

組織培養による優良固体の増殖技術の開発

— 組織培養による山菜の大量増殖試験 —

(県単課題 平成元年～平成5年度)

研究員 穴戸 一 浩

林産部長 青野 茂

研究員 白田 康之

(現：いわき林業事務所 改良普及技師)

要 旨：

増殖を試みたシオデ、モミジガサ、ゼンマイについて、苗の大量増殖方法として得られた知見をまとめると以下の通りであった。

1. シオデの茎頂培養による増殖では、BAを添加したMS培地でよく早生分枝化し、最も増殖率が大きかったのはBA 0.7 mg/1添加した区であった。また増殖中に一部でプロトコーム状球体の形成が見られた。BAとNAAを混用したMS培地の場合、プロトコーム状球体の出現や茎葉の再分化が最もよく見られ、増殖率が最大となったのは、BA 0.2 - NAA 0.2 mg/1添加した区であった。

馴化苗の作成について、発根操作としてMS培地に加える植物ホルモンは、NAAの場合 0.5 mg/1以上、IBAの場合 1.5 mg/1以上の添加濃度が適していた。また、このとき根長は1 cmより2 cmの方が活着率が高く、根茎を充分生長させて鉢上げすることで、馴化率を向上させることが示された。

2. モミジガサの茎頂培養による増殖では、White培地よりMS培地が適しており、添加する植物ホルモンについては、BA 0.2～0.5 mg/1、NAA 0～0.02 mg/1の濃度範囲での組み合わせで増殖率が良好となった。

またモミジガサ葉組織の培養では、カルス化は比較的容易に起こったが再生してきた個体数は少なかった。増殖に利用するにはさらに検討を要すると思われた。

3. ゼンマイの前葉体の培養では、基本培地としてMS培地よりハイポネックス培地の方が適していた。MS培地の改変では有機成分を含まない方が成長がよかった。また培地についてはpH 6.5、サッカロース添加濃度10 g/1が適していた。培地に添加する植物ホルモンについてはBAよりもNAAまたは2-4, Dで増殖が促進され、その添加濃度は0.01～1.0 mg/1程度であった。

また、前葉体から再生してきた幼植物体については、ハイポネックス培地での増殖が可能であると思われた。

I はじめに

最近、自然食品や健康食品ブームで山菜が見直され、また季節感のある食材として、その需要は増加している。しかし採取可能な地域の天然資源量は乱獲などにより減少の傾向にあり、また採集の労力などの問題から、近年栽培の試みが各地で行われるようになった。栽培化にあたっての重要な問題

として種苗の確保が挙げられるが、野生植物である山菜類は増殖が難しいものが多く、苗の確保が困難なものが少なくない。あるいは、栽培特性の優れた優良系統が見いだされたときなど、短期間に大量の苗を育苗する必要が生じると考えられる。そこで消費が期待でき、かつ県内の林地における栽培が可能と思われる山菜について、組織培養による増殖を行い、山菜苗の大量増殖について検討した。この研究では対象品目をシオデ、モミジガサ、ゼンマイとした。

シオデ (*Smilax riparia* A. DC) は山菜の王様と言われ、日本各地及び台湾、朝鮮、フィリピンの温帯に分布し、原野や林縁に生えるユリ科シオデ属のつる性多年草である。葉柄基部に巻きひげがあり、他の植物にからみついて伸長する。雌雄異株で、若芽部分が山菜として食用にされる。モミジガサ (*Cacalia delphinifolia* Sieb. et Zucc) は固有の香りと苦みがあって人気があり、特に東北地方では代表的な山菜の一つである。キク科コウモリソウ属の多年草で日本各地の低山から高山帯までに分布し、自生地は夏期冷涼で湿気のある林内などである。食用にされるのは萌芽したばかりの葉が充分開く前の若芽部分である。またゼンマイ (*Osmunda japonica* Thunb.) は、知らぬ人のいないほどの山菜の代表格で、干したものは古くから保存食として利用されてきた。日本全土の山地や原野に分布するゼンマイ科ゼンマイ属の多年草で、特に積雪の多い地方に大型で良品質のものが自生する。食用となるのは若芽状の新葉であるが、裸葉と実葉(胞子葉)の2種の葉があり、利用するのは裸葉のみである。これら3種はいずれも山菜としての人気が高く、また各地で栽培化の取り組みがあるなど、増殖の必要性も高まっている。

II 組織培養によるシオデの大量増殖方法の検討

1 実験方法

(1) BA濃度別増殖試験

MS (Murashige-Skoog) 培地を基本培地とし植物ホルモン(植物成長調節物質)としてBA(ベンジルアデニン)を濃度別に添加して増殖率を調査した。培地にはサッカロース30g/lを加え、pH 5.6~5.8に調整した。またゲル化剤として寒天9g/lを添加した。BAの添加濃度を、0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.7、1.0mg/lの8段階に設定した。培養容器は500mlガラスビンを用い、各培地を50mlずつ分注し、高圧滅菌を行った。

これに継代培養しておいたシオデ茎葉体から、茎頂を含むシュート先端部分1cm程度を切り取り移植した。材料のシオデは、当場内自生株から収集した系統を使用した。シオデの殺菌は比較的容易で、若芽など成長の良好な部分を採取し、まず葉などの余分なものを全て除去し、先端部及び各節(葉柄基部)の腋芽部分を、茎を含めて5~10mm程度に切り分ける。ついでエタノール(70%)で5秒、アンチホルミン(次亜塩素酸ナトリウム)の10倍希釈液(有効塩素1%程度)で約1分間殺菌処理し、滅菌水で水洗し薬品を落とす。その後無菌的に生長点を含む組織を2~3mmの大きさに切り出し培地に植え付けた。実験に用いたのは基本的には1/2MS培地にBA 0.2mg/lとNAA 0.2mg/lを添加したもので継代培養を行い増殖したものである。供試個数は各区10個とし、培養は23±1℃、照度2000~3000lux、16時間照明で行った。

調査は20日目から以後10日間毎に60日目まで行い、シュート数から増殖率を求めた。

(2) BA・NAA混用増殖試験

MS培地を基本培地とし、BAとNAA (α -ナフトレン酢酸)を濃度別に添加して誘導された植物体の形態及び増殖率を調べた。それぞれの添加濃度を0、0.05、0.2、1.0、2.0 mg/1の5段階とし、これを組み合わせた25通りの培地を作成した。容器は200 ml培養フラスコを用い、各培地は50mlずつ分注した。

これに継代培養しておいたシオデ茎葉体から、顕微鏡下で茎頂もしくは腋芽の生長点を取り出し移植した。供試個数は各個10個とし、培養は試験(1)と同じく培養室内で行い、60日目に継代を行った。調査は移植から100日後に、植物体の形態を調べた。

(3) オーキシン濃度別発根試験

MS培地を基本培地とし、NAAもしくはIBA (インドール酪酸)を濃度別に添加して発根率を調査した。添加濃度はどちらも0、0.02、0.05、0.1、0.5、1.0、1.5、2.0 mg/1の8段階とした。容器は200 ml培養フラスコを用い、各培地を50ml分注した。

これに継代培養しておいたシオデ茎葉体から、茎頂を含むシュート先端部分1~2 cm程度を切り取り移植した。供試個数は各区15個とし、培養は試験(1)と同じく培養室内で行った。調査は移植から40日後に、発根状態を調査した。

(4) 発根程度別土壌馴化試験

組織培養によって増殖したシオデ幼苗の馴化について、効率の良い条件を見いだすため、発根した根の長さ別の馴化率を調べるため、2つの試験を行った。

試験①：試験区は、シオデ幼苗を発根培地で1 cm程度に発根させたものと、これらをさらにホルモンフリーの培地に植え替えて2 cmまで根を伸長させたものの2種類とした。供試数は1 cm区は100ポット、2 cm区は30ポットとし、馴化室内で管理した。調査は馴化苗の新葉が1~2枚展開した時点で行い、活着したかどうか判断した。

試験②：培養しているシオデ幼苗を、発根培地を用いず直接馴化ポットに挿し付けて馴化苗の作成を行った。培養しておいたシオデ幼苗を分割し、発根促進処理としてNAA希釈液 (10mg/1) に1時間浸せきしたものと、無処理のもの、それぞれ17個とした。ポットに移植後①と同様馴化室内で管理し、2カ月後に発根の有無を調べた。

(5) 分割程度別の発根・馴化調査

増殖した培養組織を分割して発根培地に移し、さらに馴化ポットに移植するまでの期間に、シオデはある程度の増殖をし茎葉数を増加する。また、分割する際の大きさにより馴化率が変化することも考えられる。そこで発根培地に移植する際の分割の大きさによって、その後の発根率や馴化率がどのように変化するのかについて調査した。

使用する発根培地は1/2 MS培地にNAA 0.2 mg/1添加したものと、シオデはあらかじめ継代培養により増殖したものをを用いた。増殖し多数のシュートを持つシオデ培養組織から、シュート長2~3 cm程度のものについて、シュート1本毎に分割したものと、シュート数4ないし5 (平均4.5) 毎に分割したものに分け、それぞれ発根培地に差しつけた。調査は120日後に行い、発根率と増殖したシュート数を調べた。また、発根したものは馴化ポットに移植し、馴化室内において60日後に活

着率を調べた。

2 結果と考察

(1) BA濃度別増殖試験

BA単独添加時の増殖率の調査結果は表-1の通りである。ホルモンフリーでは枯死はなかったもののほとんど増殖しなかった。最も増殖率が大きかったのはBA 0.7 mg/1区であった。また、一部にカルスとは違う細胞塊が多く形成された。この増殖体は多芽体に似ているが、いくつかの小さな球状の細胞塊が集まって大きな細胞塊を形成しているものが多く見られた。この細胞塊は、ある程度の大きさになると小球状の組織として容易に分離することができた。またこの細胞塊から茎葉体が再生されているものも多く見られた。これらのことからこの小球状の細胞塊はプロトーム状球体(PLB)であると思われる。

表-1 BA濃度別増殖試験

BA濃度 (mg/1)	増殖率				
	20日後	30日後	40日後	50日後	60日後
0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
0.1	1.4	1.4	1.8	2.0	2.0
0.2	1.4	1.6	1.6	1.6	1.6
0.3	2.6	2.8	2.8	2.8	2.8
0.4	2.4	2.6	2.6	2.6	2.8
0.5	2.0	2.2	2.2	2.4	2.4
0.7	2.0	2.8	3.2	3.6	3.8
1.0	2.0	2.4	2.6	2.6	3.2

(2) BA・NAA混用増殖試験

BAとNAAの混用の場合、各培地で出現した培養形態は表-2のとおりであった。25通りの組み合わせのなかでは、13、17、23区などでPLBの出現が多く見られ、うち分枝の割合が高く生長が最も良かったのは13区であった。BA無添加の条件で培養すると枯死する割合が高く、BA単独の添加時と同様にBA濃度が高くなるにつれ早生分枝の成長の度合いは高くなっている。ただしBA 2.0 mg/1になると生育が若干悪くなっている。これに対してNAAはBAの濃度が低いときには

表-2 BA・NAA混用増殖試験

試験区 No	BA (mg/1)	NAA (mg/1)	生長量	培養形態 (個)		
1	0	0	-	無変化	2	枯死 8
2	0	0.02	-	発根	9	無変化 1
3	0	0.2	-	発根	8	無変化 2
4	0	2.0	-	発根	3	枯死 6
5	0	4.0	-	発根	3	枯死 7
6	0.02	0	+	早生分枝	5	無変化 5
7	0.02	0.02	++	早生分枝	2	プロトコーム 7
8	0.02	0.2	+	発根	2	プロトコーム 6
9	0.02	2.0	+	発根	5	プロトコーム 7
10	0.02	4.0	+	発根	8	プロトコーム 2
11	0.2	0	++	早生分枝	3	プロトコーム 3
12	0.2	0.02	++	早生分枝	5	プロトコーム 8
13	0.2	0.2	+++	早生分枝	7	プロトコーム 8
14	0.2	2.0	+	カルス	3	プロトコーム 7
15	0.2	4.0	+	カルス	4	プロトコーム 6
16	2.0	0	++	早生分枝	3	プロトコーム 7
17	2.0	0.02	+	早生分枝	4	プロトコーム 10
18	2.0	0.2	+	カルス	4	プロトコーム 5
19	2.0	2.0	+	カルス	9	無変化 1
20	2.0	4.0	-	カルス	4	無変化 6
21	4.0	0	+	プロトコーム	4	無変化 6
22	4.0	0.02	+++	早生分枝	5	プロトコーム 8
23	4.0	0.2	+	プロトコーム	10	
24	4.0	2.0	+	カルス	6	無変化 4
25	4.0	4.0	+	カルス	6	無変化 4

※ 供試数は各区10個、形態は出現したものを重複して数えた。

発根促進の作用を示し、高濃度の時にはカルス形成の促進が見られた。24、25区で形成される組織は白色もしくは半透明のカルス部分を多く含むもので、茎葉の再生はほとんど見られなかった。

シオデの組織培養においては培地にBAを添加することで早生分枝やPLBを形成し、これが増殖に利用できることが示された。PLBはシンビジウム等のラン科植物において作出され大量増殖に用いられており、シオデにおいても大量増殖方法として期待できると考えられる。

(3) オーキシン濃度別発根試験

結果は表-3に示した通りである。濃度別の発根率を見ると、NAA区は0.5 mg/l以上で、IBA区は1.5 mg/l以上のホルモン濃度で、40日後に100%の発根が見られた。またNAA区の場合は0.1 mg/l以下の濃度では、濃度が低下するにしたがって発根率も徐々に低下したがIBA区では0.1 mg/l以下の濃度になると発根率が極端に低下した。このようにして得られた根系は実生苗と比較すると太いが、分岐の少ない細かい根を欠くものであった。そして根の太さはオーキシン濃度の高い培地ほど太くなる傾向が見られた。

NAA区とIBA区と比較をしてみると若干NAA区の方が発根率が高かった。そして最も短期間で効率よく発根していたのはNAA 0.5 mg/l区であった。

表-3 オーキシン濃度別発根試験

オーキシン濃度 (mg/l)	発根数(本)		
	20日後	30日後	40日後
NAA 0.5	6/15	12/15	15/15
NAA 1.0	2/15	11/15	15/15
NAA 1.5	3/15	11/15	15/15
NAA 2.0	2/15	12/15	15/15
IBA 0.5	1/15	10/15	15/15
IBA 1.0	1/15	10/15	14/15
IBA 1.5	3/12	7/12	12/12
IBA 2.0	1/12	6/12	12/12

(4) 発根程度別土壌馴化試験

試験①：活着の判定を行った日が苗ごとに少しずつ異なるが、最終的に根長1cmの苗の活着率は約50%であり、根長2cmの苗の活着率は約80%であった。

試験②：2カ月後の発根率は、無処理区では5.9%、NAA処理区では23.5%であった。発根率はNAA浸せき処理したものの方が高かったが、発根培地を用いた場合に比べると低いものであった。

土壌馴化の活着率には培養植物の根の長さが大きく影響を及ぼしていると考えられ、馴化率向上のためには発根培地での

表-4 分割程度別の発根・馴化調査

分割サイズ	供試数	未発根	発根率 (%)	平均茎数 (本)	供試数	馴化率 (%)
小型区	109	14	87.2	4.1	95	87.4
大型区	30	0	100.0	14.0	30	100.0

ある程度の発根操作期間が不可欠であると思われた。しかしその場合馴化のためにかかる期間が長くなる点が問題である。

(5) 分割程度別の発根・馴化調査

得苗率は分割サイズが大型の区が高かった。発根培地での培養期間が長かったため、大型区では発根率が100%になった。またこのとき茎数は、小型区では4.1、大型区では14.0となった。その後の馴化率、活着率では、大型区は100.0%、小型区でも87.4%となった。(表-4)

またこの調査ではシュート1本毎に分割しても発根操作中にかなり増殖することがわかった。シオデ培養苗は基部にカルスやPLBを持つため、実際に馴化後栽培試験地に植え付ける際には芽数がお

およそ3程度となることが多い。これは実生苗や野生株では普通株当たり茎1本であるから、このまま生長すれば株当たり収穫量の増加が期待できる。また馴化に供する組織が大きいほど発根・馴化率も高くなることから、組織培養苗はある程度大型のものの方が有利になると考えられる。この点について、付表-2に示した組織培養苗の栽培調査の結果では、年によって増減しているが3年経過時点では茎数が1本になってしまうような大きな減少はなく、苗畑では微増している。幾つか掘り採り調査したところ、株は寄せ植えの状態で、根茎は一部で癒着しているが茎毎にほぼ独立していた。これも馴化時点で成長不十分だった芽が栽培により成長したものと考えられる。寄せ植え状であることにより栽培面の特性までは今のところ把握していないが、組織培養苗を活用することで栽培がより有利になるような可能性を持つと思われる。

3 ま と め

シオデについては茎頂培養による増殖が可能となり、発根・馴化を経て苗とするまでの各条件についての知見が得られた。今後は組織培養苗の栽培特性についての調査が必要になると考えられた。

III 組織培養によるモミジガサの大量増殖方法の検討

1 実験方法

(1) 殺菌条件の検討

モミジガサの外植体から培養に用いる組織をとる場合の、効率の良い殺菌条件について検討を行った。モミジガサの茎頂部付近は短い縮れた毛に覆われ、若芽ではそれが特に著しく、殺菌は容易ではない。

そこで晴天が2~3日続いた日の後に、成株から若い茎を採取してその腋芽部分を茎をつけた状態で切り取り、アンチホルミン濃度を変えた2通りの条件で殺菌を行い、培地に植え付けて培養を行った。殺菌はエタノール処理30秒間、アンチホルミン処理10分間、マグネチックスターラーを用いて攪拌し、その後滅菌水で3回すすぎを行った。

使用した培地はMS培地にBA 0.5 mg/lを添加したものである。供試数は各区50個とし、培養は $21 \pm 1^\circ\text{C}$ 、照度約6000 luxの培養室内で16時間照明とした。調査はそれぞれの雑菌汚染率と腋芽の生存率を調べた。

(2) 基本培地とホルモン濃度別増殖試験

モミジガサの組織培養に適する基本培地及び添加するホルモン濃度を調べた。材料としてモミジガサ種子を無菌播種し得られた幼苗から切り取った芽を用いた。種子は綿毛や不良種子を除き低温で貯蔵しておいた物を、10倍希釈アンチホルミンで約10分間処理し、滅菌水で水洗したのち素寒天培地上に播種した。使用する基本培地はMS、1/2MS、Whiteの3種類とし、添加するホルモンはBA・NAAを0、0.05、0.5 mg/l添加した。組み合わせについては表-6のように9区に設定した。これはL9(3⁴)直交表に基づいて割り付けを行ったものである。

供試個数は試験区当たり幼芽5個ずつとし、培養は15°C、照度約500 luxの恒温器内で24時間連続照明で40日間培養を行った。

(3) ホルモン濃度別培養試験

試験(2)では用いたホルモン濃度の条件がかなり大まかなものであったため、基本培地を固定し、試験区を細かく再設定した。

基本培地はMS培地とし、BA・NAAともに0、0.02、0.2、0.5 mg/1の4水準を組み合わせ、添加した16通りの培地を用いた。材料はモミジガサ種子を無菌播種して得られた無菌幼植物体で、供試数は各区5個とした。培養は試験(1)と同じく培養室内で行った。培養開始から30日目に植えかえを行い、調査は60日後に行った。

(4) 温度別培養試験

モミジガサは自生する適地の環境から、増殖にはやや低めの温度が適するのではないかと考えられる。そこで増殖に適する温度について、培養時の温度を2段階に設定し生長の程度を調べた。

設定した温度は18、25℃で、供試個数は各40とした。モミジガサはあらかじめ培養しておいたものを用い、分けつ部分の茎頂を葉1枚付けて取り出し培地に移植した。培地はMS培地にBA 5 mg/1添加したものを用いた。培養はいずれも照度約6000 luxの16時間照明で行い、調査は20日後と40日後の2回行い、各個体の展開葉数を調べた。

(5) 葉切片培養試験

モミジガサの外植体から培養に用いる組織をとる場合、茎頂部分や腋芽などは密生する毛のため殺菌が困難である。そこで比較的毛の少ない葉身を用い、切片を培養して植物体を再生する条件を見いだすための試験を行った。

基本培地はMS培地とし、BAとNAAについて0、0.5、1.0、2.0 mg/1の4水準を組み合わせ、添加した16通りの培地を用いた。材料として馴化室内で育成したモミジガサ苗の比較的若い成葉を用い、エタノールで30秒間、アンチホルミン10倍液で10分間マグネチックスタラーを用いて攪拌し殺菌した。その後滅菌水で3回すすぎ、1辺5 mm程度の大きさに分割し、各培地に植え付けた。供試数は各区30個、培養は試験(1)と同じく培養室内で行った。

2 結果と考察

(1) 殺菌条件の検討

結果については表-5のようなものであった。殺菌方法により、雑菌の除去率は大きく変化したもの、腋芽の生存率は共に低くほとんど変わらなかった。雑菌の混入を防ぐレベルの殺菌剤の濃度、処理時間では、組織が障害を受けてしまうことが示された。

モミジガサの組織培養については、外植体の殺菌が困難で供試する数を充分確保できなかったため、試験(2)以後はすべて種子の無菌播種か、またはそれを増殖した培養体を材料として用いている。今の所、外植体を初代培養する場合に殺菌率を上げるためには、採取した外植体を一度馴化室内で鉢植え管理しその後伸長してきた部分を用いるといった手法により、汚染の少ない材料の確保を行う方がよいと思われる。

表-5 殺菌条件の検討

試験区	雑菌汚染率	生存率
アンチホルミン5倍液	30%	20%
" 10倍液	80%	20%

(2) 基本培地とホルモン濃度別増殖試験

結果は表-6の通りである。培地種類については、MS、1/2MS培地でははっきりした差は見られなかったが、White培地では生長が明らかに劣っていた。BAとNAAの濃度差による生長の違いはそれほど顕著には見られなかった。ただし培養形態ではNo.6区で早生分枝の他にシュートが2個形成されていた。培養に用いる培地として供試した3種類の培地のなかで、White培地がMS培地などと比べ生長が劣っていたが、この違いはWhite培地がMS培地に比べ硝酸態窒素成分が大幅に少ない点に由来すると考えられ、モミジガサの生育・培養には硝酸態窒素成分を要求すると考えられた。

表-6 基本培地とホルモン濃度別増殖試験

試験区 No	培地	BA (mg/1)	NAA (mg/1)	増殖形態	平均展開葉数(枚)
1	MS	0	0	早生分枝+発根 5/5	2.0
2	MS	0.05	0.05	早生分枝+発根 2/3	2.0
3	MS	0.5	0.5	早生分枝 5/5	1.6
4	1/2MS	0	0.05	早生分枝+発根 5/5	1.8
5	1/2MS	0.05	0.5	早生分枝+発根 5/5	1.8
6	1/2MS	0.5	0	早生分枝 3/5、シュート 2/5	3.4
7	White	0	0.5	早生分枝+発根 5/5 (白色化)	1.0
8	White	0.05	0	早生分枝+発根 3/3 ((白色化) 白色化)	1.0
9	White	0.5	0.05	早生分枝+発根 3/3	1.3

(3) ホルモン濃度別培養試験

培養組織の形態などは、表-7のとおりである。茎葉分化数を見ると、13区、14区、9区の順に多かった。また根茎分化については、5区、6区、1区の順に出現数が多かった。

ホルモンの種類について、BAは茎葉分化に影響を与え、NAAは根茎の分化促進よりもカルス化などの脱分化に

影響した。この結果をまとめると、モミジガサの増殖に適する植物ホルモン添加濃度は、BAを0.2~0.5 mg/1、NAAを0~0.02 mg/1程度の範囲とする組み合わせで増殖率が高いようであった。

表-7 ホルモン濃度別培養試験

試験区 No	BA (mg/1)	NAA (mg/1)	増殖形態	平均展開葉数(枚)
1	0	0	早生分枝+発根 2 発根 1 カルス+早生分枝 2	0.8
2	0	0.02	早生分枝+発根 1 発根 1 カルス+早生分枝 3	0.6
3	0	0.2	カルス 4 枯死 1	0
4	0	0.5	カルス 5	0
5	0.02	0	早生分枝+発根 5	2.4
6	0.02	0.02	早生分枝+発根 3 早生分枝 2	3.4
7	0.02	0.2	カルス+早生分枝 3 カルス 2	1.6
8	0.02	0.5	カルス 5	1.6
9	0.2	0	早生分枝 5	4.6
10	0.2	0.02	早生分枝 4 早生分枝+発根 1	4.2
11	0.2	0.2	早生分枝 5	3.4
12	0.2	0.5	早生分枝 1 カルス+早生分枝 1 カルス 3	2.4
13	0.5	0	早生分枝 5	5.6
14	0.5	0.02	早生分枝 5	4.6
15	0.5	0.2	早生分枝 3 早生分枝+発根 2	1.8
16	0.5	0.5	早生分枝+発根 1 カルス+早生分枝 4	2.8

(4) 温度別培養試験

結果は表-8に示す。20日目、40日目ともに25℃区の方が幾分生長が良かった。しかし培養時の形態については、18℃区の方が葉身はやや大型で緑色が濃く、葉柄も太いものが多かった。

培養環境として増殖に適する温度は25℃であったが、18℃では葉の大型化などが見られたことから、茎葉の充実などに適していると思われた。これは長期間の継代培養や、充実した茎葉を必要とする馴化苗作成時などには適すると思われる。

(5) 葉切片培養試験

結果について表-9に示した。ホルモンフリーの区以外ではカルスの形成が見られ、BA添加濃度が小さい区では発根し、6、7、12区では不定芽が生じ、分割して増殖用培地に移植したところ、分化して個体を再生し正常に生長した。

モミジガサの葉組織の培養ではカルス化は比較的高い頻度でおこったが、再生してきた個体数は多くなかった。変異のおこる可能性もあり、増殖に利用するにはさらに検討を要する。

表-8 温度別培養試験

培養温度	供試数 (個)	枯死数 (個)	1株当たり平均葉数(枚)	
			20日間	40日間
18℃	40	0	7.05	10.38
25℃	40	1	7.62	11.10

表-9 葉切片培養試験

試験区	BA (mg/l)	NAA (mg/l)	形態(出現数:個)					
			枯死	無変化	肥大	カルス	発根	シュート形成
1	0	0	20					
2	0	0.5	11	11				4
3	0	1.0						30*
4	0	2.0		1				29*
5	0.5	0		30				
6	0.5	0.5			22	6		2*
7	0.5	1.0		10	10	9*		1
8	0.5	2.0			10*	20*		
9	1.0	0	11		19			
10	1.0	0.5		18	2	10		
11	1.0	1.0			20	10		
12	1.0	2.0			19	10		1
13	2.0	0	30					
14	2.0	0.5			28	2		
15	2.0	1.0		5	25			
16	2.0	2.0		1	10	10		

※ 供試個数は各区30個

※ 特に変化、生長の大きなものは*とした。

3 ま と め

モミジガサについては、外植体の殺菌条件・初代培養条件が未解明であるものの、一応茎頂培養による増殖は可能であることが示された。組織培養苗の作成という点では、この研究では発根・馴化面についての検討が不十分であったが、モミジガサの場合、通常増殖法として株分けのほかに挿し木(芽挿しなど)が可能であり、また増殖試験(2)(3)でも増殖中に発根する個体も見られ、比較的発根や馴化は容易であると考えられる。いずれにせよ組織培養によって苗の増殖を図るとき、培養室内の増殖率だけでなく鉢上げ・馴化といった行程を含めて手法の確立と呼べることから、実用に際しては早急に解決を迫られるであろう。

IV 組織培養によるゼンマイの大量増殖方法の検討

1 実験方法

(1) 葉組織の培養試験

材料として採取の容易なゼンマイ葉柄を用いた。実験は材料を変えて2回行った。

試験①：成株の若い栄養葉を採取し、葉柄を1 cm前後に切りそろえ70%エタノールで1分間、アンチホルミン5倍希釈液（有効塩素1%程度）で5分間、表面殺菌してから移植した。培地はMS培地にBA・NAA共に0、0.02、0.2、2.0、4.0 mg/1の5段階を組み合わせ添加した25通りの培地を用いた。供試数は各区5個とし、培養は $21 \pm 1^\circ\text{C}$ 、照度約6000 luxの培養室内で16時間照明で行った。

試験②：滅菌孢子から前葉体をへて発芽した無菌幼植物体の葉を用い、葉柄部分を切り取り、培地はMS培地と1/2MS培地を用い、BA・NAA共に0、0.2、2.0 mg/1の3段階を組み合わせ添加した計17の試験区で行った。

(2) 前葉体培養試験

滅菌孢子を寒天培地上に散布すると容易に前葉体が形成され、さらに培養を続けると前葉体上で雄性器と雌性器を形成し、受精して孢子体植物（ゼンマイ本体）が発芽してくる。培養が簡単で量の確保が容易な前葉体を材料として用い、ゼンマイ組織培養に適する培地組成についての検討を行った。材料となる孢子は成熟した孢子葉から採取し、すぐにアンチホルミン10倍液に懸濁して殺菌した後、遠沈管により分離した。同様にして滅菌水で2回水洗したのち寒天培地上に散布した。

試験①：基本培地について、MS培地を基に3通りの改変MS培地を用い、培養を行った。

MS培地の他、多量成分を1/2にしたもの（1/2MS）、有機成分（ビタミン類等）を除いたもの（MS'、1/2MS'）、ハイポネックス培地（ハイポネックス5-10-5使用、1000倍希釈液、対照区）の計5種類を用いた。培地は液体培地とし、pH 6.0に調整した。供試数は各区とも培養ビン5本、一定の大きさに切り分けた前葉体を1ビンあたり5切片（初期乾重量約1.3 mg）を移植した。培養は試験(1)と同じく培養室内で行った。調査は60日後に行い、培養形態及び乾重量を測定した。

試験②：培地pH（4.5～7.5まで4段階）及び、添加する糖（サッカロース3段階0、3、10 g/1、グルコース3 g/1、フルクトース3 g/1）について調べた。基本培地はハイポネックス液体培地とし、供試数は1区あたり培養ビン4本。その他の培養条件、調査方法は①と同じである。

(3) 前葉体由来の幼植物の培養

外植体からの殺菌と初代培養が困難であったため、無菌培養中の前葉体から発芽してきた孢子体幼植物体を材料としてゼンマイの組織培養を行う。培地はハイポネックス培地（1000倍液）とし、固体培地（ゲル化剤としてジェランガム2 g/1添加）ではサッカロース添加（10 g/1）と無添加の2種類、液体培地（同1000倍液）では添加区のみ、計3種類とした。幼植物体は新葉1～2枚程度のものを、基部に付着する前葉体を除去して移植した。培養は試験(1)と同じく培養室内で行った。

2 結果と考察

(1) 葉組織の培養試験

試験①②ともすべての区で組織は褐変化し、その後まもなく枯死したので培養を中止した。

ゼンマイは傷を受けた部分が黒色に近い褐変化し、殺菌によるダメージと合わせ培養自体を困難にした。実験に使用した組織が葉柄のみであったため、他の組織については今後調査する必要がある。

(2) 前葉体培養試験

各試験から、培養に適する培地組成について、それぞれ以下の結果が得られた。

試験①：基本培地としては、MS培地よりハイポネックス培地の方が増殖に適していた。またMS培地の改変については有機成分を含まない培地で成長がよかった。(表-10)

試験②：培地は pH 6.5 区、サッカロース添加濃度 10 g / 1 区が適していた。糖を添加した区は無添加区と比較して明らかに増殖量は大きく、培養後期にも生長が持続した。炭素源として糖が利用されたものと考えられた。(表-11)

試験③：3種類の植物ホルモンのうち NAA と 2-4, D では、0.01 及び 1.0 mg / 1 添加区で増殖が促進された。高濃度で添加した BA では培養中にほとんど枯死したが、NAA と 2-4, D は低濃度で添加した区と培養形態が異なった。(表-12)

試験(1)で外植体の殺菌及び初代培養の条件を解明できなかったため、培養液組成についての検討はとりあえず前葉体を用いて行ったが、組織培養では通常、培養部位が異なれば最適な培養液組成やホルモン感受性も異なることが多く、この試験で得られた培地組成がゼンマイの培養にそのまま流用できるかどうかは検討を要する。

(3) 孢子由来の幼植物の培養

固体培地上での培養では、幼植物体はサッカロース添加区では褐変枯死し、無添加区では生長が見られたが分けつなどの増殖は見られなかった。しかし同じ試験を再び行ったところ、サッカロース添加培地でも幼植物体の枯死は見られず、またほとんどの個体は生長が見られ、無添加区よりも大型となったが、やはり分けつは見られなかった。

また液体培地では、固体培地での培養より生長する物

表-10 前葉体培養試験 ①

試験区	培地	乾重量 mg
1	ハイポネックス	19.19
2	MS	2.13
3	1/2 MS	3.09
4	MS'	3.30
5	1/2 MS'	4.93

※ 乾重量は平均

表-11 前葉体培養試験 ②

試験区 No	希釈倍率 (倍)	pH	糖濃度 (g/1)	乾重量 (mg)
1	1000	6.5	0	6.1
2	500	(6.5)	(0)	5.7
3	2000			5.5
4	(1000)	7.5	(0)	5.1
5		5.5		4.8
6		4.5		5.8
7	(1000)	(6.5)	S 3	15.9
8			S 10	55.7
9			G 3	20.7
10			F 3	32.6

※ 試験区 No 1 は対照区とした。

※ 糖の種類は S (サッカロース)、G (グルコース)、F (フルクトース)

表-12 前葉体培養試験 ③

試験区 No	ホルモン濃度 (mg/1)	乾重量 (mg)
1	0	7.70
2	BA	0.01
3		0.1
4		30.0
5	NAA	0.01
6		1.0
7		30.0
8	2-4, D	0.01
9		1.0
10		30.0

が多かった。ほとんどの個体は分けつなどの増殖は起こらず、葉数の増加と個体の大型化及び発根が見られた。しかし葉柄長の小さい個体の一部は多芽体状となり、培養を続けると10mm以上の球状になった。この培養体はごく小さい芽が集めた物で、分けつ数は20~40あり、それぞれ分離して培養すると幼植物体とおなじく生長した。この培養体は分割・継代培養を2~3回繰り返したところ、個々の芽が生長して幼植物体化し、それらを除去しながらでないと同じ形態を維持する事はできなかった。また生長しある程度大型化した幼植物からは形成されなかった。

初回の試験結果と2回目以後の結果とが異なってしまったが、これはおそらく初回到幼植物体の移植時の前葉体除去を行うが、その時培地に接する部分を痛めたためと思われた。サッカロース添加培地では、無添加培地に比べると培養体の切断面や表面の傷部分が褐変しやすく、培養の妨げになりやすい傾向があった。これは液体培地でも同様であった。また培養時一部に多芽体様組織が現れたことから、ゼンマイの大量増殖が将来的に可能になると思われる。なお試験に用いた幼植物体は、前葉体を継代培養していた過程で自然発生した物で、人為的に形成させた物ではない。今の所これを誘導する条件は不明であり、これについても増殖をコントロールするためには詳しく調べる必要があると思われる。

3 ま と め

ゼンマイの組織培養では外植体の殺菌および初代培養の条件を解明できなかった。クローン増殖のためには、外植体組織からの培養方法を確立する必要があるため、今後の課題として残された。しかし前葉体を用いることで、今後の組織培養の参考となるデータが得られた。

V 終わりに

山菜類は地域の特産物として期待されるため、その組織培養については各県の試験研究機関などが様々な取り組みを行っており、これまでに幾つかの報告がなされてきている。この研究では、シオデ・モミジガサ・ゼンマイを対象としたが、商品化が期待できる山菜類は掘り起こせばまだまだあると考えられ、それらについても今後要求があれば取り組んでいく必要が生じるとと思われる。

また山菜類の栽培という点で、苗の増殖方法だけでなく、生長の遅い山菜類の栽培方法の改良にも目を向けるべきかもしれない。作物一般では、新たな栽培方法ができれば、それに適した品種あるいは苗の形態が要求される。栽培にあわせた組織培養の活用を今後も考えていくべきであろう。

引用文献：

- 1) 北村四郎、村田源：原色日本植物図鑑（上）、47、1957
- 2) 北村四郎、村田源：原色日本植物図鑑（下）、94~95、1964
- 3) 田川基二：原色日本羊歯植物図鑑、34、1959
- 4) 山田康之、岡田吉美：植物バイオテクノロジー、20~21、1986

付表-1 培地組成

要素	MS	1/2 MS	White
KNO ₃	1900	950	80
KCl			65
NH ₄ NO ₃	1650	825	
KH ₂ PO ₄	170	85	
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O			16.5
CaCl ₂ · 2H ₂ O	440	220	
Ca (NO ₃) ₂ · 4H ₂ O			300
MgSO ₄ · 7H ₂ O	370	185	370
NaSO ₄			200
FeSO ₄ · 7H ₂ O		27.8	
Fe 2 (SO ₄) ₃			2.5
Na ₂ · EDTA		37.3	
MnSO ₄ · 4H ₂ O		22.3	7
ZnSO ₄ · 7H ₂ O		8.6	3
H ₃ BO ₃		6.2	1.5
CuSO ₄ · 5H ₂ O		0.025	
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O		0.25	
KI		0.83	0.75
CoCl ₂ · 6H ₂ O		0.025	
ミオイノシトール		100	
塩酸チアミン		0.1	0.1
塩酸ピリドキシン		0.5	0.1
ニコチン酸		0.5	0.5
L-グリシン		2.0	3
塩酸システイン			(1)
パントテン酸カルシウム			(1)

※ 数値はmg/1

※ 培地は、特別な指示の無いものはすべてサッカロース30g/1を添加し、pH 5.6~5.8に調整し、固体培地の場合さらに寒天9g/1を添加した。

付表-2 シオア生育調査 (H3年馴化苗)

		H3年	H4年	H5年	H6年	計
畑	株数 (株)	20	12	11	11	-
	株主存率 (%)	-	60	92	100	55
	1株芽数 (本)	4.75	3.08	6.27	5.55	-
	芽増加率 (株)	-	65	204	89	117
林	株数 (株)	19	17	16	16	-
	株主存率 (%)	-	90	94	100	84
	1株芽数 (本)	4.05	4.06	4.06	3.50	-
	芽増加率 (株)	-	135	135	86	86

※ 株生存率、芽増加率は前年比 (芽増加率は1株あたり)

※ 管理は年1回の施肥及び年数回の除草のみ

作図-1 シオアの組織培養及び土壌馴化



写真-1



写真-3



写真-2



写真-4

写真-1 : 増殖中のシオア組織培養個体

写真-2 : 発根培地での発根操作

写真-3 : 土壌馴化中の幼苗

写真-4 : 生育調査のための植栽地

付図-2 モミジガサ、ゼンマイの組織培養



写真-1

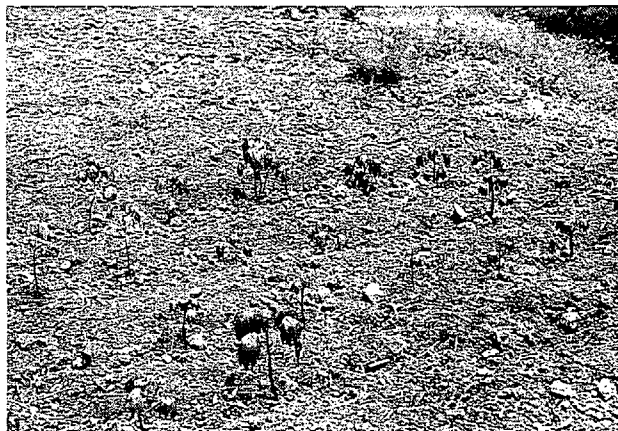


写真-2

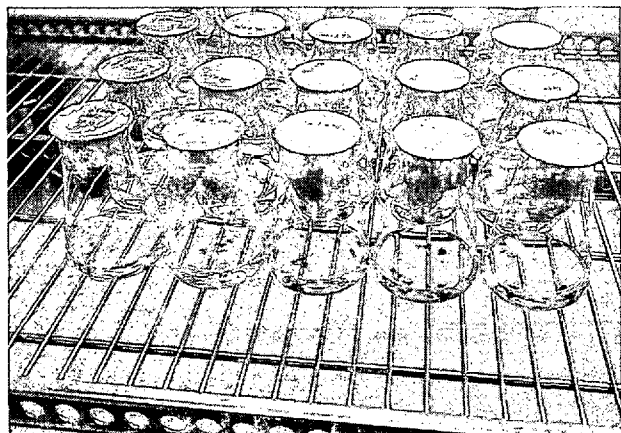


写真-3

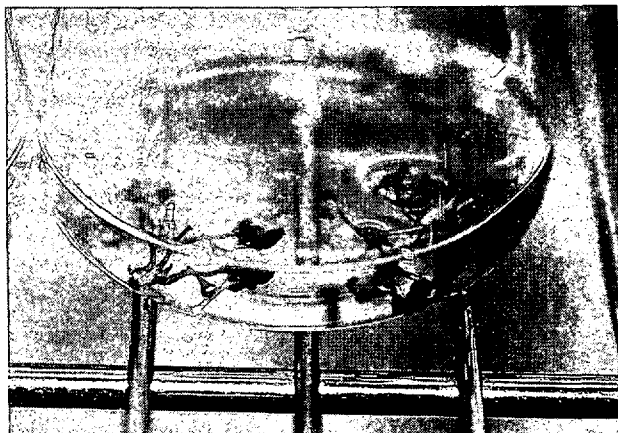


写真-4



写真-5

写真-1：増殖中のモミジガサ組織培養個体

写真-2：モミジガサ苗植栽地

写真-3：ゼンマイ前葉体培養試験（液体培地）

写真-4：ゼンマイ胞子体幼植物の培養

写真-5：多茂体状となったゼンマイ培養体