

組織培養による‘秦莊ヤマノイモ’の優良苗生産に関する研究(第1報)

組織培養と挿し木法併用による大量増殖法の開発

渡辺 健三・宇野 弘子^{*}・豊岡 幸二^{**}

Studies on the Masspropagation of ‘Hatashoyamanoimo’ by Tissue Culture

(1) Development of Masspropagation Method of Chinese Yam by Combination of the Tissue Culture and Cutting

Kenzo WATANABE, Hiroko UNO and Kōji TOYOOKA

組織培養と挿し木法を併用することにより、むかごが発生しにくい‘秦莊ヤマノイモ’の優良種苗の大量増殖法を開発した。茎頂培養と節培養を用いることで1年間に1茎頂から約7,000本の優良種苗が得られる。得られた種苗から種いもを生産し、その種いもを母株に用い、出芽した各節を挿し木することにより、1株から約100本の優良な種苗が得られた。これより組織培養と挿し木法を組み合わせた方法は、むかごが発生しにくい‘秦莊ヤマノイモ’の簡易な増殖法と考えられた。

1. 緒 言

ヤマノイモ (*Dioscorea opposita* THUNB.) は、ヤマノイモ科に属する7倍体で、いもの形態により‘ナガイモ’‘イチョウイモ’‘ヤマトイモ’の3群に分けられている。ところで、滋賀県秦荘町には古くからイチョウイモ群に属する⁹⁾ヤマノイモが地域特産物として栽培されているが、むかごが発生しにくいいため、その繁殖は親いもの分割によっている。このため形状の乱れやウイルス病が多発し、優良種苗の大量増殖法の検討が強く望まれている。

一方、植物組織培養技術の進歩にともない、栄養繁殖性野菜種苗の大量増殖法の研究成果が多く報告され、⁷⁾一部の野菜では、すでに実用化されている。ヤマノイモの中でもナガイモについては、組織培養により母株を増殖し、^{3), 6), 8)}母株に着生するむかごを有効に利用する方法で種苗増殖の実用化が図られている。また、むかごの得にくいヤマトイモについては、組織培養のみでは増殖に限界があり、組織培養と挿し木法を組み合わせた簡易な増殖法が検討されその成果が報告されて

いる。¹⁰⁾

本報では、イチョウイモ群に属する‘秦莊ヤマノイモ’の優良種苗の大量増殖を目的に組織培養法および挿し木法について検討した。

2. 材料および方法

2.1 茎頂培養におけるホルモンの影響

滋賀県秦荘町の在来株から優良な系統のいもを選抜し、このいもを当場の無加温温室内で栽培した。5月1日に植付を行い、7月20日にその節を採取し、節の上下3cmを切り取り調整したものを培養材料として供試した。材料の表面殺菌は75%エチルアルコールに10秒間浸漬した後、1%次亜塩素酸ナトリウム溶液に10分間浸漬し、次いで、滅菌水で3回洗浄した。培養はまず各節につく側芽の茎頂部位を無菌的に摘出して、その生長点に第1および第2葉原基を付けた直径0.3~0.5mmの大きさの切片を用いた。培地はMurashige & Skoogの処方⁵⁾(以下MS培地と略す)を1/2に希釈したものにしょ糖を30g/l添加し、基本培地とし

* 滋賀県蒲生市神崎西部地区農業改良普及所

** 滋賀県農林部農産普及課

て用いた。ホルモン処理は表1に示した6-ベンジルアミノプリン(以下BAと略す)と2,4-ジクロロフェノキシ酢酸(以下NAAと略す)の9組合せとし、基本培地に添加し、いずれの培地もPH5.8に調整した。培地に寒天を8g/l加え湯煎上で加温溶解した後、平底試験管に10mlずつ分注、121℃、1.2kg/cm²で15分間蒸気殺菌した。

なお、培養は、試験管を静置して、25℃、5,000~6,000 lux(白色蛍光灯)16時間の日長条件下で、1区当たり20本の試験管を供試した。

摘出した茎頂を平底試験管当り1茎頂置床し、培養後30日目および45日目に茎頂から伸長した茎の節数を調査した。

2.2 節培養における培地形態の影響

茎頂培養により伸長した個体の節を用いて節培養を行った。節培養には各節を基点に上下5mmで切り離し、平底試験管当り1節を置床した。

培地は、1/2MSにしょ糖30g/l、BA0.02mg/l添加し、PH5.8に調整したものを液体培地はそのまま、固体培地は寒天を8g/l加え湯煎上で加熱溶解した後、前記2.1の方法で分注、滅菌した。

培養方法は静置するものと回転するものに分け、回転は2~3RPMで行った。

なお、供試試験管数は1区当たり50本を供試し、培養条件は2.1の方法で行い、培養後16日目および30日目に置床した節の側芽から伸長した茎の節数を調査した。

2.3 節培養におけるホルモンの影響

節の置床は2.2の方法で行った。

培地は1/2MSにしょ糖を30g/l添加し、基本培地とした。ホルモン処理はBAとNAAの25組合せとし、基本培地に添加し、PH5.8に調整した後2.1の方法で分注、滅菌した。

培養は、培地を静置して、30℃、5,000~6,000lux(白色蛍光灯)16時間の日長で行った。

供試試験管数は1区当たり10本とした。

培養30日目に置床した節の側芽から伸長した茎の節数および出芽数を調査した。

2.4 節培養における培養温度の影響

節の置床は、2.2の方法で行った。

培地は、1/2MSにしょ糖30g/l、BA0.02mg/lおよびNAA0.002mg/l添加し、PH5.8に調整した後2.1の方法で分注、滅菌した。

培養方法は、液体培地を静置して行った。

培養温度は、20℃、25℃、30℃および33℃の4段階に設定した。その他の培養条件は5,000~6,000lux(白色蛍光灯)、16時間の日長とした。

供試試験管数は1区当たり50本とした。

培養後15日目および30日目に置床した節の側芽から伸長した茎の節数を調査した。

2.5 挿し木時期が発根率およびその後の生育に及ぼす影響

組織培養から得た種いもを、1989年4月1日に直径30cmの植木鉢に植付け、無加温温室内で栽培した。なお、採穂数比較のため、秦荘町の優良種いもも同様に栽培した。採穂、挿し木は6月1日、7月2日および8月1日に行った。

挿し木床は縦30cm、横60cm、深さ10cmの育苗箱を用い、下層5cmに畑土を、その上2cmに川砂を充填した。挿し穂は展開葉2枚を付け、節の上下3cmで切断して、株間3cm、条間10cm間隔に節が砂に埋まる深さに挿し木した。挿し木後、2週間は育苗箱の上部をポリエチレンフィルムで覆い、さらにその上を黒寒冷沙で覆った。2週間後、被覆資材をすべて取り外し、そのまま無加温温室内で栽培した。

採穂数については、挿し木当日に種いも別に伸長した茎の本葉展開節数を調査した。

発根率調査及び生育調査とも、供試本数は6月1日は1区当たり50本、7月以降は1区当たり各100本用いた。

挿し木後30日目に発根率を、本葉落葉後に塊茎重量を調査した。

3. 結 果

3.1 茎頂培養におけるホルモンの影響

結果を表1に示した。

ホルモンの添加効果は明かで、無添加では、茎葉は伸長しなかったが、BAの濃度が0~0.1mg/lの範囲では、BAを0.01mg/l添加することで、NAA無添加でも茎葉は伸長した。また、NAAを0.1mg/l添加す

ればBA無添加でも茎葉は伸長した。

一方、NAAの濃度が0~0.01mg/lの範囲では葉は正常に展開したが、0.1mg/l区では萎縮する葉が認められた。また、NAA0.1mg/l区はBAの濃度に関係なく、培養30日目以後には発根し、カルスを形成するものが認められた。

表1. 茎頂培養におけるホルモンの添加が茎葉の伸長に及ぼす影響

BA mg/l	培養日数	NAA mg/l		
		0	0.01	0.1
0	30	0	0	0.2
	45	0	0	0.7
0.01	30	0.4	0	0.5
	45	0.6	0	1.0
0.1	30	1.1	1.3	0.9
	45	1.8	1.5	1.1

注：単位 置床した茎頂から伸長した茎の節数
供試数：1区20本

3.2 節培養における培地形態の影響

結果を表2に示した。

植物体の生長速度は液体培地を用いたほうが固体培地を用いた場合より早かった。特に液体培地を用いて静置培養を行うと、固体培地に比べ培養後16日目で約2倍、30日目で約4倍の節数が得られた。

表2. 節培養における培地形態が茎葉の伸長に及ぼす影響

培地形態	培養日数	
	16日	30日
液体静置	2.3	4.1
液体回転	1.7	2.7
固体静置	1.1	1.1

注：単位 置床した節から伸長した茎の節数
供試数：1区50本

3.3 節培養におけるホルモンの影響

結果を表3に示した。

BA 0~0.1mg/lの範囲では、NAAの濃度に関係なく、BA濃度が高いほど多くの節と出芽を促す効果が認められた。

一方、NAAの濃度が0~0.05mg/lの範囲では、NAAの濃度が高くなる程展開する葉の厚みが増し、萎縮した異常葉の出現が多く認められた。また、濃度が0.1mg/lになるとこの傾向はさらに顕著に現れ、伸長する茎まで萎縮するものが認められた。

表3. 節培養におけるホルモンの添加が茎葉の伸長に及ぼす影響

BA mg/l	NAA mg/l				
	0	0.005	0.01	0.05	0.1
0	1.2	1.4	1.2	0.8	0.6
	0.4	0.6	0.8	0.2	0.4
0.005	2.6	5.8	5.8	2.0	0.8
	1.2	3.6	3.6	1.6	0.6
0.01	4.8	3.6	3.8	1.8	0
	1.4	2.6	2.6	1.2	0
0.05	6.6	3.0	3.0	6.8	1.6
	1.6	1.2	1.2	1.2	0.4
0.1	5.4	7.4	7.4	5.2	4.4
	3.2	1.8	1.8	2.2	0.6

注：単位 上段は置床した節から伸長した茎の節数、
下段は置床した節からの出芽数
供試数：1区10本

3.4 節培養における培養温度の影響

結果を表4に示した。

置床した節から伸長した茎の節数は、培養温度30℃区で最も多く、培養後30日目では、5.3の節数が認められた。また茎の徒長は見られなかった。なお、培養温度33℃区の節数は、25℃区と変わらないものの茎が著しく徒長した。

表4. 節培養における培養温度が茎葉の伸長に及ぼす影響

温 度	培 養 日 数	
	16日	30日
20℃	1.1	2.2
25℃	2.3	4.5
30℃	3.1	5.3
33℃	2.5	4.7

注：単位 置床した節から伸長した茎の節数
供試数：1区50本

3.5 挿し木時期が発根率およびその後の生育に及ぼす影響

結果を表5および表6に示した。

組織培養由来の種いもは在来の種いもと比べ出芽時期が25日早く、7月2日時点では、本葉展開節数は在来株と比べ2.6倍であった。

一方、挿し木時期の相違により、発根率および塊茎数に影響が認められ、6月1日に挿し木を行った区は20%の発根率であったが、7月および8月に挿し木を行った区は50%以上の発根率を示した。

また、7月に挿し木を行った区から収穫した塊茎は1g以上のものが全体の30%以上占めたのに対し、8月に挿し木を行った区では16%であった。

表5. 組織培養由来株及び在来株の時期別本葉展開節数

	調 査 月 日			出 芽 月 日
	6月1日	7月2日	8月1日	
組織培養由来株	51	224	342	4月20日
在 来 株	0	86	370	5月14日

表6. 挿し木の時期が発根率及びその後の生育に及ぼす影響

挿 し 木 月 日	発 根 率 (%)	塊 茎 数 (個)	重 さ 別 塊 茎 数 の 割 合 (%)		
			1g以下	1~3g	3g以上
6月1日	20.0	—	—	—	—
7月2日	55.0	92	68.5	22.8	8.7
8月1日	51.0	112	83.9	9.8	6.3

注：—は調査せず

供試数：6月は1区50本、7月および8月は1区100本

4. 考 察

イチョウイモ群の中でもむかごのできにくい‘秦荘ヤマノイモ’を用い組織培養による種苗の大量増殖法を検討した。

組織培養を用いた増殖の効率は、供試植物1個体から採取出来る節数によって決定されるため、大量増殖を図るには出来るだけ多くの茎葉が得られる条件の設定が必要である。

茎頂培養におけるホルモンの添加効果は顕著に認め

られ、ホルモン無添加では茎葉は伸長しなかったが、BAを0.01mg/l添加すればNAAを添加しなくても茎葉は伸長した。また、NAAを0.1mg/l添加すればBA無添加でも茎葉は伸長した。庭田⁶⁾らはナガイモで、茎頂組織の培養にサイトカイニンおよびオーキシンの共存が必要としているが、‘秦荘ヤマノイモ’ではホルモン濃度によっては、必ずしも両ホルモンの共存が必要ではなかった。ただ、Araki¹⁾らがナガイモで報告しているように、NAA濃度が高くなるほど、茎頂

がカルス化する傾向が '秦荘ヤマノイモ' でも認められたことから、茎頂組織から正常な茎葉を得るには、サイトカイニンとオーキシンの共存が必要と考えられる。その場合は、BA0.1mg/l+NAA 0~0.01mg/lが最適と考えられた。

節間が伸長しやすい植物の大量増殖には、節培養がよく利用されている。節培養は生長が緩慢なヤマノイモにとっては、カルスを経由することがないので変異の心配がなく種苗の大量増殖に適している。節培養における培地形態の影響を検討した結果、液体培地は個体培地に比べ培養後30日目で約4倍の節数が得られた。これは液体培地の方が、培養植物体に新鮮な培地が直接接する部分が多いためと考えられる。また、ヤマノイモのように蔓性植物で茎葉伸長の促進を目指す場合は、回転培養より静置培養により極性を保った方が良いと考えられた。

一方、節培養におけるホルモンは、ホルモン無添加でも出芽や茎葉の伸長は認められた。しかし、出芽数や伸長した茎葉の正常な伸長はBA0.05mg/l~0.1mg/l+NAA 0~0.005mg/lが最適と考えられた。

節培養における培養温度の影響を検討した結果、茎葉の伸長には、30℃が最も適した。松原⁴⁾らはヤマトイモ群のツクネイモで同様の検討をした結果、20℃~30℃の範囲では、温度による差は認めていない。しかし、松原らの試験では培養期間が90日と長く、30℃ではその間枯死葉が多くであったこと、また、培養初期では高温区ほど初期生育が早かったと報告していることから考えると、培養期間が30日と短い筆者らの試験結果と違いはないと考えられる。

挿し木時期が発根率およびその後の生育に及ぼす影響を検討した結果、組織培養由来の種いもは出芽も早く、生育が旺盛であった。また、挿し木時期が早いほど得られる塊茎も大きかった。これらのことから、挿し木用母株には、組織培養由来の種いもを用いるのが最適と考えられた。

'秦荘ヤマノイモ' を茎頂培養、節培養により試験管内で増殖しようとした場合は、発根と馴化の時期を考慮しても、30日~45日で1回分割出来ることから年間5回の分割増殖が可能となり、1回の平均分割数が6節であるため、 $6^5=7,576$ の種苗が1茎頂から得られることになる。さらに、この種苗から種いもを生産し、その種いもを母株に用い、出芽した各節を挿し木することにより、約50%が発根し、1株から約100本の

種苗が得られた。今後いっそうの大量増殖の効率化を図るためには、発根率をさらに高める方法を検討する必要がある。

以上の結果、組織培養と挿し木法を組み合わせた方法はむかごが発生しにくい '秦荘ヤマノイモ' の簡易な増殖法と考えられた。

今後は、これらの方法から得られた種苗を用い、優良なものが生産できるかどうか検討する必要がある。

引用文献

- 1) Araki, H., Ling Shi and T. Yakuwa: Effects of Auxin, Cytokinin and Nitrogen Concentration on Morphogenesis of Tissue-cultured Shoot Apex of Chinese Yam (*Dioscorea opposita* Thunb). J. Japan. Soc. Hort. Sci. 60(4): 851-857, 1992
- 2) 浜田守彦、細木正志、草開康弘: 節培養によるヤーコンの大量増殖. 植物組織培養 7 (1), 35-37, 1990
- 3) 石川悦郎、沢恩: ナガイモの茎頂培養について. 日作東北支部報19, 125-126, 1976
- 4) 松原幸子、大森誉一、小正富知美、高田裕子: ツクネイモの in vitro 培養での小イモの着生. 園学雑61, 別2, 814, 1992
- 5) Murashige, T., F. Skoog. Physiol. Plant 15, 473-497, 1962
- 6) 庭田英子、福士協二、松中謙次郎: ナガイモのメリクロンの増殖. 東北農業研究33, 255-256, 1983
- 7) 大澤勝次、栗山尚志、菅原祐幸: 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. 野菜試験場報告A9, 23-30, 1981
- 8) 奥山功、八鍬利郎、原田隆: 園芸植物のウィルスフリー株育成に関する研究 (第5報), ナガイモにおける茎頂培養ならびに種子の形成について. 北海道園芸談話会報 6, 30-31, 1973
- 9) 高柳謙治、西田宏、大澤勝次: 主成分分析によるヤマイモ品種・系統の特性解析. 野菜試験場育種部研究年報11, 136-144, 1984
- 10) 吉秋斎、山辺守: ツクネイモ優良種苗の大量増殖. 園学雑59, 別1, 726, 1990

Summary

We developed a masspropagation method of "Hatasoyamanoimo", from which it is hard to obtain brood buds, by combination of the tissue culture and cuttings.

About 7,000 plants can be obtained in a year from single shoot apex by the shoot apex culture and the node culture. From these plants, we could get seed tubers in a year, and we used them as mother plants. About 100 plants could be obtained from single mother plant by cutting of each budding mother plant node.

Thus, combination of the tissue culture and cuttings is thought to be the easiest and effective masspropagation method of "Hatasoyamanoimo".