

組織培養によるイチゴ・サトイモの大量増殖*

岡山 健夫・大澤 勝次**

Optimal Culture Conditions for Clonal Multiplication of Strawberry and Taro

Ken-o OKAYAMA and Katsuji OOSAWA

緒 言

イチゴ、サトイモなどの栄養繁殖性作物では、一度親株がウイルス病に感染すると、ウイルスは子苗や種いもを通じて次々とその後代に伝わり、草勢の低下や退化現象をまねき生産力の低下が著しい。本県では1974年からイチゴ無病苗育成事業を開始し、ウイルスフリー株を農家に増殖配布しており、これらのウイルスフリー株が従来からの株に比べ非常に高い増収効果のあることが確認されている³⁾。

ウイルスフリー株の獲得法としては、熱処理によるウイルスの不活化方法と生長点組織培養法が試みられ、既に実用化が進んでいる。熱処理による方法は一度に大量の株を処理できる利点があるが、高温下に長期間保たなければならないため、処理中に株が枯死する危険があり、適用作物が限られている。生長点組織培養法は、森⁷⁾らにより20種以上の作物で研究され、イチゴ、サツマイモなど12種の作物でウイルスフリー株を育成している。この方法はその後全国の無病苗育成事業において基核親苗や原種株の育成に実用化されているが^{3,13)}、従来の茎頂培養法では一つの生長点から一つの幼植物が得られるにとどまり、また得られた幼植物は、その都度1株ずつウイルス検定をしなければならず能率性に欠ける。さらに原種株を維持増殖する過程では再感染を避けるために厳重な管理と細心の注意を払う必要がある。

大澤¹⁰⁾らはイチゴのやく培養によってカルス組織からの植物体誘導を確立し、一つのやく起源カルスから50~100個体以上のウイルスフリー株を得た。さらにイチゴの生長点組織からカルスを形成し、このカルスから多数の茎葉を分化させ、一つの生長点から50個体以上の幼植物を獲得し、カルス細胞由来の植物体をカリクロン(*Calliclone*)とした¹²⁾。その後ニンニク、ラッキョウ、ネギ、ヤマイモ、サトイモなど栄養繁殖性

野菜6種でカリクロン植物を誘導し、試験管内大量増殖の途を開いた^{9,11,12)}。この方法は一度に大量のウイルスフリー幼植物を獲得できる利点があり、能率的な無病苗生産の目的に合致した方法と考えられる。

本実験では、イチゴ品種別のカルス形成および茎葉分化に及ぼす植物ホルモン添加の影響を調べ、従来から行われている茎頂培養技術とカルスあるいは不定芽を利用した試験管内大量増殖技術の長所と短所を明らかにし、ウイルスフリー株大量育成法の実用化について検討した。さらにサトイモのウイルスフリー一株の効率的な大量増殖を確立するために品種、培養部位、培地組成を検討したので併せて報告する。

材料および方法

1. 供試品種

イチゴは、野菜試験場で維持している“宝交早生”および“ベスカ”(*Fragaria vesca*, EMC系)と当地で維持している“宝交早生”および“はつくに”を用いた。

サトイモは、“八つ頭”、“唐芋”、“土垂”の3品種を用いた。

2. 供試部位および殺菌方法

イチゴは、ランナーの先端を採取し、その芽先から葉原基1~3枚を含む茎頂組織を0.2~0.5mmの大きさに摘出して培養に用いた。

サトイモは、いもの頂芽を切りとった後、一斉に出芽して来る周囲の芽を用い、茎頂は0.2~0.5mmの大きさに切りとって培地に置床した。茎頂近傍組織は生長点基部の組織を用い、茎頂摘出後に残った組織を1~2mmの大きさに切り置床した。幼葉は茎頂摘出直前の第2~4葉原基各2葉を用いた。葉切片は葉を2~4mmの大きさに切り置床した。

殺菌方法は、摘出前に99%アルコールに2~3秒浸漬した後、修正ウイルソン液(高度サラシ粉12gを100mlの水に混和し、その上澄液を用いる)に15分間以上浸漬して行った。

* 本研究の一部は農林水産省依頼研究員として野菜試験場育種第一研究室において研修中に行ったものである。

** 農林水産省野菜試験場育種部

3. 培地組成および培養条件

基礎培地には *Linsmaier & Skoog*(L.S) の培地を用い、添加培地にはイチゴでは Table 1, サトイモでは Table 2 に示したようなサイトカイニン (ベンジルアデニン = 6-ベンジルアミノプリン、以下 BA と略記) とオーキシシン (ナフタレン酢酸、以下 NAA と略記) を溶かした後、それぞれショ糖 3%、寒天 0.7% を加え、pH 5.6 ~ 6.0 に調整した。これらの培地を 20mmφ × 95mm の試験管に 7ml ずつ注入し、オートクレーブ (1kg/cm² 圧・15分間) で殺菌して用いた。培養は 20°C 恒温室内で 12 時間プラントルクス照明 (試験管頭部で約 3000 lux) ・12 時間暗黒の条件下で行った。

4. 培養時間および調査

イチゴでは、1981年12月10日~18日および1982年1月27日~2月2日の2回に分けて置床し、培養8週間後にカルス形成と茎葉分化について調査し、また経時的に観察した。

サトイモは、1982年2月3日~13日に培養を開始し、4か月後に調査した。

結 果

1. イチゴ品種別のカルス形成および茎葉分化に及ぼすホルモン添加の効果

供試した4系統はいずれもLS基礎培地上で茎葉分化が最も高率に行われ、根の分化も良好であったが、カルス形成はまったく認められず、置床した茎頂が伸長した1株の茎葉が認められるのみで、添加培地における茎葉発生とは明らかに区別された。

基礎培地に BA, NAA の単独または両方を添加した培地では各々の培地組成でカルス形成や茎葉分化が観察された。

“宝交早生”を用いた場合、各添加培地でのカルス形成は、BA, NAA 共存培地で比較的高率に行われ、とくに BA 2mg/l + NAA 2mg/l, BA 1mg/l + NAA 1mg/l ではカルスは急速に増殖し、NAA 濃度が高まるほどカルス形成が進んだ。しかし、BA 2mg/l + NAA 2mg/l では茎葉分化はほとんど認められず、長期間の培養中にカルスが赤褐色に変色する 경우가多かった。BA 単独培地では 2mg/l 添加の方が 1mg/l 添加よりもカルス形成率が高かった。カルスを経路しない茎葉分化は基礎培地で高率に観察され、カルス経路の茎葉分化は BA 1mg/l および BA 2mg/l 単独培地や BA 1mg/l + NAA 0.2mg/l および BA 1mg/l +

NAA 1mg/l などの共存培地で高率に観察され、これらの培地では一つのカルスから 2, 3 本以上の茎葉が高率に分化した (Fig. 1)。

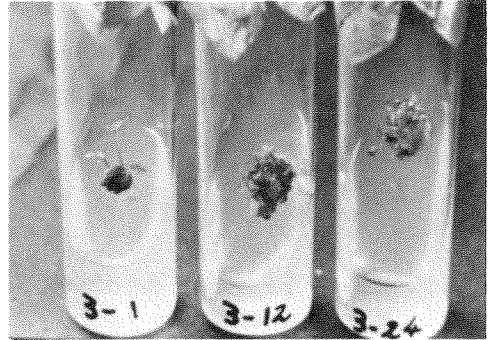


Fig.1 Shoot formation by usual meristem culture in strawberry and early formation from meristem callus. (left:LS medium, center:LS medium containing BA1mg/l, right:LS medium containing BA2mg/l, after 8weeks culture)

茎葉分化率の合計は BA 1.0mg/l で最も高く、次いで基礎培地、BA 2mg/l, BA 1mg/l + NAA 0.2mg/l, BA 1mg/l + NAA 1mg/l の順であった。分化茎葉数は基礎培地が1株しか獲得できないのに対してこれらの添加培地ではカルス経路、非カルス経路ともに 2, 3 本以上の茎葉が獲得できる場合が多く認められた。以上の傾向は野菜試験場養成の株および当場養成の株ともに認められた。

“ベスカ”を用いた場合、カルス形成は BA 2mg/l, BA 1mg/l + NAA 1mg/l, BA 2mg/l + NAA 2mg/l の培地組成で観察されたが、カルス形成率の最も高かった BA 2mg/l, BA 1mg/l + NAA 1mg/l でさえ 33% で、“宝交早生”に比べると非常に低率であった。茎葉分化率は基礎培地では比較的高かったものの他品種に比べると低率であり、カルス経路、非カルス経路を合計した茎葉分化率は BA 1mg/l, BA 2mg/l, BA 1mg/l + NAA 1mg/l で比較的高率であったが、分化茎葉数は少なかった。

“はつくに”を用いた場合、カルス形成は BA 2mg/l, BA 1mg/l で高率であったが、共存培地では低率であった。茎葉分化率は基礎培地で非常に高率であり、次いで BA 1mg/l, BA 2mg/l の順で、これらの添加培地では多数の茎葉が分化したが、他の添加培地では著しく低率であった。基礎培地における茎葉分化は他品種と同じく1株だけの伸長であった。

Table 1. Callus and shoot formation from meristematic tissue in three cultivars of strawberry

Cultivar	concentration of		Number of explants				percentage of callus formation % (B/A)	Number of explants with direct shoot formation (C)			percentage of direct shoot formation % (C/A)			Number of explants with (D) callus formation (D/A)	percentage of callus formation (D/A) %	Total percentage of shoot formation $\frac{(C+D)}{A}$ %	Number of explants root formation (E)	percentage of root formation (E/A) %
	BA	NAA	Cultured (A)	Degene-rated	Callus formation (B)			1	2-3	4	1	2-3	4					
					+	++												
Hōkōwase (Anō)	0	0	15	6	0	0	0	9	0	0	60	0	0	0	60	7	47	
	1	0	16	4	7	0	44	1	1	3	31	3	2	0	31	62	4	25
	2	0	16	1	8	0	50	1	1	1	19	1	1	1	19	38	0	0
	1	0.2	16	3	11	0	69	1	0	1	13	0	1	3	25	38	0	0
	1	1	16	1	12	3	94	0	0	0	0	4	0	0	25	29	1	6
	2	2	16	0	11	5	100	0	0	0	0	1	0	0	6	7	0	0
Hōkōwase (Nara)	0	0	16	9	0	0	0	7	0	0	44	0	0	0	44	7	44	
	1	0	16	4	10	0	63	0	0	2	13	1	1	3	31	44	2	13
	2	0	16	2	13	0	81	0	0	1	6	1	1	3	31	37	0	0
	1	0.2	16	6	8	0	50	0	0	1	6	1	0	3	25	25	0	0
	1	1	16	1	13	2	94	0	0	0	0	0	4	0	25	25	0	0
	2	2	15	4	9	2	73	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F.vesca	0	0	15	9	0	0	0	6	0	0	40	0	0	0	40	6	40	
	1	0	16	9	3	0	19	3	1	2	38	1	0	0	6	44	3	19
	2	0	16	8	5	0	33	3	0	0	19	1	1	0	13	32	2	13
	1	0.2	16	13	2	0	13	1	0	0	6	0	0	0	0	6	1	6
	1	1	15	9	5	0	33	0	0	0	0	4	0	0	27	27	3	20
	2	2	16	8	5	0	31	0	0	0	1	2	0	0	19	19	0	0
Hatsukuni	0	0	12	1	0	0	0	11	0	0	92	0	0	0	92	3	25	
	1	0	13	3	7	0	54	0	1	2	23	0	3	4	54	77	3	23
	2	0	12	3	10	0	83	0	0	0	0	1	1	1	17	17	1	8
	1	0.2	12	8	3	0	25	0	0	0	0	1	0	0	8	8	0	0
	1	1	13	9	4	0	31	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	2	13	11	2	0	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

1) Hōkōwase (Anō) was grown in Vegetable Research Station, Hōkōwase (Nara) was grown in Nara

2) Basic medium: Linsmaier & Skoog's medium

3) Callus formation, +; poor callus formation, ++; good callus formation,

添加培地では、カルス組織の形成が認められずに茎葉が分化して来た場合と、カルス組織から茎葉が分化して来た場合が観察された。非カルス経路と観察された茎葉分化はBA 1 mg/l で最も多く認められ、4本以上の茎葉分化が供試4系統で観察された。BA 2 mg/l ではやや低率になり、BA 1 mg/l + NAA 0.2 mg/l 共存培地ではごくわずかであった。しかし、これら肉眼で非カルスと判断した茎葉の基部を解剖顕微鏡下で観察したところ、小さなカルス組織の認められる場合が多かった。

置床した茎頂の生育を観察すると、各培地組成間で茎葉の分化時期やカルスの増殖に差が認められた。置床4週間後に観察した結果、基礎培地では葉の展開が認められるのに対して、BA 1 mg/l 添加培地では置床した茎頂がやや肥大し先端部が緑色になり、BA 2 mg/l 添加培地では淡黄緑色になって肥大した程度でいずれも茎葉分化は明らかではなかった。BA・NAA共存培地では、カルス形成が観察され、カルスは黄白色で増殖が活発であった。置床16週間後には分化した茎葉を試験管から取り出して順化できるようになるが、添加培地と基礎培地では茎葉の生育や分化数に明らかな差が認められた(Fig.2)。

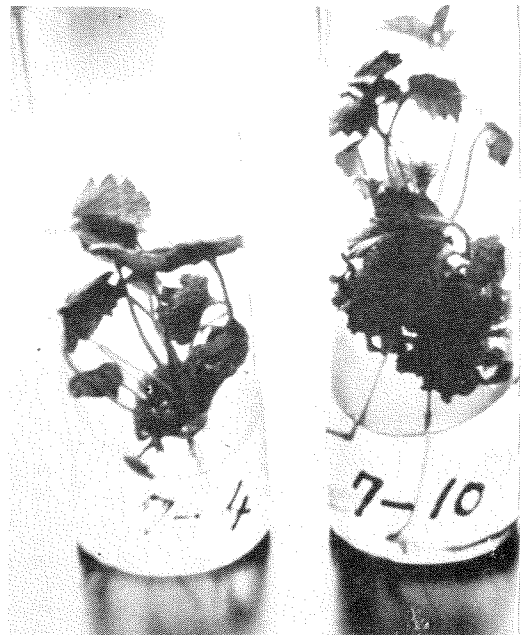


Fig. 2 Developed shoots from meristem. (left: LS medium, right: LS medium containing BA 1 mg/l after 16 weeks culture)

2. サトイモ品種別のカルス形成および茎葉分化に及ぼすホルモン添加の効果

各培地組成に茎頂を置床した場合のカルス形成、茎葉分化は Table 2 に示したとおりである。

サトイモのカルスはほとんどがプロトコーム様カルスであり、これはサトイモ培養時の特徴とみられている。

“八つ頭”では、カルス形成はBA 1 mg/l + NAA 0.2 mg/l 共存培地で最も高率に行われ、次いでBA 1 mg/l + NAA 1 mg/l で高率であった。これらの培地組成ではカルス経由の茎葉分化も活発に行われ、置床した1茎頂が形成したカルスから2本以上の茎葉が高率に獲得できた。

カルス経由の茎葉分化が共存培地で高率に観察されたのに対して、非カルス経由の茎葉分化は、基礎培地やBA 1 mg/l、BA 2 mg/l の単独培地で多数観察された。基礎培地における茎葉分化は比較的高率に認められるが、ほとんどは置床した茎頂が伸長した1株の茎葉だけにとどまった。BA 1 mg/l 単独培地では、茎葉分化率は基礎培地よりも低いものの1茎頂からの茎葉分化数は基礎培地よりも多かった。

“土垂”では、カルス形成率およびカルス経由の茎葉

分化率はともにBA 1 mg/l + NAA 0.2 mg/l、BA 1 mg/l + NAA 1 mg/l の共存培地で高く、非カルス経由の茎葉分化率はBA 1 mg/l で高く、これらの傾向は“八つ頭”とはほぼ同様であった。

“唐芋”では、BA 1 mg/l + NAA 1 mg/l を供試しなかったため適否は不明であるが、BA 1 mg/l + NAA 0.2 mg/l 共存培地でカルス形成率、カルス経由の茎葉分化率が高く、また非カルス経由の茎葉分化は基礎培地とBA 1 mg/l 単独培地で高率であり、“八つ頭”とはほぼ同様の傾向であった。

供試した3品種のうちで“八つ頭”、“土垂”のカルス形成率は培地組成によって差があるものの比較的高率であり、“唐芋”はこれらに比べて低率であった。

茎葉分化は3品種ともに非カルス経由の茎葉分化が基礎培地やBA 1 mg/l、BA 2 mg/l の単独培地で観察され、“八つ頭”、“唐芋”では基礎培地で最も高率であり、“土垂”ではBA 1 mg/l で最も高率であった。カルス経由の茎葉分化(カリクロン植物の誘導)は“八つ頭”“土垂”では1カルスから2本以上の茎葉が高率に獲得できたが、“唐芋”ではこれらに比べて低率で分化茎葉数も少なかった。ただ“唐芋”ではBA 1 mg/l + NAA 1 mg/l 共存培地を供試していないので、さらに検討する必要がある。

Table 2. Callus and shoot formation from meristematic tissue in three cultivars of taro

Cultivar	Concentration of		Number of explants		Callus formation	Percentage of callus formation (B/A)	Number of explants with direct shoot formation (C)		Percentage of direct shoot formation (C/A)	Number of explants with calliclone formation (D)		Percentage of calliclone formation (D/A)	Number of explants with root formation (E)		Percentage of root formation (E/A)
	BA	NAA	Cultured	Degene- -rated			%	+		++	%		+	++	
	mg/l	mg/l	(A)	(B)	(C)	(C/A)			(D)			(D/A)			(E)
Yatsugashira	0	0	16	6	0	0	8	1	56	0	0	0	2		12
	1	0	16	5	2	13	3	4	43	1	0	6	0		0
	2	0	16	8	4	25	4	0	25	0	0	0	0		0
	1	0.2	16	2	13	81	0	1	6	4	7	68	3		18
	1	1	8	2	6	75	0	0	0	2	4	75	3		18
	2	0.2	8	6	2	25	0	0	0	1	1	25	0		0
	2	2	16	11	5	31	0	0	0	2	1	18	1		6
Dodare	0	0	8	5	0	0	3	0	38	0	0	0	1		13
	1	0	8	1	1	13	6	0	75	1	0	13	1		13
	2	0	8	5	0	0	3	0	38	0	0	0	0		0
	1	0.2	8	1	7	88	0	0	0	6	0	75	0		0
	1	1	8	1	7	88	0	0	0	1	4	63	4		50
	2	2	8	7	1	13	0	0	0	1	0	13	0		0
Tōnoimo	0	0	11	5	0	0	6	0	55	0	0	0	1		9
	1	0	12	8	0	0	4	0	33	0	0	0	0		0
	2	0	12	7	2	17	3	0	25	1	0	8	0		0
	1	0.2	12	6	6	50	0	0	0	4	0	33	1		8
	2	0.2	12	8	4	33	0	0	0	2	1	25	0		0
	2	2	11	9	2	18	0	0	0	0	1	9	0		0

1) Basic medium: Linsmaier & Skoog's medium.

2) Number of explants with direct shoot formation, +: one shoot ++: above two shoots.

3) Number of explants with calliclone formation, +: one shoot ++: above two shoots.

3. サトイモの培養部位ならびに培地組成とカルス形成・茎葉分化

各培地組成における培養部位別のカルス形成と茎葉分化についての結果は Table3 に示したとおりである。

茎頂近傍組織を培養した場合には添加培地でいずれもプロコーム様カルスが観察され、これらのカルス

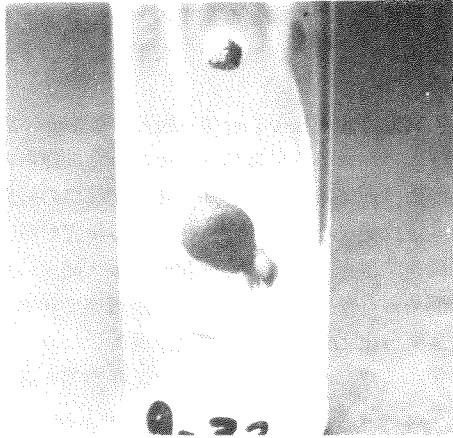


Fig.3 Protocorm-like callus formation from near-meristem in taro.
(LS medium containing BA 1mg/l +NAA 0.2mg/l)

から茎葉分化が認められた(Fig.3)。茎葉分化率はBA 1 mg/l、BA 2 mg/lの各単独添加培地やBA 2 mg/l + NAA 2 mg/lの共存添加培地で比較的高く、これら

の培地では分化した茎葉数もほぼ同数であった。

またBA 2 mg/l+NAA 2 mg/l 共存培地では根の分化も高率に行われたが、茎葉分化は観察されなかった。

幼葉を培養した場合には、基礎培地以外のホルモン添加培地でカルス経路による茎葉分化が観察され、とりわけBA 1 mg/l+NAA 0.2 mg/lの共存培地で多かった(Fig.4)。カルス形成はBA 2 mg/l単独培地、BA 1 mg/l + NAA 0.2 mg/l、BA 2 mg/l+NAA 0.2 mg/l、BA 2 mg/l+NAA 2 mg/l 共存培地で観察され、半数以上がカルス化した。



Fig.4 Shoots formation from near-meristem callus (left), and from young leaf (right).
(LS medium containing BA 1mg/l +NAA 0.2mg/l)

Table3. Callus and shoot formation from explants excised from various portion of Taro (Tônoimo, Dodare)

Cultured portion	Size of explant mm	Concentration of		Number of explants			Percentage of callus formation (B/A) %	Number of explants with direct shoot formation		Percentage of direct shoot formation (C/A) %	Number of explants with calliclone formation		Percentage of calliclone formation (D/A) %	Number of explants with root formation		Percentage of root formation (E/A) %
		BA mc/l	NAA mg/l	explanted test-tube (A)	Degene-rated (B)	+		++	+		++	+		++		
															(C)	
Near-meristem	1 ~ 2	0	0	8	4	4	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		1	0	8	2	6	75	0	0	0	3	1	50	0	0	0
		2	0	8	3	5	63	0	0	0	2	1	38	1	13	0
		1	0.2	8	5	3	38	0	0	0	1	0	13	0	0	0
		2	0.2	8	2	6	75	0	0	0	1	1	25	1	13	0
		2	2	8	2	6	75	0	0	0	2	1	38	4	50	0
Young leaf	0.5~1.0	0	0	8	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		1	0	8	6	2	25	0	0	0	0	2	25	0	0	0
		2	0	8	4	4	50	0	0	0	0	2	25	0	0	0
		1	0.2	8	2	6	75	0	0	0	0	3	38	0	0	0
		2	0.2	8	4	4	50	0	0	0	2	0	25	1	13	0
		2	2	8	3	5	63	0	0	0	0	2	25	0	0	0
Leaf	2 ~ 4	0	0	8	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		1	0	8	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		2	0	8	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		1	0.2	8	6	2	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		2	0.2	8	2	6	75	0	0	0	1	0	13	0	0	0
		2	2	8	4	4	50	0	0	0	0	1	13	0	0	0

1) Basic medium : Linsmaier & Skoog's medium.

2) Number of explants with direct shoot formation, +: one shoot, ++ above two shoots.

3) Number of explants with with calliclone formation, +: one shoot, ++ above two shoots.

葉を培養した場合、カルス形成はBA 2 mg/l + NAA 0.2 mg/l 共存培地で最も高率に、次いでBA 1 mg/l + NAA 0.2 mg/l、BA 2 mg/l + NAA 2 mg/l 共存培地で認められたが、いずれの添加培地でも茎葉の分化率は低く、また根の分化は観察されなかった。

以上のように、茎頂以外の培養部位では茎頂近傍組織や幼葉で茎葉分化が認められたが、茎葉分化率、カルス形成率は茎頂培養に及ばなかった。

考 察

1. イチゴの大量増殖

イチゴのカルス形成率や茎葉分化率には品種間差が認められ、“宝交早生”はBA、NAA濃度の高い培地でカルス形成が促進された。茎葉分化はBA 1 mg/l、BA 2 mg/l、BA 1 mg/l + NAA 0.2 mg/l、BA 1 mg/l + NAA 1 mg/lなどの各添加培地で活発で培地組成による差は比較的小さく、いずれの培地組成を使用しても高率にカリクロン植物が獲得でき、大量増殖は最も容易であると考えられた。“ベスカ”はBA 1 mg/lまたはBA 2 mg/lの単独添加培地かあるいはBA 1 mg/l + NAA 1 mg/l 共存培地で茎葉分化が比較的良かったが、他品種に比べると低率でカルスの増殖も遅く、大量増殖は比較的困難であると考えられた。“はつくに”は培地組成によって茎葉分化率の差が顕著で、BA 1 mg/l 単独添加培地が大量増殖に最適であると考えられた。

培養における品種間差について、森ら⁷⁾はグナーが培養容易で、福羽や幸玉は困難であり、培養組織片の小さいほど品種間差が顕著であったと報告している。

大澤ら^{10,11,12)}は‘F. vesca’は葯からのカルス形成が困難で品種間差があることを明らかにし、さらに茎頂組織からカリクロン植物を誘導する場合、品種ごとに最適培地が異なることを報告している。品種間差は本実験からも観察され、各品種ごとの最適培地を明らかにした。品種ごとの最適培地について大澤らは“宝交早生”のカルス化がBA 10^{-5} M(≒2 mg/l)の単独培地やBA 10^{-5} M + NAA 10^{-6} M(≒0.2 mg/l)共存培地で進行し、カリクロン植物はBA 10^{-5} M単独培地で最も高率に誘導し、NAAやIAAは茎葉分化に阻害的に働いたと報告している。本実験では、BA 2 mg/lでカルス化が促進されるが、茎葉分化にはBA 1 mg/lが最適であると考えられた。また、カルス形成はBA 2 mg/l + NAA 2 mg/lの共存培地で最も高率であっ

たが、茎葉はほとんど分化しなかった。カリクロン植物の誘導にはBA 1 mg/l + NAA 1 mg/l、またはBA 1 mg/l + NAA 0.2 mg/lが適し、これらの培地ではBA単独培地よりもカルスの増殖が早く、培養方法によっては増殖が効率良く進む可能性があると考えられた。

基礎培地、BA単独培地およびBA・NAA共存培地における茎葉分化には発生の過程で違いが観察された。基礎培地では置床した茎頂の伸長による1本の茎葉発生にとどまるが、根の分化が早く最も高率に分化した。

BA単独培地やBA 1 mg/l + NAA 0.2 mg/l 共存培地では、カルス経由の茎葉分化と非カルス経由の茎葉分化の両方が観察された。解剖顕微鏡観察の結果、後者の基部に微小なカルスが確認される場合が多く、さらに同一培地上でカルスの増殖やカルス経由の茎葉分化も認められていることから、添加培地で非カルス経由の茎葉分化と観察した茎葉は本質的にはカルス経由であり、これらの茎葉はカリクロン植物であると判断された。

このような茎葉分化の違いは、イチゴの茎頂起源カルスから茎葉が分化する時期に早晚があり、BA 2 mg/lや共存添加培地ではカルス形成がある程度進んでから茎葉分化が始まるのに対して、BA 1 mg/l 添加培地では、ごく初期のカルスのうちに茎葉が分化し始めるために、肉眼観察では非カルス経由が多く認められたものと推察される。

Boxus¹⁾らはMS基礎培地にBA 1 mg/lを添加した培地を用いてイチゴの茎頂を培養して多数の腋芽を誘導し、これを基礎培地に移植する方法によって1年間に15°~25°もの幼植物が大量増殖できたと報告している。

本実験ではLS基礎培地にBA 1 mg/lを添加した培地で多数の幼植物が獲得できることを確認したが、この植物体はカリクロン植物であると判断された。さらにこの方法では1年間に数百万本のイチゴウイルスフリー株が育成できることから、従来の無病苗生産に比べて非常に能率的な増殖が期待できる。今後、さらにこれらのカリクロン植物の生産力、均質性などについて調査し、実用化技術としたい。

2. サトイモの大量増殖

サトイモの茎頂培養におけるカルス形成率は“八つ頭”や“土垂”で高く、“唐芋”では比較的低かったが、いずれの品種も最適培地上では50%以上のカルス形成率を示した。サトイモのカルスはほとんどがプロトコ

ーム様カルスであり、カルス由来の茎葉分化率は、“八つ頭”、“土垂”で高く、これらの品種では分化した茎葉数も多く、大量に幼植物を獲得できる可能性が見出された。しかし、“唐芋”ではカルス経由の茎葉分化率は低く、品種間差が推察された。

大澤ら¹²⁾は、ニンニク、ラッキョウ、ネギ、ヤマイモでカルスを經由しない不定芽の発生を認め、ヤマイモではBA 10^{-5} M単独培地で培養した場合に多かったと報告している。

本実験では、BA 1 mg/l、BA 2 mg/lの単独培地でサトイモのカルスを經由しない茎葉分化を高率に認めた。これらの培養株については1か月後から解剖顕微鏡下で観察を続けたところ、カルス形成は確認できず、基礎培地における茎葉発生と区別がつかず、これらの茎葉は不定芽であろうと推察された。

サトイモの茎頂培養については、既報^{2,4,5,6,12)}において添加ホルモンなどが明らかにされているが、研究者によって最適培地が異なっている。本実験では、LS基礎培地にBA 1 mg/l + NAA 1 mg/l、あるいはBA 1 mg/l + NAA 0.2 mg/lを添加した培地組成で茎葉分化が旺盛であり、この組成は大沢ら¹²⁾が最適培地としたBA 10^{-5} M(≒ 2 mg/l) + NAA 10^{-6} M(0.2 mg/l)共存培地よりも好成績であった。

最適培養部位については茎頂が最も適しており、大澤らの報告と一致したが、茎頂近傍組織や幼葉も十分培養可能で幼植物体が獲得でき、各々の培養部位ごとに最適培地が明らかになった。

しかし、このような培養条件ではイチゴに比べ獲得できる幼植物数ははるかに少なく、また順化するまでに時間がかかりすぎる欠点がある。松本⁹⁾はMS培地へKIN 1 mg/l + IAA 1 mg/lを添加した培地で25°C、暗所で培養するのが適しており、この添加培地の代わりにNAA 1.0 ppm + BA 1.0 ppmを用いたところ異常根が現われ、幼植物体の形成が1か月程度遅れたと報告している。今後は、幼植物体獲得までの時間の短縮化や幼植物を大量に養成するための培養条件、培地組成、培養部位等についてさらに解明する必要がある。

本報告では、イチゴ、サトイモのウイルスフリー株を大量増殖する技術を確認するために実験を行い、イチゴでは大量増殖技術が十分に実用化できることを確認した。サトイモは実用化に至るまでには上述したいくつかの課題が残されているが、可能性は十分にあると考えられる。

Murashige⁹⁾は、クローン繁殖の可能な植物として

125種を挙げ、そのうち59種ではカルス組織を利用している。このようなカルス組織を利用した組織培養では、培地組成の選択や培養方法の改善によって、カルス増殖やできたカルス経由の茎葉分化が自在に操作できる可能性がある。しかも、小面積の培養施設でカリクロン植物を短期間のうちに大量に増殖できる利点がある。今後、本法は栄養繁殖性作物のウイルスフリー株を大量増殖するだけでなく、遺伝的に同質な植物体を大量に獲得したり、あるいは変異個体の育種的利用などの技術として適用範囲はさらに拡大するであろう。

謝 辞

本研究の遂行に当たり、御協力いただいた野菜試験場育種第一研究室関係各位と、本報告を取りまとめるに当たり御校閲をいただいた高柳謙治育種第一研究室長に対し、深く感謝の意を表する。

摘 要

イチゴ、サトイモのウイルスフリー株を試験管内で大量増殖する方法を確立するために、培地組成、培養部位、および品種がカルス形成、茎葉分化に及ぼす影響を調べ、従来の茎頂培養技術とカリクロン植物誘導による大量増殖法を比較した。

1. イチゴの大量増殖

1) カルス形成や茎葉分化には品種間差が認められ、“宝交早生”は高率で、“ベスカ”は低率であり、“はつくに”はBA単独添加培地では高率であったが、他の添加培地では低率であった。

2) カルス形成はBA、NAA共存添加培地で促進され、基礎培地は茎葉形成や発根に適した。

3) LS基礎培地では置床した茎頂の伸長した1本の茎葉が形成されるのに対し、添加培地ではカルス形成やカリクロンの誘導が認められた。カリクロン植物の誘導にはLS基礎培地にBA 1 mg/l、またはBA 1 mg/l + NAA 0.2 mg/lあるいはBA 1 mg/l + NAA 1 mg/lを添加した培地が効果的であり、イチゴの大量増殖にはこれらの培地が適すると考えられた。

2. サトイモの大量増殖

1) サトイモのカルスはプロトコーム様カルスで、プロトコーム様カルスからの茎葉分化率は、“八つ頭”“土垂”で高く、“唐芋”は低く、品種間差が認められた。

2) カルス形成にはオーキシンとサイトカイニンが必要で、カルス形成および茎葉分化にはLS基礎培地にBA 1 mg/ℓ + NAA 1 mg/ℓ またはBA 1 mg/ℓ + NAA 0.2 mg/ℓ を添加した培地組成が最適であると考えられた。

3) 培養部位は茎頂組織が最適であったが、茎頂近傍組織を置床した場合にも比較的高率にプロトコム様カルスや茎葉分化が認められ、幼葉も可能であった。

引用文献

1. BOXUS, P. 1974. The production of strawberry plants by in vitro micropropagation. J. Hort. Sci., 49: 209 - 210.
2. JACKSON, G. V. H., E. A. BALL, & J. ARDITTI 1977. Tissue culture of taro, *Colocasia esculenta* (L.) SCHOTT. J. Hort. Sci. 52: 373 - 386.
3. 小島博文・杉浦哲也・峰岸正好 1981. 奈良県におけるアブラムシ伝播性イチゴウイルス病の発生とその防除対策. 奈良農試研報 12: 94 - 108.
4. 栗山尚志・大沢勝次 1976. サトイモの組織培養における培養部位及び培地とカルス形成・茎葉分化に関する試験. 野菜試育種部年報 3: 12 - 14.
5. 松本美枝子 1981. サトイモ (*Colocasia antiquorum* SCHOTT.) の茎頂培養. 富山農試砺波園研報 16: 37 - 47.
6. 森下正博・山田貴義 1978. サトイモの組織培養に関する研究(1)茎頂からの幼植物誘導. 大阪農技セ研報 15: 9 - 12.
7. 森寛一・浜屋悦次・下村徹・池上雍春 1969. 組織培養法によるウイルス罹病植物の無毒化. 農事試研報 13: 45 - 110.
8. MURASHIGE, T. 1974. Plant propagation through tissue cultures. Ann. Rev. Plant Physiol., 25: 135 - 166.
9. 大沢勝次 1980. 栄養繁殖性作物における無病苗の作出技術. 農および園 55: 199 - 206.
10. ———, 戸田幹彦・西 貞夫 1974. やく培養の利用に関する研究 II. イチゴやく培養によるウイルスフリー株の大量育成. 野菜試報 A I 1: 41 - 57.
11. ———, 山川邦夫・西 貞夫 1973. イチゴの組織培養に関する研究(第2報)生長点組織の脱分化・再分化によるウイルスフリー株大量増殖技術について. 昭和48年春季園芸学会発表要旨 200 - 201.
12. ———, 栗山尚志・菅原祐幸 1981. 組織培養による栄養繁殖性野菜の大量増殖と利用に関する研究 1. 植物体の大量誘導に及ぼす培養部位及び培地組成の影響. 野菜試報 A 9: 1 - 46.
13. 庄子孝一・川村邦夫・高橋 伸 1980. 園芸作物の無病苗育成・増殖に関する研究. 宮城原種苗研報 1: 1 - 51.

Summary

In order to establish the mass production system of virus-free strawberry and taro, calliclone method was compared with the traditional meristem culture. The effect of auxin and cytokinin balance, medium composition, the size and parts of culture portions (explants) and varietal differences were investigated in calliclone method, including callus induction and proliferation.

1. Strawberry

1) Varietal differences were observed in the callus induction. Callus induction reached higher level in 'Hôkôwase', lower level in 'Fragaria vesca' and intermediate in 'Hatsukuni'.

2) The callus formation was accelerated with the medium containing BA and NAA, while the medium without hormones was suitable for the shoot and root formation.

3) A single plantlet was obtained, when a meristem tissue (growing point, shoot apex) was cultured with Linsmaier and Skoog's medium as a basic medium. Proliferation from callus was observed in meristem culture with Linsmaier and Skoog's medium supplemented with auxin and cytokinin. Optimal balance of hormones for calliclone formation was BA (6-Benzyl-aminopurine) 1 mg/ℓ, BA 1 mg/ℓ + NAA (naphthalene-acetic acid) 0.2 mg/ℓ or BA 1 mg/ℓ + NAA 1 mg/ℓ, supplements depending on the cultivar.

2. Taro

1) With respect to shoot formation from callus, 'Yatsugashira' and 'Dodare' produced more protocorm-like-calluses and shoots than 'Tōnōimo'.

2) Auxin and cytokinin were required for callus induction of taro. The basic medium (LS) supplemented with BA 1 mg/ℓ + NAA 0.2 mg/ℓ was the most effective combination of these hormones in the medium for callus formation and also for shoot formation.

3) Meristem or near-meristem tissue was the most suitable portion for an explant. Young leaves were also able to induce calliclones.