

組織培養によるイセイモの種苗増殖に関する研究

第3報 イセイモ多芽体の培養・順化条件と再分化植物

平野三男・森 利樹・戸谷 孝*・河野 満

資源開発部, *栽培部

要 旨

ヤマノイモ (*Dioscorea opposita* Thunb.) の地方種の一つであるイセイモについて、組織培養技術を活用した大量増殖法を開発するために、多芽体に着目し、その培養条件、順化条件、さらに培養苗由来の種芋の肥大率などを検討した。培養条件に関しては、静置培養よりも液体回転培養により多芽体増殖率が著しく向上した。また順化条件については、培養器内での通常の順化とガラス温室で噴霧かん水装置を自動間欠作動させる方法について比較検討した結果、後者の簡便性と有効性が明らかとなった。多芽体による大量増殖システムにおける、培養及び順化の過程での効率を高める点は明らかにしたが、組織培養技術を用いない芋の不定芽を利用した増殖方法等と比較し、増殖率が高いことだけではコスト面での不利をカバーすることはできない。培養苗の保存技術や本研究で得られた成果を取り入れたシステムの経営面からみた経済性、すなわち実用面での検討が必要である。

キーワード：組織培養，多芽体，液体回転培養

緒 言

イセイモはヤマノイモ (*Dioscorea opposita* Thunb.) の一種で、三重県の特産品であり、その品質や食味は市場での評価も高い。しかし、イセイモは生産された芋の1/3～1/4を翌年度の種芋として保存しなければならない。そのため組織培養技術を活用し、イセイモの優良種苗を大量増殖することは、地域における特産農産物の生産振興を図るうえで極めて効果的である。増殖率の低い作物の増殖手段として、組織培養技術を利用した種苗の大量増殖法はいくつかの作物では実用化されている¹⁰⁾。イセイモにおいても組織培養による多芽体を利用した増殖方法について既に一部報告した^{2, 3, 4, 5)}。しかし多芽体による増殖率は2～3倍程度であり、腋芽培養による挿し木を繰り返す培養方法とほぼ同程度であった。そこで組織培養技術を利用し、さらに効率的な大量増殖システムを構築するため、多芽体の増殖率の向上、これに由来する培養苗の順化、及び培養苗の変異について検

討した。なお本試験は1991年(平成3年)から1995年(同7年)まで実施された地域バイオテクノロジー実用化技術研究開発促進事業の一環として行ったものである。

材料及び方法

(1) 供試した植物

県内産イセイモ (*Dioscorea opposita* Thunb.) を種芋として農業技術センター圃場で栽培し、その茎頂培養に由来した苗を試験全般にわたって使用した。この培養苗を、腋芽を付けた1～2cmの茎切片とし、さらに培養を継続しMS寒天培地⁸⁾で継代した。

(2) 培養条件

イセイモの多芽体を培養する基本培地は、修正MS培地(NH₄NO₃, KNO₃を1/2濃度にする)に、ベンジルアデニン(BA)を5mg/l, アンシミドールを5mg/l, または10mg/l添加した培地で、また静置培養の場合には、0.2%になるようにジェルライトを添加した。培養容器は内径20mmの試験管で、培地を10mlずつ

分注した。培養室内の温度を25℃、照度を約2,000 luxに設定し、10時間照明で培養した。回転培養の場合には、培養容器を、50 ml容三角フラスコとし、培地を30 mlずつ分注した。回転速度（垂直方向）を5回転/分に設定し培養した。多芽体から植物体を再生させる場合には、多芽体を剃刀で分割し、芽を2～3個含む切片とし、静置培養条件で培養した。植物ホルモンとして、BA及びナフトレン酢酸（NAA）をそれぞれ0, 0.02, 0.2 mg/l添加した。

（3）順化条件

無菌通気膜（ミリシール：日本ミリポア社製）を貼付した培養試験管を用い、植物ホルモンとしてBAを0.02 mg/l、NAAを0.2 mg/l添加した固形培地で、予め約2週間、温度25℃、湿度80%、そして照度を2,000 luxに設定した人工気象器内で培養した苗を供試した。温度及び湿度は昼夜一定とし、明暗は14時間日長とした。ミスト利用試験区では、培養苗をパーミキュライトとピートモスの等量混合した培土（直径9 cmポリポット）に移植し、ガラス温室においた。ここでミストを2分間噴霧し、15分間休止する処理を30日間にわたって行い、1993年6月10日圃場に定植した。11月12日に芋を収穫した。対照区に用いた培養苗は、閉鎖系ガラス温室（昼温25℃、夜温20℃）で蓋付き透明容器に入れ、1週間密閉にした後、徐々に蓋を開き2週間後に蓋を全開することにより順化した。

（4）培養苗由来の種芋による生産

用いた培養苗の順化は、無菌通気膜を付けた試験管により約2週間培養し、さらに前項（3）で述べた対照区と同じ方法によった。ガラス温室内で、パーミキュライトと山砂（1：1）の混合培土を充填したプランターに定植した。以後ガラス温室内で栽培し芋を収穫した。この培養苗から得られた芋、79個を種芋（培養苗由来芋）として供試した。その平均重量は29.5 gであった。また対照にはイセイモ生産現地で得た35個（平均29.9 g）を用いた。これらを、三重県多気郡多気町内のイセイモ栽培農家の圃場で栽培した。種芋の植え付けは4月20日に行い、11月8日に収穫した。種芋の生産は1995年、現地圃場での栽培は1996年に実施した。得られた植物体について葉のモザイク症状を肉眼観察により観察した。光合成速度を光合成蒸散測定装置（島津、SPB-H4）により、1994年7月6日、同13日、8月6日に測定した。これらの測定日は晴天で、午前10時前後に、無風で、太陽光線が直射する時に測定した。また芋の粘着力を、物性測定装置（レオテック、レオメーター-NRM-2010 J-CW）により、すり下ろした直後に測定した。

結果及び考察

（1）液体回転培養による多芽体増殖の効率化

これまでの寒天等を用いた固形培地での多芽体の増殖率は数倍程度で腋芽をそのまま培養し分割増殖する場合と大差なかった^{3, 5)}。そこで多芽体の発生率を向上させ、効率的な増殖を図るため液体培養の方法について検討した。多芽体の形成に効果的³⁾であるアンシミドール、10 mg/lを添加した液体培地（修正MS培地、BAを5 mg/l含む）を用いて回転して培養した。その結果、多芽体は60日間の培養で100近い芽を形成し、寒天培養よる発生率（40日培養後、3.2倍³⁾）に比べ飛躍的に向上した（表1）。

表1 回転培養^{a)}におけるイセイモの多芽体増殖

培養日数	芽数 ^{b)}
0	1
30	30.2
40	87.7
60	95.6

a) 三角フラスコにアンシミドール、10 mg/l、BA、5 mg/lを含む修正MS液体培地で、幼植物体を5 rpmで回転培養した。

b) 茎基部に形成された多芽体の芽数。20～25個の平均値。

山本¹⁾は、SO7、PP-333等の矮化剤が培養密度を高めることに効果的であるが、育苗時まで影響が残り、生育が抑制されることを指摘している。本試験でも多芽体の誘導及び増殖において、高い濃度のベンジルアデニン、及びアンシミドールを含む培地を用いており、順化前においてこれらの生育調節剤を除去することを考慮する必要がある。

（2）ガラス温室でのミスト灌水装置を活用した順化

一般に組織培養によって得られた幼植物体は培養器内の高湿度、富栄養条件下で生育しているため、環境ストレスに弱く、培養器から外部の環境へ移植する際、急激な環境変化に適応することが困難である。そこで湿度条件の変化を少なくし、かつ簡便な方法として、ガラス温室に設置した頭上灌水装置を利用し、散水を短時間の間隔で繰り返し順化する方法を試みた。その結果、順化率は100%で、葉が枯死する等の生育阻害も見られず、慣行順化法と比較して、草丈、地上部の重量、株あたりの芋重量及び個数にも差は認められなかった（表2）。慣行順化区では試験管（寒天培養）から搬出後、容器内の湿度を徐々に低下させ乾燥ストレスをかけていくという煩瑣な手作業を要するのに対し、ミストを利用した順化区では、搬出後ビニールポットに移植するだけで密閉容

表2 温室内におけるミストを利用したイセイモ幼植物体の順化^{a)}

順化区	順化率 (%)	草丈 (cm)	地上部重 (g/株)	いもの重量 (g/株)
慣行順化区 ^{b)}	100	64.6	18.1	7.7
ミスト利用区 ^{c)}	100	73.0	15.1	8.0

a) 各区7株で3反復試験を行い、表中の数値は平均値を示した。

b) 昼間25℃夜間20℃のガラス室で順化を行う。培養苗をポリポットに移植し蓋付き透明容器に入れ、1週間密閉する。その後2週間かけて徐々に蓋を開き、全開状態で1週間順化する。

c) 通常のガラス室で順化を行う。ミストを2分間稼働させ、15分間休止、約4週間行う最初の2週間は寒冷しゃを用い約50%に遮光する。

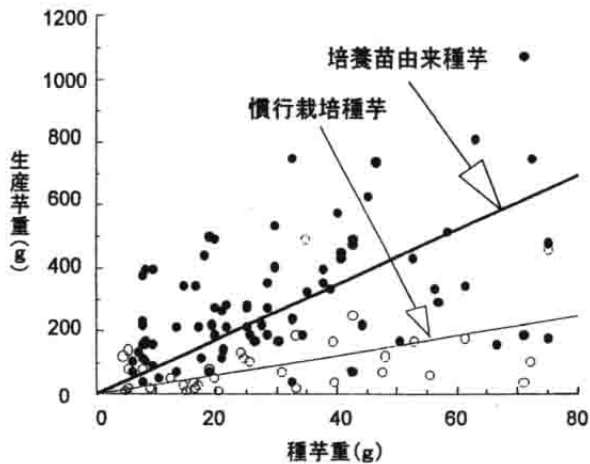


図1 培養苗に由来する種芋と慣行栽培種芋による収量比較

●: 培養苗由来種芋, 相関係数: $r=0.3143$ ($Y=8.686X$)

○: 慣行栽培種芋, 相関係数: $r=0.3699$ ($Y=3.117X$)

器を用いず、またミストによる散水はタイマー自動運転が可能であり、簡易な順化法として有効と思われる。

(3) 培養苗由来の種芋による生産

培養苗から得られた芋を種芋として県内イセイモ栽培の現地圃場で栽培し、これとほぼ同程度の重量の現地系統芋を種芋として用いた場合とを比較した。その結果、種芋に対する収穫芋の肥大率(重量)が大きくなる傾向が認められた(図1)。これは主として培養苗がウイルスフリーであることにより、肥大率が向上したものと考えられる⁴⁾。一般に植物がウイルス病にかかると茎葉にモザイク症状を示すことが知られている。イセイモの葉のモザイク症状は培養苗の葉ではほとんどみられなかったのに対し、慣行栽培の多くの葉では著しいモザイク症状が認められた(写真1)。また生理的な機能の一つとして光合成速度を比較した結果、培養苗由来の種芋からの個体の葉の方が慣行栽培種芋からのそれよりも大きかった(表3)。一方芋の品質の重要な指標の一つである芋の粘着力は、培養苗由来の芋と慣行栽培による芋との間に有意な差はみられなかった(表4)。

以上のように、イセイモの多芽体による増殖方法を基



写真1 イセイモの培養苗個体の正常葉(a)と慣行栽培でしばしば見られるモザイク症状を示す葉(b)

に大量増殖システムの開発に関する研究を行った。そして多芽体の誘導、増殖、及び植物体の再生と順化、定植苗の養成と種芋の生産を検討した結果を報告した。増殖率、芋の肥大性、及び光合成速度がより高いことだけでは、森ら⁶⁾が示唆した芋の不定芽を利用した増殖方法に比較してもコスト面での不利をカバーできていない。培養システムの実用場面での活用についてみると、培養苗、多芽体等の短期的な保存方法の解明が必要であり、また優良系統の保存の点からは長期的な保存について検討する必要がある。さらに外観観察からは培養苗の葉及び芋に顕著な変異は認められなかったが、組織培養によって

表3 イセイモの葉における見かけの光合成速度と最大葉面積^{a)}

苗	光合成速度 ($\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) ^{b)}			最大葉面積 ^{c)}
	7/6	7/13	8/6	(cm^2)
培養苗	11.13 \pm 3.02	12.43 \pm 4.79	6.17 \pm 4.44	42.99 \pm 8.96
慣行栽培苗	8.56 \pm 4.19	6.60 \pm 4.88	5.05 \pm 5.62	22.63 \pm 7.80

a) 株の最も高い位置を中心にして無作為に選択した50枚の平均値。

b) 測定装置：島津社製 SPB-H4

測定日：1994年7月6日，13日，8月6日。いずれも晴天で，午前10時前後に，測定葉に太陽光線が直射した無風時に測定した。

c) 画像解析装置（オリンパス SP-500）を用い，同8月6日に測定した。

表4 播り下ろした直後，イセイモの粘着力

供試いも ^{a)}	粘着力 (g/cm) ^{b)}
培養苗由来	122.5 \pm 20.3
現地慣行栽培	141.2 \pm 35.7

a) 収穫50日後のそれぞれのいもを5個ずつ用いた。

b) 物性測定器のアダプター：粘ちょう度用

速度：30 $\text{cm}/\text{min.}$ ，最大加速：2 kg で測定した。

生産した培養苗を用いて栽培を行うと植物体に形態，成分，遺伝子レベルにおける変異が発生しやすいことがしばしば指摘されており^{1), 7), 9)}，イセイモの組織培養による増殖においてもこれらの細胞，遺伝子レベルでの変異が生じるか否か今後の検討が必要である。

引用文献

- 1) 阿部利徳，笹原健夫（1996）：イネ組織培養による欠失変異の解析，育種，46（別冊1），329.
- 2) 橋爪不二夫，平野三男（1995）：ワイルドライスのカルスの懸濁培養系による増殖と植物体の効率的な再分化，三重農技研報，23，1-7.
- 3) 服部英樹，平野三男（1995）：組織培養によるイセイモの種苗増殖に関する研究（第2報）多芽体の効率的増殖及び植物体の再生方法，三重農技研報，23，9-14.
- 4) 平野三男，立松伸夫，服部英樹，橋爪不二夫，河野満（1992）：イセイモのウイルスフリー苗の作出に関する研究（第1報）茎頂培養による植物体再生及び種芋の形成，三重農技研報，20，17-21.
- 5) 平野三男，立松伸夫，服部英樹，橋爪不二夫，河野満（1993）：組織培養によるイセイモ及びワイルドライスの種苗増殖に関する研究（第1報）イセイモ多芽体及びワイルドライス胚様体の作出，三重農技研報，21，41-50.
- 6) 森利樹，庄下正昭，西口郁夫（1993）：ヤマノイモ属栽培種‘イセイモ’における効率的増殖方法に関する研究，三重農技研報，21，33-39.
- 7) 森下正博，山田貴義（1981）：フキの組織培養株の形質変異について，大阪農技研報，18，9-18.
- 8) Murashige, T. and F. Skoog (1962) : A revised medium for rapid growth bioassays with tobacco tissue culture, *Physiol. Plant*, 15, 473-497.
- 9) 中村和弘，青木千佳，服部一三，逢原雄三（1992）：イネ薬培養再分化個体後代のアイソザイム分析，育種，42（別冊2），94-95.
- 10) 大澤勝次（1988）：組織培養による種苗の増殖（1），農業及び園芸，63，92-96.
- 11) 山本雄慈（1995）：組織培養によるサトイモ種苗生産技術の確立とその栽培に関する生理生態学的研究，山口農試特別研報，32，1-54.

Studies of Micro-Propagation of Chinese Yam,
Ise-imo (*Dioscorea opposita* Thunb) by Tissue Culture 3.
On the Induction of Multiple-bud and Acclimatization of Plantlets

Mitsuo HIRANO, Toshiki MORI, Takashi TOYA* and Mitsuru KOHNO

Abstract

Multiple buds were induced on the basal part of stem of Ise-imo plantlet raised from shoot-apex (virus free), when cultured on MS liquid medium containing 10mg/ℓ ancymidol and 5 mg/ℓ BA by shaking at 5 rpm. About one hundred buds were formed on the basal part of the stem by two months culture. Plant regeneration from multiple buds was efficiently enhanced on MS solid medium containing 0.5 mg/ℓ BA 40 days after incubation. The regenerated plantlets grew vigorously when transferred onto MS medium in a test tube covered with a mili-seal® lid. If regenerated plantlets were grown under artificial intermittent precipitation in a glass house, the acclimatization became more easy and efficient in operation. When plantlets were acclimatized on April and transplanted to the field on early May, they grew vigorously and produced about 20g of tuber (rhizophore) of Ise-imo for each plant on November. The weight of tubers (rhizo) at the harvest was heavier than those of transplanted plantlets on the other month except April. Clearly, the seed tubers of Ise-imo derived from cultured plantlet produced higher yields as compared with native strains which have been raised from ancient time. The mosaic symptoms on leaves were not observed in plants originated from cultured plantlet.

Key words : micropropagation, multiple-bud, Rotatory culture