

特用林産物のウイルスフリー化技術の確立に関する研究

— 組織培養によるワサビのウイルスフリー苗の大量増殖 —

(県単課題 昭和61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：

ワサビ栽培で問題となる苗の確保について、組織培養による無病苗の大量増殖方法を確立するため検討したが、これにより次の様なことがわかった。

1. 初代培養に用いる外植体組織として茎頂部分が考えられた。しかし茎頂部分は汚染により生存率が低く、殺菌条件などを改善する必要があった。
2. MS培地の場合、培養に適する培地 pH は 5.6～5.8 程度、増殖に適する植物ホルモン濃度は B A 2.0 mg/1 程度であった。また葉柄毎に分割し腋芽形成を促進することで、分けつだけの利用に比べワサビの増殖率は向上した。
3. ワサビ生長点を取り出し液体回転培養することによって苗条原基が形成された。形成がもっとも良かったのは N A A 0.2 - B A 0.02 mg/1 の条件下であった。しかし形成された苗条原基はかなり不安定なものであり、今のところ利用は困難であった。
4. 発根操作として培地に添加するオーキシンについて、I B A では 2.0 mg/1、N A A では 0.1 mg/1 までの濃度が発根に適していた。また馴化する移植時期については、発根後早めに行う方が良いと思われた。発根率、活着率がともに高いのでワサビの馴化苗作成は容易であると考えられた。

I はじめに

ワサビ (*Wasabia japonica* Matsum.) はアブラナ科ワサビ属の多年草で、主に山間地や高冷地の沢筋などの湿潤な場所に生育する。葉は丸い心臟型で長柄、地下茎は太く円柱形で節がつまり葉の落ちた跡がある。花は白～淡黄白色、他のアブラナ科植物と同様花茎がたち4～5月頃咲く。全草に特有の香りと辛味があり、地下茎は香辛料として薬味に、葉・葉柄は漬け物などの加工品に利用され、需要もあり高価に取り引きされている。栽培は、地下茎を重視する場合は沢地など水を得られる場所に、そうでない場合は林床や被陰を施した畑地などで行われている。

ワサビ栽培における増殖は主に分根苗、実生苗の両方を用いて行われているが、それぞれウイルス病の発生、系統の保持の点で問題がある。分根苗は、ある程度成長した地下茎に形成される複数の分枝(分けつ)を各々分割してつくるもので、親株が罹病しているとまず感染を避けられない。特にワサビには萎縮病というウイルス病があり、分根を繰り返すと症状が強まると言われている。また実生

苗は、受粉によってできる種子を低温処理などして播種し、発芽した稚苗を養成するもので、受粉時に自然交配して雑種化し優良な形質を損なう可能性がある。そこでこの研究ではワサビ栽培の安定化を図るため、組織培養による無病苗の大量増殖を試みた。

II 実験方法

1 栽培方法・培養条件の検討

(1) 外植体別初代培養試験

組織培養に用いるのに最適な外植体部位を見いだすため、茎頂、葉柄、根を用いて初代培養を行った。1/2 LS (Linsmaier - Skoog) 培地を用い、BA (ベンジルアデニン) 添加区とNAA (α -ナフタレン酢酸) 添加区を設定した。使用する培地はサッカロース30 g/1を加え、pH 5.6~5.8に調整した後、ゲル化剤として寒天9 g/1を添加した。培地は調整・融解後、培養容器に分注し、オートクレーブで高圧滅菌を行った。試験区は表-1のとおりである。採取した外植体の殺菌は組織を切り出し、エタノール(90%程度)で5秒間、アンチホルミン(次亜塩素酸ナトリウム)の20倍希釈液(有効塩素1%程度)で5分間処理し、滅菌水で2度水洗してから培地に置床した。培養は15°C、陽光補光恒温器で行い、調査は90日後に発根・発芽の状態を調べた。

(2) 培地 pH 別増殖試験

ワサビ培養に適する培地 pH について調べた。MS (Murashige - Skoog) 培地にBA 2.0 mg/1を添加し、培地 pH 別に増殖率を調査した。試験区及び供試本数は表-2のとおりである。組織は継代培養(1/2 MS培地、BA 0.2 mg/1添加)によって分けつ・増殖した茎頂を含む培養体で、葉柄長1 cm程度のものを供した。培養は13°C、12時間照明で行い調査は60日後に行った。

(3) ホルモン濃度別増殖試験

培地に植物ホルモン(サイトカイニン、オーキシン)を濃度別に添加し、増殖率について調べた。試験①ではBA単独、②ではBA、NAA混用とした。

試験①: MS培地にBAを濃度別に添加した5つの区を設定した。組織は継代培養により培養しておいた茎頂を含む葉柄長1 cm程度の幼植物体を移植した。培養は15°C、24時間照明で行った。調査は25、31、41、50日後の4回行い、増殖数は分けつ数を数えた。

試験②: MS培地にBAとNAAをそれぞれ0、0.02、0.2、2.0、4.0 mg/1の各濃度で組み合わせて添加した24の区を設定した。組織は別に培養しておいた葉柄長1 cm程度の幼植物体を移植した。培養は15°Cの恒温器で、14時間照明で行った。調査は40日後に行い、培養形態と増殖率を調べた。

(4) 腋芽からの増殖

ワサビの増殖では、培養植物の葉柄基部にある成長組織が腋芽化し、生長して分枝となったところでこれを分割して移植する。しかしこの腋芽の形成は少なく、この増殖率を向上させるため、分枝の出来ていない葉柄基部を分割し、腋芽形成率を調べた。

ワサビの増殖に適する培地として、3種類のホルモン組成の1/2 MS寒天培地に、腋芽形成部分を含めて基部から分割したワサビ葉柄部を1 cm程度に調整して置床した。培養は16±1°C、照度約3000 luxで行い、調査は30日後に行った。

(5) 苗条原基作出試験

植物の系統保持や大量増殖方法として、茎頂の生長点組織を培養して苗条原基を作出する方法がある。変異が少ないなどの利点を持ち、一部の植物では実用に供されている。ワサビにおいて増殖への利用の可能性を調べるため、その誘導条件について調べた。

基本培地として1/2MS培地にショ糖30g/lを加え、各区毎にホルモンを添加してpH5.6に調整した。添加する植物ホルモンとしてNAAとBAを0、0.02、0.2、2.0、4.0mg/lの5段階の濃度で組み合わせた25の区を設定した。

茎頂は0.2mm程度に切り取り、培養は $16 \pm 1^\circ\text{C}$ 、3000~5000 luxで、回転数2回/分の液体回転培養とし、継代移植は2週間毎に行った。実験は2回行い試験①は培養組織はそのまま継代し、試験②は移植時にそれぞれ出現してきた幼葉やカルス化した近傍組織を除去しながら継代した。

2 培養組織からの植物体再生

(1) 薬培養試験

半数体植物の作成のため、開花前の未熟な薬を培養し、脱分化・再分化を期待した。基本培地は1/2MS培地とし、BA0~4.0mg/l、NAA2.0~4.0mg/lを組み合わせて添加した10種類の培地を用いた。供試した薬は開花の1日前と2日前のものである。蕾の状態未開花を採取し、70%エタノールと20倍希釈アンチホルミンで殺菌し滅菌水ですすいだ後、がくと花弁を除去して薬のみを取り出した。移植個数は各区5個、培養は 15°C の恒温器内で24時間照明で行い、調査は培養70日後に行った。

(2) カルス誘導試験

大量増殖に用いるため、培養植物の組織からのカルス誘導を試みた。

基本培地に1/2MS培地を用い、試験区は添加したホルモンの種類と濃度から、試験①ではBAと2,4-D(2,4-ジクロロフェノキシ酢酸)を0、0.5、1.0mg/lの3段階ずつ組み合わせた9区、試験②ではBAとNAAを0、0.05、0.2、0.5、1.0、2.0mg/lの6段階ずつ組み合わせた36区とした。供試組織はあらかじめ増殖しておいた幼植物体の葉柄で、長さ5mmに調整して使用した。培養は 16°C の恒温器内で14時間照明で行い、40日後に培養形態について調査を行った。また形成されたカルスはホルモンフリーの培地に移植し、培養を継続して再分化が起こるかどうか調べた。

3 発根・馴化苗作成方法の検討

(1) オーキシシン類濃度別の発根

発根を誘導するオーキシシン類として、MS培地にNAA及びIBA(インドール酪酸)を濃度別に添加し発根率と発根時期等を調べた。試験は培地に添加するホルモン濃度を9段階とした。供試組織は別に培養しておいた、茎頂を含む葉柄長1cm程度の幼植物体を用いた。培養は 15°C の恒温器で、24時間照明で行った。調査は発根率が30、50、80%に達するのに要した日数を記録した。また最終発根率は80日後に調べた。

(2) 発根程度別土壌馴化

寒天培地上で発根したものについて、土壌馴化時期を把握するために根の伸長程度別に馴化を行った。馴化時の根長は3段階とした。馴化には直径8cmの黒色ビニールポットに滅菌済みのパーミキュ

ライトを詰めたものを用い、苗は古い葉を2~3枚切り落として移植した。移植後は透明フタ付きのプラスチック製水切りカゴに入れ、ポットの底がわずかに水に浸るようにした。管理は15℃の恒温器内で行い、28日後に活着率、生長量について調査を行った。

III 結果と考察

1 培養方法・培養条件の検討

(1) 外植体別初代培養試験

調査結果は表-1のとおりである。発根、発芽したものはともに少数であった。このとき発根したものは発芽が見られず、発芽したものは発根が見られなかった。また根を培養したものはバクテリアの除去が充分でなく汚染により枯死したものが見られた。

また参考としてBA 5.0 mg/1 添加した培地で、培養部位を葉身、葉柄上部、葉柄下部、茎頂、根とひろげ同様の試験を行ったところ、1カ月経過後の生存率は茎頂と根で低く、特に根はすべてバクテリアに汚染され枯死した。

初代培養について、この結果から外植体部位として殺菌の容易な葉柄組織などが利用しやすいと考えられたが、このとき発芽、シュート形成をしたのは茎頂部分のみであった。いまのところ葉柄などか

表-1 外植体別初代培養試験

添加濃度 (mg/1)	供試数(個)			発根			発芽		
	茎頂	葉柄	根	茎頂	葉柄	根	茎頂	葉柄	根
(free)	4	3	3	0	3	0	0	0	0
NAA 0.1	4	3	3	0	0	0	0	0	0
0.5	4	3	3	0	0	1	0	0	0
1.0	4	3	3	1	1	0	0	0	0
5.0	4	3	3	0	0	0	0	0	0
BA 5.0	4	3	3	0	0	2	1	0	0

ら植物体が再生される条件については未解明のため、初代培養には茎頂部分を用いるしかない。しかし茎頂部分は汚染により生存率が低く、殺菌条件などを改善する必要がある。あるいは葉柄などを用いるため再生方法の検討を要すると考えられる。

(2) 培地 pH 別増殖試験

各 pH の増殖率は表-2のとおりであった。増殖率は1.0~5.7倍で最も高かったのは pH 6.0 区、次いで pH 5.5 区であった。

また出現した形態でも、葉が大型化するなど生長に適していると思われる。

ワサビの場合も他の多くの植物と同様、培地 pH は 5.6

~5.8 程度に調整すれば良いと思われる。

表-2 培地 pH 別増殖試験

pH	供試数	害菌発生数	増殖率	備考
5.5	10	1	4.6	葉柄赤紫色、葉は小型
6.0	10	0	5.7	"、大葉1~2枚
6.5	10	0	1.9	"
7.0	10	0	1.4	葉身黄緑色
7.5	10	0	1.0	葉身黄白色

(3) ホルモン濃度別増殖試験

試験①の培養期間別の増殖率は表-3①のとおりである。初期の増殖率はBA 1.0 mg/1 区で良く、ついで2.0 mg/1 区で良かった。50日後にはBA無添加区を除いてすべて4倍以上の増殖率となった。また、BA無添加区は50日後には2個体で発根が見られた。

試験②の幼植物体の生育の形態は早生分枝、伸長、カサの3形態となった。結果は表-3②のとおりである。早生分枝の多い培地はBA 2.0 + NAA 0~0.2 mg/l 添加した培地であった。また伸長の多い培地はBA、NAAとも低濃度区の培地であった。カサ化の著しいものはすべてNAA 2.0 mg/l 以上の培地であった。

増殖率が高かったのは、いずれの試験区でもBA濃度が2.0 mg/lの培地であった。BAは増殖を促進させているが、これより

高濃度で添加すると初期増殖率が鈍るようである。またNAAはカサ化に影響していた。オーキシン類は脱分化や発根を促進することが多いが、ワサビに対してNAAは主に脱分化を促進するようである。

(4) 腋芽からの増殖

結果については表-4に示した。分割した葉柄からの腋芽の形成・生長は比較的容易で、腋芽形成率は枯死を含めないと80%以上であった。枯死した個体はほとんどが切り口から萎凋しており、分割・調整等の操作の影響によるものと思われた。これまで培養時の葉数が10枚程度あっても、分けつ数としては2~3程度であったことから、増殖率はかなり向上すると考えられる。

ワサビ葉柄の付け根の部分を顕微鏡で調べると、ごく小さい腋芽様組織を有するものが少なくないが、今回の腋芽の形成率はかなり高いものであった。これは新たな腋芽の形成もあったことを示していると思われる。

表-3-① ホルモン濃度別増殖試験①

BA 濃度 (mg/l)	供試数 (個)	培養 期間 別 増 殖 率			
		25 日	31 日	41 日	50 日
0	5	1.8	2.3	2.7	3.2
1.0	11	3.6	3.8	4.1	4.4
2.0	11	2.9	3.6	4.7	4.7
5.0	11	2.2	2.8	3.7	4.3
10.0	10	2.4	2.9	3.5	4.0

表-3-② ホルモン濃度別増殖試験②

BA (mg/l)	NAA (mg/l)	早生分枝	伸 長	カサ	増殖率
0	0	0	4	0	1.0
0	0.02	0	4	0	1.0
0	0.2	0	2	2	1.0
0	2.0	0	0	4	1.3
0	4.0	0	0	4	1.0
0.02	0	0	4	0	1.0
0.02	0.02	0	4	0	1.0
0.02	0.2	1	3	0	1.5
0.02	2.0	0	0	4	1.0
0.2	4.0	0	0	4	1.0
0.2	0	0	2	0	1.0
0.2	0.02	1	3	0	1.5
0.2	0.2	1	3	0	1.3
0.2	2.0	0	0	4	1.3
2.0	4.0	0	0	4	1.0
2.0	0	3	1	0	1.8
2.0	0.02	2	2	0	1.8
2.0	0.2	2	2	0	1.8
2.0	2.0	0	0	4	1.0
4.0	4.0	0	0	4	1.0
4.0	0	0	2	2	1.0
4.0	0.02	1	1	2	1.3
4.0	0.2	0	1	3	1.0
4.0	2.0	0	0	4	1.3

※ 供試個数は4個

表-4 腋芽からの増殖

BA-NAA (mg/l)	供 試 個 数	腋芽形 成 個 数	無変化	枯死	形成全 腋芽数	増殖率 (%)
0.2-0	18	13	1	4	16	88.9
0.2-0.02	18	9	2	7	10	55.6
0.2-0.2	19	23	2	4	15	78.9

(5) 苗条原基作出試験

ホルモン添加濃度ごとの出現形態は表-5のとおりであった。試験①ではどの区からも苗条原基集塊の形成は見られなかった。これに対し培養中に生長点以外の肥大組織を除去した試験②では苗条原基は5つの区で見られ、形成が最も良かったのはBA 0.05 + NAA 0.2 mg/1の条件下であった。しかし形成された苗条原基はカルス表面に数個しかなく、増殖も遅かったため、いずれの区でもカルス化した近傍組織の肥大により、継代や増殖は困難で、長期間の維持は困難であった。しかし一部を

通常の継代・増殖用培地に移植したところ生長して正常な幼植物となった。これらの結果から、得られた苗条原基はかなり不安定な物であったといえる。苗条原基として利用するにはまず長期間の維持を可能にする必要があり、そのためには誘導条件および継続して培養する条件についての調査を要する。

2 培養組織からの植物体再生

(1) 薬培養試験

調査は培養によって肥大した薬の個数を数えた。結果は表-6のとおりであった。

薬の肥大の程度は、BA無添加の区(No.1、2)とBA・NAA 4.0 mg/1 (No.25)で少ない。採取時期別で比較すると、肥大個数は開花2日前のものが29/50個、開花1日前のものが22/50個と、開花2日前のものが多かった。肥大の大きさについては、BAが無添加のものとBA、NAAとも4.0 mg/1の組み合わせのものが小さく、逆に試験

区No.6~10で開花2日前の薬が大きく肥大した。

肥大の状況から薬の培養にはBAが必要であることが示された。また薬は開花に備えて分化・成熟

表-5 苗条原基作出試験

NAA (mg/1)	BA (mg/1)	出現形態			
		sg	sh	c	d
0	0	2			3
0	0.02	4			1
0	0.2	3		1	1
0.02	0	1	2	1	1
0.02	0.02	1	1	1	2
0.02	0.2			1	3
0.2	0		2	4	
0.2	0.02		3	3	
0.2	0.2		1	1	3

※ 供試個数は各5個、出現形態はそれぞれ次の通り

- sg: 苗化または肥大
- sh: 苗条原基をもつ集塊
- c: カルス化
- d: 枯死または無変化

表-6 薬培養試験

試験区 No	添加濃度 BA	mg/1 NAA	薬採取 時期	肥大個数	肥大指数
1	0	2.0	1	0	0
			2	0	0
2	0	4.0	1	1	0.2
			2	0	0
3	0.02	2.0	1	3	0.6
			2	4	1.0
4	0.02	4.0	1	3	0.8
			2	1	0.4
5	0.2	2.0	1	4	1.2
			2	4	0.8
6	0.2	4.0	1	4	1.2
			2	5	1.4
7	2.0	2.0	1	2	0.4
			2	4	1.4
8	2.0	4.0	1	2	0.8
			2	4	1.2
9	4.0	2.0	1	3	0.8
			2	5	1.6
10	4.0	4.0	1	0	0
			2	2	0.4

※ 供試個数は各5個

するため、その前の若い物ほど増殖の活性が高いのであろう。葯の培養に可能性が見いだされたことから、将来は育種的手法の1つとして期待できると思われる。

(2) カルス誘導試験

試験①②ともオーキシシン (NAA、2.4-D) を含む培地では容易にカルスが形成され、含まない培地ではカルスは全く見られなかった。このうちオーキシシンのみを含む培地では黄白～黄褐色のカルスとなり、また増殖の程度も小さかった。BA と混用した区では淡緑色の柔らかいカルスが誘導された。これらのカルスをホルモンフリーの培地に移植したところ、NAA 添加区由来のカルスは一部で発根が見られ、BA 0.2 + NAA 0.2 mg / 1 添加区由来のカルス 1 個から茎葉の分化が見られたが、これらは完全な個体にまで再生しなかった。

ワサビのカルスはホルモンフリーの培地で長期間継代を行うことで再分化個体を形成するという報告が幾つかなされているが、その再生率は低く、増殖目的に利用するためにはカルスの EC 化や不定胚誘導など何らかの操作が必要であると思われる。また再生の程度はカルスを形成させたときの条件によっても異なると言われており、この関連についても今後考慮する点であろう。

3 発根、馴化苗作成方法の検討

(1) オーキシシン類濃度別の発根

発根率についての結果は表-7 のとおりであった。最終的な発根率では IBA が 89～100 % で濃度差との関連はみられなかったが、NAA では 11～100 % と大きく差があり、特に 0.5 mg / 1 以上の濃度では著しく発根率が低下した。発根経過でみると、ともに初期の段階では 0.01 mg / 1 が早く、80 % に達する段階では 0.04 mg

表-7 オーキシシン類濃度別の発根

発根率 濃度	30 %		50 %		80 %		最終発根率 %	
	IBA	NAA	IBA	IBA	IBA	IBA	IBA	IBA
0	15日	22日	22日	22日	24日	26日	100	90
0.01	14	16	26	19	38	24	90	100
0.04	14	15	17	16	20	20	100	100
0.07	20	16	22	19	31	19	89	100
0.1	18	20	18	22	25	27	100	95
0.5	22	25	22	46	26		100	60
1.0	18	35	18	37	26		100	56
2.0	18		22		28		89	
5.0								11

／1 付近が早く、IBA、NAA の差は見られなかった。NAA については 0.5 mg / 1 以上の濃度では根の伸長が悪く幼植物の生長も不良であったが、IBA の場合は 2.0 mg / 1 まで正常に生長した。この結果では 0.04 mg / 1

までの低濃度で使用する場合には IBA・NAA と同じような効果を示した。最終発根率から、NAA については阻害を起こさない添加濃度は 0.1 mg / 1 程度であることがわかった。IBA は高濃度で添加しても NAA ほど阻害効果が現れていない。ワサビに限らずオーキシシンは普通低濃度では発根を高濃度では脱分化を促進し、また種類によって発根・カルス化などの程度は異なることが知られている。オーキシシン類を単独で添加したこの実験では、IBA はおもに発根に利用し、NAA は濃度によって使い分けることが考えられた。

(2) 発根程度別土壌馴化

発根程度による馴化の状況については表-8 のとおりであった。調査時の活着率はいずれも 100 % であった。生長量では、調査時に移植後 1 カ月しか経過していないため新葉が増加せず、葉柄数は移

植時に枯れたものもあったため全体ではわずかに減少している。ただし葉は生長し葉柄長も大きくなっており生長が停止したわけではない。活着率も全区で良く、ワサビの場合発根したものであれば土壤馴化は比較的容易であると思

われる。また根の伸長度ごとの活着率の差がさほど現れなかったことから、ワサビの馴化は発根後はいつ行っても良いと考えられた。

表-8 発根程度別土壤馴化

根長 (cm)	供試数 (本)	馴化操作時		調査時		活着数 (本)	活着率 (%)
		葉柄長 (cm)	葉柄数 (本)	葉柄長 (cm)	葉柄数 (本)		
0.8	15	4.4	7.4	8.2	5.4	15	100
2.2	14	5.4	8.1	10.3	4.9	14	100
3.4	9	5.6	9.8	7.7	5.3	9	100

IV まとめ

ワサビの組織培養では、外植体の殺菌がやや困難であったが、それ以降の継代培養や増殖については特に問題はないようである。ただし通常の分けつを利用した増殖では、移植時の切り分け方にもよるがそれほど大きな増殖率でない。この点については、葉柄毎に分割する方法で、増殖は分けつだけの時の2倍以上になることを確かめた。これに対し、系統保持または大量増殖方法として検討した苗条原基作成であるが、得られた苗条原基はかなり不安定な物であり、今のところ利用は困難であった。

また大量増殖と育種的手法の両面を期待して実験を行った薬培養、カルス形成であったが、いずれも培養は可能であったもののその後の再分化が見られず、カルス化後の培養方法についての検討が不十分であったといえる。

組織培養からの馴化苗作成について、まずワサビの発根では今回使用したIBA・NAAのうち、発根に適する添加濃度に幅のあったIBAの方が使用しやすいといえる。また馴化させる場合発根後の時期について、実際には長い根の場合移植の際に痛みやすく、また付着する培地による腐敗が起きやすい、根の伸長に時間がかかるなどの点から、発根後はすぐ馴化を行う方が良いと思われる。発根率、活着率がともに高いのでワサビの馴化苗作成は容易であると考えられた。

V 終わりに

組織培養におけるワサビ苗の増殖には幾つかの問題が残された。まず外植体の殺菌から初代培養の効率が低いことである。これは以降の増殖に対し、より負担がかかることになる。また増殖率を飛躍的に高める培養方法は見いだせなかった。しかし培養個体の分割による増殖について、腋芽を有効に利用することで増殖率を向上させたことで、一応増殖方法としては確立したと考えられる。今後はこの組織培養苗が、どのような形でワサビの生産に活用できるかについて、コスト面などでの検討が必要になるだろう。

引用文献：

- 1) 北村四郎、村田源：原色日本植物図鑑(中)、176、1961
- 2) 山田康之、岡田吉美：植物バイオテクノロジー、22~24 118~123、1986