

ウドの組織培養による大量増殖

山元義久*

要 約

ウドの組織培養による大量増殖法を検討し、以下の結果を得た。

- 1 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (以下2,4-Dと呼ぶ) を1.0mg/ℓ加えたカルス誘導培地を用いることにより、品種「有馬3号」, 「紫早生」, 「伊勢白」のいずれの葉切片からも、カルスを經由して不定胚を得ることができた。
- 2 カルス誘導培地に6-ベンジルアミノプリン (以下6-BAPと呼ぶ) を1.0mg/ℓ加えた培地では、カルスが褐変化するだけで再分化率は向上しなかった。また、窒素成分を中心とする培地中の無機多量要素の含有量を1~1/4濃度にして検討したところ、明確な傾向は認められなかった。
- 3 培養に供する葉位は、展開葉よりも未展開葉が適していた。さらに未展開葉でも葉身長が短い、若い葉ほど不定胚の再分化率が高かった。
- 4 カルス誘導期間は、2週間よりも4週間の方が1切片あたり多くの不定胚が形成された。

In vitro propagation of *Aralia cordata* Thunb.

Yoshihisa YAMAMOTO

Summary

Culture conditions for regeneration of somatic embryos were investigated *in vitro* in *Aralia cordata* Thunb.

- (1) Three cultivars "Arima-3-gou", "Murasaki-wase", and "Ise-shiro" were tested. Somatic embryos were regenerated on the surface of callus induced on the media with 2,4-D in all cultivars.
- (2) Addition of 6-BAP to callus induction medium resulted in browning of callus and inhibited the formation of somatic embryos. The effect of macro element concentrations from 1 to 1/4 in culture media on the formation of somatic embryos were not clear.
- (3) Upper leaves were more suitable for the formation of somatic embryos than lower leaves. Especially, leaves shorter than 8mm were better.
- (4) More somatic embryos were formed after 4 weeks of callus induction compared with 2 weeks of callus induction.

キーワード：ウド, 組織培養, 大量増殖, 不定胚

緒 言

平成4~5年頃から但東町でウドの主要品種「有馬3号」に奇形芽が多発し始めた。これは本圃での株養成時及び伏せ込み床での軟化時に現れる症状で、莖部を中心に密生する毛がなくなり、莖頂部が赤褐色になって全体に矮化する。

この症状の原因は不明であるが、当初は、何らかのウイルスに起因する可能性も考えられたことから、北部農

業技術センターと中央農業技術センターが奇形芽の原因究明にあたるのと同時にウイルス病に対する対策を検討することになった。本研究では、無症状の個体を材料とし、組織培養によって優良個体を大量に増殖することを目的に本試験を行った。

ウドの大量増殖法は、葉片カルスから不定胚を形成させることにより可能であると報告されており^{2, 5)}、品種間差があることも知られている^{3, 4)}。ところが、「有馬3号」は由来不明の品種であり、過去の文献によっても組織培養を行った場合の性質を知ることができない。そこで「有馬3号」を中心とした品種を用いて、適切な培

1996年8月30日受理

* 中央農業技術センター

地条件と培養部位を明らかにすることを目的として、本研究を行った。

材料及び方法

たじま農協但東支店ウド部会から提供された株を、生物工学研究所の温室内で維持・養成して実験に供した。品種は「有馬3号」を主に用いたが、他に対照として「紫早生」と「伊勢白」を供試した。

葉位は、全く展開していない葉を未展開葉、展開し伸長中の葉を半展開葉、伸長の終わった葉を完全展開葉とした(図1)。

温室から採取した葉は、Tween 20を数滴加えた有効塩素濃度0.5%の次亜塩素酸ナトリウム水溶液で8分間滅菌後、滅菌水で5~6回水洗した。完全展開葉及び半展開葉の葉身は5~10mm角の切片とし、未展開葉の葉身は頂部と基部を切除して、培養用の切片とした。

カルス誘導培地には、MS⁶⁾培地中に多量に含まれる成分(硝酸カリウム、硝酸アンモニウム、リン酸二水素カリウム、硫酸マグネシウム、塩化カルシウム、以下無機多量要素と呼ぶ)の濃度を1/4にした培地(pH5.7)に、2,4-Dを1.0mg/l、ショ糖を60g/l、寒天を0.9g/l加えたものを基本とし、試験目的に応じて修正を加えた。再分化培地には、MS培地(pH5.7)に、ショ糖を30g/l、寒天を0.9g/l加えたものを用いた。カルス誘導・再分化ともに25℃、16時間日長の培養室内

で行った。

不定胚から得られた小植物体(図2)は、田土とバーミキュライトを1:1に混合した用土を詰めたφ9cmの黒ポリポットに移植し、約1か月間育苗した。培養株のポット苗は、慣行法により株分けした対照株とともに1995年4月19日に温室内のベッド(幅80cm)中央に、50cm間隔に定植した(図3)。定植時には、培養株の茎の直径が数mmであったのに対して、対照株の芽の直径は約20mmであった。施肥は、成分量で10a当たり窒素を45kg、リン酸を26kg、カリウムを39kg施用した。定植した各個体は経時的に地上部の生育を調査し、冬季に地上部が枯れ上がった後、地下部を掘り上げて調査した。

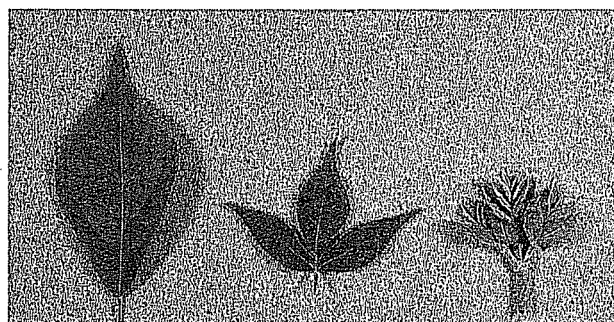


図1 培養に供したウドの各葉部
左：完全展開葉
中：半展開葉
右：未展開葉

表1 ウド葉片カルスからの不定胚形成に及ぼす6-BAP添加と葉位の影響

品 種	カルス誘導培地	葉 位	供試切片数	カルス形成 ²⁾	不定根形成率	不定胚形成率
有馬3号	2,4-D 1mg/l	完全展開	21	+++	14.3%	57.1%
		半展開	6	+++	50.0	83.3
		未展開	6	++	0.0	100.0
	+ 6-BAP 1mg/l	完全展開	24	++	100.0	0.0
		半展開	6	+	100.0	0.0
		未展開	6	+	33.3	16.7
紫早生	2,4-D 1mg/l	完全展開	18	+	100.0%	55.6%
		半展開	6	±	83.3	83.3
		未展開	6	±	100.0	100.0
	+ 6-BAP 1mg/l	完全展開	24	+	100.0	0.0
		半展開	6	+	83.3	0.0
		未展開	6	+	66.7	0.0
伊勢白	2,4-D 1mg/l	完全展開	21	++	100.0%	4.8%
		半展開	6	++	100.0	33.3
		未展開	6	++	100.0	33.3
	+ 6-BAP 1mg/l	完全展開	24	++	95.8	8.3
		半展開	6	++	66.7	16.7
		未展開	6	+	50.0	16.7

注1) 5週間カルス誘導を行った後、再分化培地に移植し、その1か月後に再分化の調査を行った。

2) ±(極わずか) ~ +++(非常に多い)

結 果

ウドの3品種「有馬3号」,「紫早生」,「伊勢白」を供試し,葉片からカルスを誘導して不定胚形成を試みたところ,形成率に品種間差はあるが,全ての品種から不定胚が形成された(表1)。カルス誘導培地に6-BAPを加えた場合,加えなかった場合よりもカルスの褐変が激しく,不定胚の形成率も低下した(表1)。

カルス誘導に供する葉位について見ると,いずれの品種でも,未展開葉由来カルスの不定胚形成率が最も高く,次いで半展開葉,完全展開葉の順になり,未熟な葉ほど不定胚形成が良好であった(表1)。さらに,未展開葉の葉身長と不定胚形成率との関係を詳細に調査すると,葉身長の短い,若い葉ほど不定胚の形成率が高くなる傾向が認められた(表2)。

培地中の無機栄養濃度の影響を知るため,MS培地中の窒素成分(硝酸カリウムと硝酸アンモニウム)濃度を1/2または1/4にした培地と無機多量要素すべてを1/2または1/4にした培地を作成し,それらをカルス誘導培地に用いて比較を行った。葉身長約1cmの未展

開葉からカルスを誘導し,不定胚を形成させたところ,明確な傾向は認められなかった(表3)。

また,ウドのカルスは培地上で成長するにつれて他の植物よりも褐変しやすい傾向がみられたため,カルス誘導期間の比較も行った。培養開始から2週間目のカルスと4週間目のカルスを比較したところ,不定胚形成率には一定の傾向がみられなかったが,切片当たりの不定胚形成数では,4週間目のカルスが多くなる傾向があった(表3)。

温室に定植した培養株と,慣行法により株分けした対

表2 未展開葉の葉身長と不定胚形成率

葉身長	供試切片数	不定胚形成率
~ 6 mm	12	91.7%
7~ 8	12	88.9
9~10	6	66.7
~11	12	50.0

注) 1994.9.9に培養を開始し,5週間後に再分化培地に移植した。その1か月後に再分化の調査を行った。

表3 ウドの不定胚形成に及ぼす多量要素組成の影響

カルス誘導培地	カルス誘導期間	供試切片数	不定胚形成率 ³⁾	不定胚形成数/切片 ⁴⁾
MS	2週間	12	58.3%	2.0
	4	12	100.0	6.4
1/2 (N) MS ¹⁾	2週間	12	66.7%	3.5
	4	13	92.3	3.4
1/2 (多) MS ²⁾	2週間	12	83.3%	3.1
	4	13	61.5	3.2
1/4 (N) MS ¹⁾	2週間	12	66.7%	2.4
	4	13	46.2	4.0
1/4 (多) MS ²⁾	2週間	12	75.0%	3.5
	4	12	91.7	4.9

注1) 硝酸カリウムと硝酸アンモニウムだけを1/2または1/4にしたMS培地

2) 無機多量要素全体を1/2または1/4にしたMS培地

3) 供試した切片のうち,不定胚を形成した切片の比率

4) 1切片から形成された不定胚数の平均値

5) 2週間または4週間カルス誘導を行った後,再分化培地に移植した。移植後1か月目から3か月目にかけて再分化状況を調査した。

表4 ウド培養株の生育

調査個体数	茎長 (cm)		草丈 (cm)		根株重 (g)	芽数 (個)	芽の直径 (cm)	
	6月30日	11月7日	6月30日	11月7日				
培養株	6	28	149	84	155	1,380	4.7	20
対照株	4	54	170	118	176	2,180	5.3	25

注) 培養株は1995年3月10日に鉢上げし,4月19日に定植した。なお,対照株も同日に定植した。

照株とを比較すると、植え付け時における双方の苗の差がきわめて大きかったにもかかわらず、生育終了時には対照株の大きさにかなり近づいた(表4)。

考 察

2,4-Dを1.0mg/l含むカルス誘導培地を用いた場合、「有馬3号」は「紫早生」と並んで高い頻度で不定胚を形成し、組織培養による大量増殖が可能な品種である。

池田ら²⁾は、展開葉を上から3枚まで調査し、上から2枚目の葉がやや不定胚形成能が高いことを報告している。本研究では、さらに完全展開葉から未展開葉まで調査し、未熟な若い葉ほど不定胚形成能が高いことが明らかになった。また、未展開葉でも葉長の短い若い葉ほど不定胚を形成しやすかったが、調整作業の手間を考慮すると、7~8mm程度の葉を用いるのが適当と考えられる。

カルス形成培地への6-BAPの添加は、不定胚形成に対して明らかに阻害的であった。カルス形成培地の無機栄養濃度の実験では明確な傾向は認められなかったが、実験に供した未展開葉の大きさを厳密に規定していなかったためと思われる。また、カルス誘導期間が2週間より4週間の方が1切片あたりの不定胚数が多かったのは、カルス形成量の差によると思われる。4週間よりもさらに長い誘導期間についても検討するべきであろう。

生育調査に用いた培養株の定植時の茎の直径が数mmしかなかったのに対して、対照の慣行株の芽の直径は約2cmであり、生育開始時の大きさは培養株の方が明らかに小さかった。生育期間の終了時には、慣行株に比較して培養苗の1年養成株はやや根株が小さいが良質の緑化ウドを生産可能な程度になっており、翌年には慣行と同程度の株生産も可能である。橋本と吉川¹⁾はVA菌根菌の利用によってウドの実生苗の生育促進が可能であると報

告している。本研究で利用した不定胚は、体細胞から発生した種子のようなものであり、実生苗と同様の方法によって1年養成株の生育促進の可能性もある。

今回の実験では突然変異個体の出現は確認されなかったが、一般に組織培養からの再分化個体には遺伝的突然変異が起こりやすいと言われている。したがって、組織培養による大量増殖で得られた個体を親株として利用する場合には変異が起こっていないかを十分に確認し、突然変異を起こしている恐れのある個体を除く必要がある。

引用文献

- (1) 橋本典久・吉川正巳(1995): VA菌根菌のウド実生苗に対する生育促進効果: 京都農研報 17, 62-63
- (2) 池田 洋・木村康夫・亀谷寿昭(1987): ウドの不定胚利用による大量増殖法の開発(第1報) 葉片由来カルスからの不定胚形成と植物体分化: 園学要旨 昭和62秋, 262-263
- (3) 池田 洋(1988): ウドの不定胚利用による大量増殖法の開発(第2報) 不定胚形成における培地条件の検討: 園学要旨 昭和63秋, 256-257
- (4) 池田 洋・山田文典(1990): ウドの不定胚形成に及ぼす温度と光条件の影響: 園学雑 59(別2), 298-299
- (5) 池田 洋・中里 博・小泉丈晴・田中伸子・山田文典・栗原則雄(1991): 不定胚から得られたウドの特性: 園学雑 60(別2), 240-241
- (6) Murashige, T. and F. Skoog(1962): A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue culture: Physiol. Plant. 15, 473-497

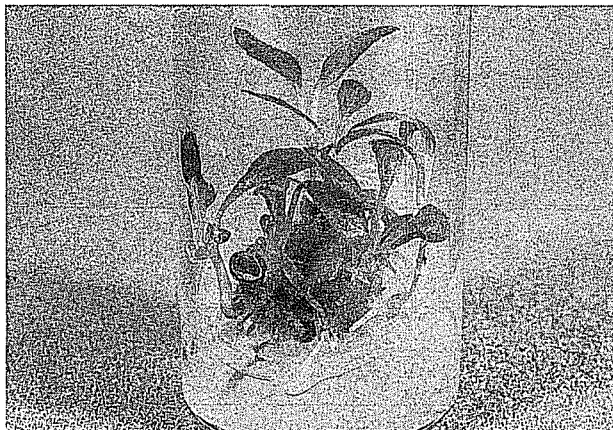


図2 カルス表面に形成された小植物体



図3 定植後1か月目のウド培養株