Mを培地に加え、BA1 μ Mを加えたものと加えないもので、温度の影響も試験した。ヒメカンアオイ種子はナイフで磨傷処理したものをを用いた。培養条件は、茎頂培養と同様に行った。

3. 株の増殖実験

茎頂培養や無菌播種で無菌的に得られた株を2%ショ糖、8%寒天を加えたMS培地で培養し、大きくなった株を葉4～5枚に切り分け、根は取り除き、ホルモンフリー培地で2ヶ月間予備培養を行った。その後BAとNAAの濃度を組み合わせた16区に移植した。移植後1ヶ月と2ヶ月に観察を行い、そのつどそれぞれ同じ培地に植え替えた。培養は、温度25 $^{\circ}$ C、日長8時間、照度2000ルクスの人工気象器内で行った。

4. 根片培養

培養器内で生育した株より無菌的に根を取り出して切り、根片培養を行った。1996年に91根片をNAA100 μ MとBA100 μ Mを加えた培地に置床した。

1996年～97年にNAAとBAの各濃度を組み合わせた9通りの培地で根片の培養を行った。

1998年にはオーキシンとしてNAA、インドリル酪酸（IBA）、2,4-ジクロロフェノキシ酢酸（2,4-D）を、サイトカイニンとしてBA、カイネチン（KIN）を用い、各100 μ Mの濃度で組み合わせた6区で試験を行った。

結果および考察

1. 茎頂培養および無菌播種

茎頂培養では置床後1～2ヶ月の初期の活

染率が高く、平均で73%となり、約1年後の生存率は4.7%と低かった(表1)。

カンアオイ類は、芽の位置が低く土壤汚染されやすいので、汚染率が高くなったと考えられる。また、茎頂部も小さくカットせずに用いたので、より初期汚染率が高くなったと考えられる。

表1 茎頂培養の生存率

年度	置床数	初期の枯死・汚染率 (%)	約1年後生存率 (%)
1992	67	41.8	1.5
1993	104	85.6	7.7
1994	21	100.0	0.0
1995	98	57.1	3.1
1996	50	81.1	11.0
平均		73.1	4.7

1995年に行った無菌発芽におよぼす種子処理の影響を調べた実験では、播種1年後、ナイフで傷を付けたもので発芽率が高く、その後の伸長が見られた割合も26%と他の処理区よりも高くなった(表2)。濃硫酸では、汚染率は低かったが、まったく発芽が見られなかった。

表2 カンアオイの無菌発芽に及ぼす種子処理の影響

1995年10月19日～96年10月1日の経過

区	置床数	発芽率 (%)	伸長のみられたもの (%)	汚染率 (%)
磨傷処理	41	5	5	98
	39	36	26	95
薬品処理	35	3	3	89
	43	0	0	35

1995年に生長調節物質の影響を予備的に調べた実験では、GA₃の含まれた培地で発芽率が高くなった(表3)。また、葉の展開率は、BA1μM+GA₃1μMで高くなった。しかし、

葉が展開した後にすべて汚染されてしまった。

1996年は発芽率、葉の展開率ともにBAなし+GA₃1μM区で高くなり、20℃と25℃での温度の影響は見られなかった(表4)。

1998年に10℃、20℃、30℃の温度の影響を調べたところ、10℃で他区より早く発芽がみられた。カンアオイ類は、無菌播種後発芽までに非常に日数がかかり、発芽後にもなかなか葉の展開が見られないが、播種前の低温処理により発芽を早められる可能性も考えられる。

表3 カンアオイの無菌発芽に及ぼす生長調整物質の影響

1995年6月30日～96年10月1日の経過

区		置床数	発芽率 (%)	葉の展開した率 (%)	汚染率 (%)
BA(μM)	GA ₃ (μM)				
1	0	10	10	10	80
0	1	9	45	11	78
1	1	8	38	25	100
0	0	44	9	5	95

表4 カンアオイの無菌発芽に及ぼす生長調整物質および温度の影響

1996年7月17日～97年7月7日の経過

温度	区		置床数	発芽率 (%)	葉の展開した率 (%)	汚染率 (%)
	BA(μM)	GA ₃ (μM)				
20	0	1	48	6.3	4.2	85
20	1	1	50	4.0	0.0	76
25	0	1	78	6.4	2.6	65
25	1	1	71	0.0	0.0	63

2. 株の増殖

株を切り分け16区の培地に植え付けて、増殖に及ぼすNAAとBAの影響について検討した。葉数増加率とシュート増加率はBA10～100μMの区で高くなった(表5)。特に2カ月後の葉の増加率はBA10μM+NAA1また

表5 葉とシュートの増殖に及ぼす生長調節物質の影響

区		葉の増加率(%)		シュートの増加率(%)	
BA(μM)	NAA(μM)	1ヵ月後	2ヵ月後	1ヵ月後	2ヵ月後
0	0	144	262	125	146
0	1	130	120	111	136
0	10	136	165	107	173
0	100	191	204	100	108
1	0	145	202	123	143
1	1	145	186	129	182
1	10	132	184	121	168
1	100	146	137	122	171
10	0	175	281	120	139
10	1	130	412	150	287
10	10	211	422	168	388
10	100	152	245	133	307
100	0	158	208	147	241
100	1	148	207	187	342
100	10	142	363	133	510
100	100	120	195	135	271

表6 根の増殖に及ぼす生長調節物質の影響

区		根の形成率(%)	
BA(μM)	NAA(μM)	1ヵ月後	2ヵ月後
0	0	73.3	84.6
0	1	53.3	66.7
0	10	66.7	100.0
0	100	57.1	46.2
1	0	81.3	66.7
1	1	71.4	78.6
1	10	57.1	85.7
1	100	33.3	69.2
10	0	46.7	61.5
10	1	40.0	64.3
10	10	42.9	41.7
10	100	0.0	33.3
100	0	33.3	33.3
100	1	42.9	33.3
100	10	53.3	78.6
100	100	7.7	33.3

は10μMで最も高くなり、シュート増加率は、BA100μM+NAA10μMで最も高かった。一方、根形成率は、BAなし、NAAの濃度が0~10μMの区で高くなっていた(表6)。

表7 カルス形成に及ぼす生長調節物質の影響

区		1ヵ月後の
BA(μM)	NAA(μM)	カルス形成率(%)
0	0	0.0
0	1	13.3
0	10	26.7
0	100	23.1
1	0	0.0
1	1	14.3
1	10	7.1
1	100	23.1
10	0	0.0
10	1	13.3
10	10	33.3
10	100	60.0
100	0	37.5
100	1	50.0
100	10	50.0
100	100	53.8



図3 増殖した培養株の様子

カルス形成率は、BAおよびNAA濃度の高い区で高くなった(表7)。

増殖した培養株の様子を図3に示す。

オナガカンアオイの増殖⁴⁾と比較すると、BA濃度が高い区でシュートの数が増加するのは同じ傾向であったが、オナガカンアオイでは、最もシュート増加率が高かったのはBA100μM+NAAなしの組み合わせで、ヒメカンアオイのBA100μM+NAA10μMとはNAA濃度が異なった。根の形成率はBA濃度が低い区で高いというのは同じ傾向であったが、最も根の形成率が高い組み合わせは、

ヒメカンアオイで BA なし+NAA10 μ M に対しオナガカンアオイでは、BA なし+NAA1 μ M と、NAA に対する感受性がやや異なるのではないかと考えられる。カルスの形成率も NAA と BA の両濃度が高い区で高くなる傾向は同様であったが、オナガカンアオイは BA100 μ M+NAA100 μ M で最もカルス形成率が高く、ヒメカンアオイでは BA10 μ M+NAA100 μ M の区で最も高くなった。

3. 根片培養

1996年に91片を NAA100 μ M+BA100 μ M の培地に置床したところ、1年後に不定芽が発生したものが10%見られた。

NAA と BA の組み合わせを変えた9通りの培地で根片培養を行ったところ、1年後に NAA10 μ M+BA10 μ M 培地、NAA10 μ M+BA

100 μ M 培地、NAA100 μ M+BA100 μ M 培地の3つで各1本ずつ不定芽発生が見られた(表8)。カルスの肥大率は NAA10 μ M+BA100 μ M 培地で高かった。

1998年のオーキシシンとサイトカイニンの種類を変えた実験では、IBA+BA と 2,4-D+BA でカルスの形成率が高かった(表9)。しかし、その後不定芽の発生は見られず、1年後には、NAA+KIN と IBA+KIN で発根が見られた。

根片培養の様子を図4に示した。不定芽の形成される根片の数は少ないが、形成された不定芽は多数なので増殖率の増加が期待される。



根片置床時 カルス形成 不定芽形成
 図4 根片培養

表8 根片培養に及ぼす生長調節物質の影響
 1996年10月7日～97年10月7日の経過

区		置床数	カルス肥大率 (%)	不定芽発生率 (%)	枯死・汚染率 (%)
NAA (μ M)	BA (μ M)				
0	0	12	0	0	36
10	0	12	0	0	42
100	0	11	0	0	27
0	10	12	0	0	83
10	10	12	8	8	8
100	10	12	0	0	25
0	100	13	0	0	8
10	100	11	36	8	27
100	100	12	0	8	8

表9 根片培養に及ぼす生長調節物質の影響(その2)

置床後2～3ヶ月

生長調節物質	置床数	枯死・汚染率 (%)	カルス形成率 (%)
NAA+BA	28	35.7	32.1
NAA+KIN	23	13.0	30.4
IBA+BA	27	18.5	55.6
IBA+KIN	22	22.7	22.7
2,4-D+BA	23	26.1	47.8
2,4-D+KIN	25	36.0	32.0

謝辞

本研究の御指導をしてくださった故香川彰本学名誉教授に感謝致します。

本実験の一部を担当された専攻生野呂朱美さん、弓削(旧姓山田)真紀子さん、長尾(旧姓早川)真由里さん、小澤(旧姓小杉)好枝さん、古山(旧姓安藤)智恵美さん、葛谷(旧姓梅本)陽子さん、大門(旧姓西川)幸子さん、中村(旧姓三浦)芳子さん、小山敦子さん、藤幸(旧姓宇佐美)真希子さん、小木曾恵さん、野々村(旧姓清水)和歌子さん、森口幸子さん、森優子さんに感謝します。

文献

- 1) 北村四郎・村田源, 原色日本植物図鑑草本編II, 保育社東京, 1984, 318-326
- 2) 前川文夫, 朝日百科世界の植物6, 朝日

- 新聞社東京, 1978, 1583-1587
- 3) 環境省報道発表資料レッドリストの修正
について, <http://www.env.go.jp/houdou/gazou/8886/10251/2774.pdf>, 2008
- 4) 太田和子・香川彰, ギフチョウの食草カンアオイに関する研究(Ⅱ)組織培養によるオナガカンアオイの増殖, 岐阜女子大学紀要, 26, 1997, 65-69