

ザゼンソウ苗の大量増殖法に関する研究

北村 治滋・森 真理*・西堀 康士**・大谷 博実

A Study on the Mass Propagation of Skunk Cabbages (*Symplocarpus foetidus*)

Harushige KITAMURA, Mari MORI, Yasushi NISHIBORI and Hiromi OHTANI

キーワード：ザゼンソウ、大量増殖、茎頂培養、種子、無菌播種

ザゼンソウ苗の大量増殖法について検討した。

まず、組織培養により苗を増殖する方法を検討した。茎頂をNAA 0.1mg/lとBA 1~5mg/lを加えたMS培地で培養すると多芽体が形成した。多芽体を分割し同組成の培地に移植する継代培養を繰り返すことにより多芽体がさらに増殖した。多芽体の培養温度は20℃が適した。生長した多芽体をしょ糖30g/lとゲルライト3.5g/lを添加したMS培地に継代培養すると発根し、幼苗が大量に得られた。

次に、種子から苗を効率よく増殖する方法を検討した。種子を7月下旬に採種し、低温処理(10℃で3ヶ月間)後、水苔に播種し日陰で管理すると、翌年度に37%以上、翌々年度に90%以上の種子が発芽し、幼苗が得られた。

さらに無菌播種法を検討した。同様に採種し低温処理(10℃で30日間)後、BA 0.1mg/lとNAA 0.5 mg/l添加、または植物生長調節剤無添加のMS培地に無菌的に播種すれば、約4ヶ月後に40%以上発芽し、育苗期間が短縮できることを明らかにした。

1. 緒言

ザゼンソウはサトイモ科の多年草で、山の湿地帯などに群生し、早春に開花する。滋賀県では、高島市今津町と伊香郡余呉町に群生地がある。このうち、今津町の群生地は国内の南限とされ、良好な自然環境を形成していることから、環境省の「特定植物群落」に指定され、また「滋賀県緑地環境保全地域」にも指定されている。

このため、今津町では、ザゼンソウを活用した地域活性化の取り組みが進められているが、近年、群生地では個体数が年々減少しているうえ、花の小型化もみられている。現状では、種子の確保が難しく発芽率も低いことから、群生地を回復するため、種

苗の増殖が望まれている。

そこで、組織培養法と種子からの苗の大量増殖法を併せて検討したので報告する。

2. 材料および方法

2.1 組織培養を利用したザゼンソウ苗の大量増殖法の検討

2.1.1 葉、茎からのカルス誘導のための植物生長調節剤の影響

苗の大量増殖のため、葉、茎からのカルス誘導条件を検討した。供試材料は、今津町弘川のザゼンソウ群生地から採取した若い茎と葉を用いた。茎は約5mmに切り、葉は葉脈を含むように約1cm角に切り、

* 現、滋賀県庁農政水産部農業経営課(大津地域経営指導担当)

** 現、滋賀県庁農政水産部農業経営課

培地が入った直径25 mmの管ビン内に置床した。

培地の組成は、MS培地(Murashige-Skoog)にしよ糖30g/l, ゲルライト3.5g/l を加えた固体培地を基本培地組成とし、これに植物生長調節剤として、2.4-D (2.4-Dichlorophenoxy acetic acid), BA(6-benzyl-aminopurine), NAA(1-naphthalene acetic acid)を添加し、pHを5.8に調整した。植物生長調節剤の添加量は表1に示した。培養条件は、温度25℃, 日長16時間, 照度1,800 lux とした。

2.1.2 茎頂培養による多芽体誘導のための植物生長調節剤の影響

苗の大量増殖のため、茎頂培養による多芽体の誘導条件を検討した。供試材料は、2.1.1と同様に採取した株から茎頂を切り出し、培地が入った直径25 mmの管ビン内に置床した。

基本培地は2.1.1に準じ、植物生長調節剤として、BA, NAAを添加した。添加量は表2に示した。

培養条件は、2.1.1に準じた。

2.1.3 培養温度が幼苗の生体重増加率におよぼす影響

茎頂培養によって増殖した幼苗(約0.1g~0.4g)を用い、培養温度が幼苗の生体重増加率におよぼす影響を調査した。ほぼ同じ重さの幼苗を、培地が入った300ml培養フラスコ内に植え付けた。基本培地組成は、2.1.1に準じ、植物生長調節剤は無添加とした。このフラスコを培養器内で培養したが、器内の温度は10℃, 15℃, 20℃, 25℃, 30℃に設定した。各温度区とも16個体(1フラスコ当たり4個体植えとし、4フラスコ)を供試した。培養後3ヶ月おきに幼苗の生体重を測定し、その後同組成の培地に継代培養した。

2.2 種子からの効率的な苗養成法の検討

2.2.1 無菌播種における植物生長調節剤の種類と種子の置床方法が種子の発芽におよぼす影響

無菌播種により実生苗の育成を図るため、播種する培地の植物生長調節剤の種類と種子の置床方法について検討した。

供試材料は、2.1.1と同様の場所から種子を採取した。種子は、70%エタノールに1分、1%次亜塩素酸ナトリウム水溶液に7分浸せきすることにより殺菌し、滅菌水で3回水洗した。殺菌した種子を、培地が入った直径25mmの管ビン内に置床した。基本培地の組成は2.1.1に準じ、植物生長調節剤として、2.4-D, NAAを添加した。添加量は表4に示した。培養条件は、2.1.1に準じた。

種子の置床方法は、a:へその部分を下向きに置床, b:へその部分を上向きに置床, c:半切りで下向きに置床, d:半切りで上向きに置床, の4方法で検討した。

2.2.2 無菌播種における採種時期, 低温処理, 植物生長調節剤濃度が種子の発芽におよぼす影響

種子は、2001年7月1日と7月29日採種した。この種子をビニール袋に入れ、10℃の暗黒条件で低温処理した。処理期間は、7月1日採種分は7月2日~31日, 7月29日採取分は7月30日~8月29日のそれぞれ30日間とした。その後、2.2.1に準じ種子を殺菌し、培地に種子のへそ部分を下向きに置床し、培養した。

基本培地の組成は2.1.1に準じ、植物生長調節剤としてBA, NAAを用いた。添加量は表5に示した。

2.2.3 播種用土の組成と管理場所が発芽と生育におよぼす影響

種子は、2002年7月下旬に今津町の自生地から採取した。この種子を10℃で約3ヶ月低温処理を行った後、2002年10月上旬に試験用土を入れた素焼き鉢に、種子のへその部分を下向きに播種した。

用土は、水苔のみ、水苔と腐葉土の混合用土(各同容積)、田土のみの3区とした。播種後は、鉢を水を張ったプールに入れ、常に湿った状態で管理し、置き場所は日陰と日なたの2区を設定した。なお、試験期間中、施肥は行わなかった。

調査は、2003年4月と2004年6月に発芽状況を、また、2004年7月に幼苗の草丈をそれぞれ調査した。

2.2.4 自生地の土壌特性調査

増殖した苗を栽培するための基礎調査として、県

内のザゼンソウ自生地の土壌特性を調査した。供試用土は、2002年4月22日、今津町弘川の3地点と伊香郡余呉町中河内の2地点において、深さ0~20cmの土壌を採取した。採取した土壌は、葉などの大きな有機物を取り除き、自然乾燥させた後、2mmメッシュで調整した。調整後の土壌についてpH、EC、全炭素、全窒素、CEC(陽イオン交換容量)、可給態リン酸含有量、可給態ケイ酸含有量、遊離酸化鉄含有量、交換性塩基として石灰、苦土、カリを定法により分析した。

3. 結果

3.1 組織培養を利用したザゼンソウの大量増殖法の検討

3.1.1 葉、茎からのカルス誘導のための植物生長調節剤の影響

植物生長調節剤の種類と濃度を変えた6区において、いずれの区もカルス形成は認められなかった(表1)。

表1 葉、茎からのカルス形成におよぼす植物生長調節剤の影響

植物生長調節剤		カルス形成数
種類	濃度(mg/l)	
2,4-D	0.5	0
2,4-D	1	0
2,4-D	1.5	0
BA	0.01	0
NAA	1	0
BA + NAA	0.01 + 1.0	0

注) 置床時期: 2001年4月18日
 供試本数: 1区当たり、葉10本、茎10本
 調査: 置床7ヶ月後

3.1.2 茎頂培養による多芽体誘導のための植物生長調節剤の影響

植物生長調節剤の種類と濃度を変えた4区で培養した結果、NAA 0.1 mg/l + BA 1.0 mg/l と NAA 0.1 mg/l + BA 5.0 mg/l を添加した培地で多芽体の形成が認められ、置床8ヶ月後には、1茎頂より58~81本のシュートが発生した(表2, 図1)。

得られた多芽体は、茎葉の分化が見られたら、分

割して継代用の培地に植え替えた。基本培地組成は2.1.1に準じ、植物生長調節剤としてNAA 0.1 mg/l, BA 1 mg/lを加えpHを5.8に調整した固体培地とした。この継代培養を繰り返すことにより、大量増殖が可能となった(図2)。また、増殖した苗を、発根用の培地(基本培地組成は2.1.1に準じ、pH5.8に調整した固体培地)へ移植することで発根し、幼苗が得られた。

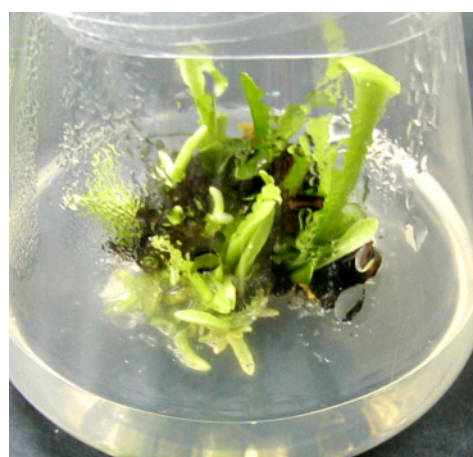


図1 ザゼンソウの多芽体
 注) 300mlの三角フラスコ



図2 多芽体を分割し、移植した個体
 注) 直径25mlの管ビン

3.1.3 培養温度が幼苗の生体重の増加率におよぼす影響

幼苗の生体重の増加率は、25区が最も高く、3ヶ月後で約12.6倍、6ヶ月後で32.0倍となった。次いで20区が高く、3ヶ月後で5.6倍、6ヶ月後では16.8倍であった(表3)。

一方、幼苗の観察調査では、25区および30区では、葉の変色や、根から褐変物質が出るなど、

表2 茎頂培養からの多芽体形成におよぼす植物生長調節剤の影響

植物生長調節剤の種類と濃度 (mg/l)	供試茎頂数 (本)	増殖茎頂数 ¹⁾ (本)	幼苗本数 (本) ²⁾	
			8ヶ月後	20ヶ月後
NAA 0.05 + BA 1.0	10	0	0	0
NAA 0.05 + BA 5.0	10	0	0	0
NAA 0.1 + BA 1.0	10	3	81 (27) ³⁾	625 (208)
NAA 0.1 + BA 5.0	10	2	58 (29)	450 (225)

注 1) 多芽体が形成した茎頂数
 2) 1 cm以上茎葉が伸長した苗数
 3) ()内は1茎頂当たり平均獲得幼苗数(本)
 置床日：2001年5月7日

表3 培養温度が幼苗の生体重増加率におよぼす影響

培養温度 ()	3ヶ月後の増加率 ¹⁾	6ヶ月後の増加率 ¹⁾
10	1.5	1.9
15	2.7	3.2
20	5.6	16.8
25	12.6	32.0
30	7.6	12.4

1) 1区当り4フラスコとし、16本の幼苗の生体重の増加率の平均値

表4 無菌播種における植物生長調節剤の種類と種子の置床法が発芽におよぼす影響

植物生長調節剤		種子の発芽数 (本)			
種類	濃度(mg/l)	置床法a	置床法b	置床法c	置床法d
2,4-D	0.5	0	0	0	0
2,4-D	1	0	0	0	0
2,4-D	1.5	0	0	0	0
NAA	0.01	3	0	0	0
NAA	1	4	0	1	0

注) 供試種子：2001年7月17日採種、7月18日置床
 供試数：1区当り10本
 調査：2001年10月18日

外観が悪かった。特に30区では培地が著しく黒変した。20区以下の場合、葉や培地の変色は認められなかった。

3.2 ザゼンソウ種子からの効率的な実生苗養成法の確立

3.2.1 無菌播種における植物生長調節剤の種類と種子の置床方法の検討

植物生長調節剤としてNAAを添加した区では、発芽が認められた。しかし、2,4-Dを用いた区ではいずれの試験区でも発芽は見られなかった。置床方法では、種子のへその部分を下向きにすることで発芽が認められた。また、半切りは適さなかった(表4, 図3)。

3.2.2 無菌播種における採種時期、低温処理、



図3 ザゼンソウ種子の発芽

植物生長調節剤濃度が発芽におよぼす影響

種子の採種時期、低温処理および植物生長調節剤を組み合わせた結果、採種時期が7月1日では発芽がみられなかった。しかし、7月29日の採種では、種子を低温処理した区で発芽がみられ、BA 0.1mg/l, NAA 0.5 mg/lの添加培地で53%、植物生長調節剤無

添加区で40%の種子で発芽が認められた(表5)。

成できることが明らかになった(表7)。

3.2.3 播種用土の組成と管理場所が発芽と生育におよぼす影響

用土は水苔単用とし、日陰で管理した場合、翌年度には37%以上、翌々年度には91%以上の種子で発芽が見られた。また、腐葉土と水苔混合用土を用い、日陰で管理した場合、翌年度には17%以上、翌々年度には87%以上の種子で発芽が見られた。しかし、田土に播種すると発芽率は半減した(表6)。

発芽後の生育は、水苔に播種し無施肥条件で管理した場合、翌々年度には展開葉2~3枚、草丈約20cm程度の幼苗が得られた。このように、最適条件下では、種子採取から約2年で草丈約30cmの幼苗が養

3.2.4 自生地の土壌特性調査

自生地は、余呉町は山あい湧き水のある湿地、今津町は市街地に近く石田川下流で湧き水のある湿地であり、どちらも落ち葉が多く堆積する湿地であった。土壌の色は、余呉町が灰色(2.5Y4/2)、今津町が黒色(10R2/2)であった。

土壌の化学性を分析した結果、場所により差は認められるものの、pHは4.9~5.5とやや低く、ECは0.1~0.2mS/cm、全炭素割合が高く、有機物が多い土壌と推察された。また、CECは高いが、石灰、苦土、カリの交換性塩基が少なく、やせた土であると考えられた(表8)。

表5 無菌播種における採種時期、低温処理、植物生長調節剤の添加が発芽におよぼす影響

採種日	低温処理	植物生長調節剤添加量	発芽率(%)
2001年7月1日	無	BA 0.1 mg/l + NAA 0.5 mg/l	0
		BA 1.0 mg/l + NAA 1.0 mg/l	0
		無添加	0
	有	BA 0.1 mg/l + NAA 0.5 mg/l	0
		BA 1.0 mg/l + NAA 1.0 mg/l	0
		無添加	0
2001年7月29日	無	BA 0.1 mg/l + NAA 0.5 mg/l	0
		BA 1.0 mg/l + NAA 1.0 mg/l	0
		無添加	0
	有	BA 0.1 mg/l + NAA 0.5 mg/l	53
		BA 1.0 mg/l + NAA 1.0 mg/l	20
		無添加	40

注) 供試本数: 1区15本
調査日: 2001年10月18日

表6 播種用土の組成と管理場所が発芽におよぼす影響

管理場所	用土	播種数	発芽数(発芽率%)	
			2003年4月	2004年6月
日陰	水苔	24	9 (37.5%)	21 (91.7%)
日陰	水苔 + 腐葉土	23	4 (17.0%)	20 (87.0%)
日陰	田土	16	-	7 (43.7%)
日なた	水苔	25	0 (0.0%)	-

表7 播種用土の組成と管理場所が発芽後の生育におよぼす影響

用土	種子数	発芽種子数	草丈別幼苗数 (本)					
			0~5 cm	6~10 cm	11~15 cm	16~20 cm	21~25 cm	26~30 cm
水苔	36	27	3	0	1	7	9	5
田土	16	7	3	0	4	0	0	0

表8 自生地の土壌特性

試料	pH (H ₂ O)	EC (mS/cm)	全炭素 (%)	全窒素 (%)	C/N比	可給態 P ₂ O ₅ (mg/100g)	りん酸吸 収係数
今津2	5.2	0.1	5.2	0.410	12.6	4.8	2490
今津3	4.7	0.1	11.0	0.841	13.0	2.5	2515
余呉1	5.5	0.1	3.5	0.292	12.0	11.7	2524
余呉2	5.0	0.2	16.3	1.012	16.1	5.3	2779

試料	CEC (me/100g)	交換性塩基			塩基飽和 度 (%)	可給態 SiO ₂ (mg/100g)	遊離 Fe ₂ O ₃ (%)
		CaO (mg/100g)	MgO (mg/100g)	K ₂ O (mg/100g)			
今津1	47.4	355	98	28	38.2	15.4	0.89
今津2	17.4	150	15	13	36.6	13.8	1.42
今津3	34.4	49	14	21	8.4	28.7	1.27
余呉1	20.0	195	39	27	47.5	7.4	1.10
余呉2	37.5	316	47	20	37.3	40.3	0.62

4. 考 察

ザゼンソウ (*Symplocarpus foetidus*) は北米東部および北東アジアに分布するサトイモ科ライア亜科に属する多年生植物である。湿地に群落を形成して自生する。地上部には、サトイモ科植物に特徴的な仏炎苞と肉穂花序を有している。開花は2月から4月の外気温がしばしば氷点下まで低下する寒冷環境で観察される。これは寒冷環境においても肉穂花序の温度が発熱により20℃付近にまで上昇する。また、その恒温性を6日以上もの長期間にわたり、維持できることなどが最近の研究で明らかにされ、注目されている^{1) 2)}。また、サトイモ科の植物に見られる雌雄異熟の特徴を有する。日本では、北海道や本州の主として日本海側に分布する。

滋賀県においては、高島市今津町弘川と伊香郡余

呉町中河内の2ヶ所の自生地を自然環境保護地域に指定している⁷⁾。

このうち今津町の群生地は、昭和61年に環境庁の「特定植物群落」に指定され、平成元年度には「滋賀県自然環境保全地域」に指定された。

しかし、近年自生地では、自然環境の変化や市街化が進み、個体数の減少や花の小型化が見られるようになった⁶⁾。

このため、今津町から苗の増殖要請があり本研究に取り組んだ。

増殖は組織培養法と播種法の両方法について検討した。

組織培養による大量増殖法については、既に多くの植物種で確立されている。著者らもバラ⁵⁾、パンダ⁴⁾、アナナス³⁾の他、野菜、花、特用作物、稀少植物等24品目について初心者向きの図解マニュアル書を

既に作成し⁸⁾、併せて県ホームページ上で公開している。(http://www.pref.shiga.jp/g/nogyo/biomanual.html)。

大量増殖を目指すにはカルスや多芽体を誘導する方法が効率的である。そこで、2.1の実験で培養部位や培地組成を検討した。結果的にはカルスは得られず、茎頂培養から多芽体を得られた。この多芽体の生育は、これまで著者らが培養してきた草花類に比べると緩慢であった。このため生育を促進する必要があると考え、2.1.3で培養温度を検討した。試験結果から培養中の温度管理が苗の生育や増殖効率に大きな影響があることが示唆された。

通常、著者らは種々の植物を培養する場合、培養温度を25℃に設定している。ザゼンソウにおいても増殖率だけに注目すると25℃区が優れたが、観察結果も併せて考えると20℃区が適当と考えられた。

培養後、馴化した苗を自生地へ返すことは可能ではあるが、クローン苗であるため遺伝的には同一である可能性が高く、遺伝的多様性に配慮する必要があると考えられる。

このため、種子からの効率的な増殖法の開発が必要と考え、培養器内に無菌播種する方法と用土に播種する方法を検討した。

まず無菌播種では、発芽とその後の生長において、基本培地に添加する植物生長調節剤の影響が考えられた。このため、2.2.1では2,4-DとNAAの添加を比較したところ、NAA添加で発芽数が多かった。

しかし、2.2.2の結果から、培地への植物生長調節剤の影響よりも採種時期と低温処理の影響が大きいことが伺えた。すなわち、7月下旬に採種し、10℃で1ヶ月程度低温にあわせれば、発芽し生長することが明らかになった。

用土への播種においても、無菌播種時と同様、7月下旬に採種し、10℃で3ヶ月程度低温に遭わせれば、水苔を単用の培土とし、日陰で管理した場合、翌年春には37%以上、翌々年春には90%以上の種子が発芽し幼苗が得られた。この方法によれば特別な道具や施設が不要なため現地でも簡単に組み立てられる。

一方、発芽までの期間に着目すると、無菌播種の方法では、約4ヶ月で50%程度発芽し、用土に播種した場合に比べ育苗期間が大幅に短縮できることが

明らかになった。

以上のように、クローン苗を大量に増殖するには茎頂培養法を、7月下旬に種子が得られ短期間に育苗したい場合は無菌播種を、無菌作業ができる施設がない場合は用土へ播く方法をそれぞれ使い分ければ良いと考えられた。

得られた苗を馴化する場合の参考に現地の土壌を分析した。pHは5.5以下とやや低く、ECは0.2mS/cm以下であった。総じて有機物には富むが、やややせた土壌であるという結果であった。このため、幼苗を馴化する場合は、一般の園芸用土に腐葉土と赤玉土を配合して用い、良好な結果を得ている。

現在、培養技術は、有限会社「アグリ今津」に技術移転し、多芽体を分割し無菌的にガラスビン内に植え付け、「ザゼン草ミニ」として平成16年春から地域の特産品として試作販売を行っている。

また、今津中学校にはクラブ活動の一環として組織培養技術の習得支援を行っている。

育成した幼苗は、今津町内4ヶ所に植え付け現地栽培試験を実施中である。

謝 辞

本研究を遂行するに当たり、終始多大なるご協力をいただいた今津町(現高島市)教育委員会 川崎弘氏、また、ご助言、ご指導をいただいた松見茂氏に深く感謝の意を表します。

さらに、本技術の地域への活用に際し、積極的に取り組んでくださった、有限会社「アグリ今津」の石原隆氏および職員の皆さん、今津中学校の先生と生徒の皆さんに深く感謝の意を表します。

引用文献

- 1) 伊藤菊一, 2004. 植物の発熱現象と植物ホルモン. 植物の生長調節, Vol.39, No.2: 167-173.
- 2) 伊藤孝徳, 伊東靖子, 伊藤菊一(2006) ザゼンソウの発熱制御システム. 化学と生物 44: 225-232.
- 3) 北村治滋・森真理・宮村弘明, 組織培養を用いたアナナスの大量増殖法、生育促進法および馴化法の開発: 近畿中国四国農業研究, 8, 40 - 45, 2006.
- 4) 北村治滋・渡辺建三・森真理, 組織培養によるパンダの大量増殖法および馴化法に関する研究: 滋賀

農試研究報告, 36, 41 - 46, 1995.

5) 北村治滋・山田純男・渡辺健三, 花きの優良種苗増殖技術に関する研究(第1報)組織培養におけるバラの効率的培養法, 発根法および馴化法: 滋賀農試研究報告, 32, 64 - 74, 1991.

6) 松見茂執筆 川崎弘編集 高島市教育委員会発行 ザゼンソウの四季. 2007

7) 滋賀県生きもの総合調査委員会編 滋賀県で大切にすべき野生生物. 229, 2005

8) 滋賀県農業総合センター農業試験場: 植物のバイオ実験マニュアル, 1 - 63, 滋賀県, 滋賀, 2002.

Summary

Various methods of mass-propagating skunk cabbages were investigated.

First, a method based on tissue culture was investigated. Multiple shoots were formed by culturing shoot apices on a basal medium (MS) supplemented with 0.1 mg/l naphthalene acetic acid (NAA) and 1-5 mg/l benzyladenine (BA). Each shoot was divided and transplanted to fresh medium of the same composition. These processes were repeated to further propagate multiple shoots. Culture temperature was optimized at 20°C. Well grown multiple shoots were readily rooted in an MS medium supplemented with 30 g/l sucrose and 3.5 g/l Gelrite, resulting in a large number of young seedlings.

Next, a method of efficiently producing seedlings from seeds was investigated. Seeds were collected in late-July and exposed to low temperature (10°C, 3 months), after which they were sown in bog moss and kept under shade. More than 37% of the seeds germinated the following year (2nd year), and more than 90% germinated in the 3rd year.

Furthermore, a method based on aseptic sowing was investigated. Seeds were collected as described above, and exposed to low temperature (10°C, 30 days), after which they were aseptically sown in an MS medium supplemented with 0.1 mg/l BA and 0.5 mg/l NAA, or a hormone-free MS medium. About four months later, more than 40% of the seeds had germinated, irrespective of the addition of plant hormones. Hence, this method was shown to shorten the seedling-raising period.