

組織培養による山菜の増殖

藤原直哉・小林一貫*

Multiplication of wild plants by tissue culuture.

Naoya FUJIWARA・Kazumichi KOBAYASHI

藤原直哉・小林一貫：組織培養による山菜の増殖 岡山県林試研究報告14：63～72, 1998 岡山県内に自生している山菜のうち、ヤマウド、シオデ、モミジガサ、ゼンマイについて、大量増殖と育種材料の確保を目的に組織培養を行った。その結果ヤマウドは葉片を2,4-D 0.5mg/lを含むMS寒天培地で培養するとカルス塊を生じ、ホルモンフリーの1/2 MS寒天培地に移すと胚様体を経由してクローン苗が再生した。再生率は系統によって異なり、再生したクローン苗の順化は困難であった。シオデは脇芽を1/2 MS寒天培地に挿しつけると不定芽を生じ、不定芽はNAA 1 mg/l及びBA 2～3 mg/l含むMS寒天培地で培養するとカルス塊を生じ、ホルモンフリーの1/2 MS寒天培地に移すと多芽体を生じた。

多芽体はIAA 2 mg/l含む1/3 MS寒天培地で培養すると発根した。再生したクローン苗はミスト下で順化することが可能であった。モミジガサは腋芽を1/2 MS寒天培地に挿しつけると不定芽を形成し、同時に茎部から発根した。再生したクローン苗はミスト下で順化した。ゼンマイは外植体の殺菌が困難であったため、孢子培養を行った。実葉から孢子を採取し、素寒天培地に散布するとほぼ全数が発芽した。これらは1/2 MS液体培地で培養すると前葉体を生じ、成長した前葉体から幼植物体と根が発生した。

キーワード：組織培養、ヤマウド、シオデ、モミジガサ、ゼンマイ、カルス、胚葉体、腋芽、孢子、前葉体

I. はじめに

岡山県内における平成8年次における特用林産物の生産額は、68億27百万円であり、その内訳はシイタケ、マツタケなどのキノコ類が93%，残り7%がコウゾ、ミツマタ、薪などの非食用のもの及び、クリ、山菜類等で4億72百万円となっている(岡山県農林部林政課, 1997)。このうち山菜は、一般に冷涼な環境を好み、都市近郊よりむしろ山間地域の気候に適する作物の一つである。また、流通ルートの発達と食生活の多様化から、山菜は嗜好品としてより、一般家庭の野菜と同様に位置付けられるようになってきた。このような状況から、山菜の中でも特にヤマウド、タラノメ、ゼンマイ、ワラビの生産は全国的に人工栽培が進む傾向がある。

本県でも真庭地方を中心とした県北部で、主に大阪市場を消費地とした山菜の生産が盛んである。しかし、これら山菜の生産は依然として自生地に依存し、栽培技術や優良種苗の安定的な確保等の課題も多い。また、種子の稔性が悪いものや挿し木や株分け等では増殖の困難なものも多く、山菜の生産を行う上で、その種苗確保にも多大な労力を必要とする。一部の山菜では天然資源の乱獲も目立ち、自生地の消滅も危惧されている。

そのため、本研究では岡山県内に自生する山菜のうち、ヤマウド、シオデ、モミジガサ、ゼンマイについて、種苗の大量培養と優良品種を作出するための育種材料の確保を目的として、それぞれの組織培養の基礎条件の解明、特に生産コストの低減と省力化を目指し、順化条件の解明に取

り組んだ。

なお、本研究はH. 2～9に実施された「地域特性品種育成事業」とH. 4～8に実施された「組織培養による山菜等の増殖条件の解明」により行ったものであり、報告の一部は日本林学会関西支部第47回(藤原・小林, 1997)、48回大会(藤原, 投稿中)で発表した。

II. ヤマウドの組織培養

1. 目的

ヤマウド(図-1)の増殖については、実生が中心に行われており、実用上大きな問題は報告されていない。しかし、優良な形質を維持、増殖していくためには挿し木、株分け



図-1 展開したヤマウド

*岡山県真庭地方振興局

による増殖が必要であるが、これは非常に効率が悪い。そこで、クローン苗の大量増殖と育種材料の確保を目的として組織培養を行った。成長点を利用した組織培養は既に行われているため(天野・河合 1990)、本実験ではカルス経由の再生方法を検討した。特に培地に添加するホルモンの最適濃度、培養期間を検索し、最適条件で培養し、クローン苗の再生率を県内自生地から選抜した13系統で比較した。また加湿による順化を試みた。

2. 材料と方法

1) 材 料

岡山県下に自生するヤマウドのうち、芽の発生時期や大きさを基準に13系統を選抜した(表-1)。

これらを株分けによりクローン増殖させ、試験地内に定植して実験に供した。特に再生方法の検討には、最も成長の早い系統(岡山県12号)を用い、1996年5月27日に展開したばかりの新鮮な葉を採取した(図-2)。

2) 方 法

2,4-Dを用いると葉片からカルスが形成されることが報告されているため(小林 1995)、採取した葉片を水道水と市販の中性洗剤で良く洗浄し、滅菌水中に30分間保存した。これを常温で70% エタノールに5秒間浸し、ツイーンを滴下した次亜塩素酸カルシウムの飽和水溶液の濾液で10分間

表-1 選抜したヤマウドの系統

系 統 名	採 取 地
岡山県 1号	岡山県真庭郡 美甘村内
" 2号	" " 川上村内
" 3号	" " 中和村内
" 4号	" 苫田郡 加茂町内
" 5号	" " 富村内
" 6号	" " 奥津町内
" 7号	" " 上斎原村内
" 8号	" " 阿波村内
" 9号	" 英田郡東栗倉村内
" 10号	" " 西栗倉村内
" 11号	" 真庭郡 川上村内
" 12号	" 苫田郡 加茂町内
" 13号	" 英田郡西栗倉村内



図-2 外植体に用いた葉

表面殺菌を行った。容器は茶漉しを入れた300mlのビーカーを用い、マグネチックスターラーで攪拌した。葉片は殺菌剤を変える毎に、滅菌水で5分間緩やかに洗浄した。この葉片を少量の滅菌水を入れたシャーレ内で5mm角に切断し、異なる濃度のホルモン剤(2,4-D)を含むMS寒天培地に各50枚を置床した。これを気温24℃、照度4,000LUX、16時間日長の条件下で培養し、カルスの形成に最適なホルモン濃度を検討した。また、葉片を一定のホルモン濃度で培養し、形成されたカルスを10日毎にホルモンフリーの1/2 MS寒天培地に移して変化を観察し、培養日数とクローン苗の再生率を調べた。さらに、検索された条件下で殺菌した13系統のヤマウドの葉片各100枚を培養し、クローン苗の再生率を比較した。再生したクローン苗については生育の良好な個体132本を選抜し、培養器からパーミキュライトを入れたポットに移して加湿による順化を試みた(図-3)。また、培養器中のクローン苗を1年間冷蔵庫(気温2℃、暗黒下)で保存し、1997年12月9日に根株26株を寒天ごと鹿沼土と腐葉土を等量ずつ配合したポットに移して90日間温室内で育成し、順化した。

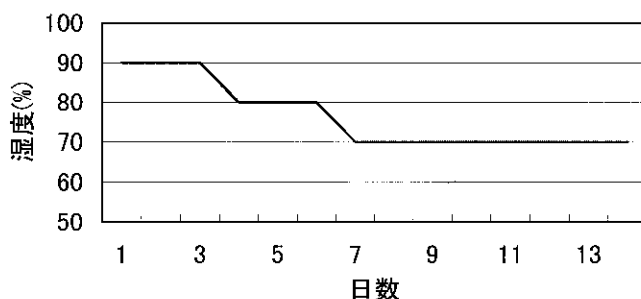


図-3 順化プログラム

3. 結果と考察

1) 培 養 条 件

ヤマウド(岡山県12号)の葉片を20日間培養したときのカルスの形成状況を表-2、図-4に示す。

カルスの形成は培養3日目から始まり、葉片の切断面から増殖することが確認された。

ホルモン剤として使用した2,4-Dは、濃度が0.5mg/lの時に最も高いカルスの形成率を示し、20日後には団子状のカルスを形成した。ホルモンフリーでも切断面に微量のカルスは形成されたが、団子状のカルスには至らなかった。また1.0mg/lの時では、培養4日目から葉片の褐変が始まり、10日後には全数が褐変した。何らかの代謝異常を起こしていると思われるが、原因は不明である。このことから、使用する2,4-Dの濃度は0.5mg/lが適当であることが判明した。

次に培養日数を変え、2,4-D 0.5mg/l 含む MS 寒天培地で培養したときの再生率を表-3に示す。

培養20日から50日の広い範囲で胚様体の形成が起こり、ホルモンフリーの1/2 MS寒天培地で継代培養を行って30日でクローン苗が再生した(図-5)。

また同組成の液体培地で、20日間静地培養しても同様に胚様体が得られ(図-6)、1/2 MS寒天培地に移すとクロ

表-2 2,4-D濃度とカルスの形成

2,4-D濃度 (mg/l)	供試数	カルスの形成数	形成率 (%)
0	50	0	0
0.1	50	31	62
0.5	50	48	96
1.0	50	0	0

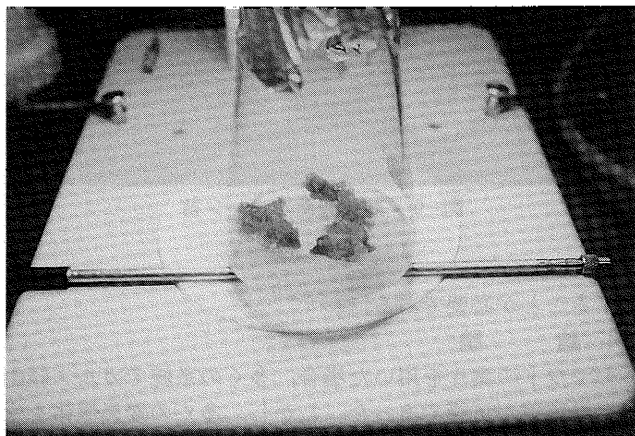


図-4 形成されたカルス

表-3 培養日数とクローン苗の再生

培養日数 (日)	供試数	再生数	再生率 (%)
20	13	7	54
30	14	2	14
40	19	0	0
50	13	6	46

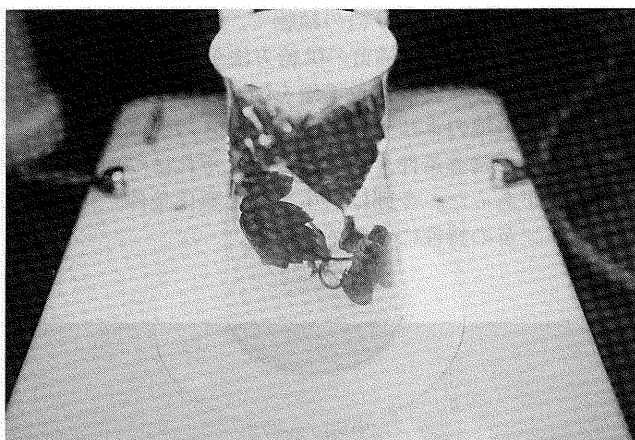


図-5 再生したクローン苗

ーン苗が再生した。しかし、胚様体の発育ステージや形成量は試験個体によって大きく異なった。なお、液体培養を行うと、培養液中にニンジン培養細胞での胚様体形成時に出現する魚雷胚型の細胞塊と酷似した細胞塊が確認され、これらの細胞塊は初期胚様体として成長している可能性が高い。寒天培地では形成されたカルスの表面にこの細胞塊を確認することは困難であり、今後は観察の容易な液体培

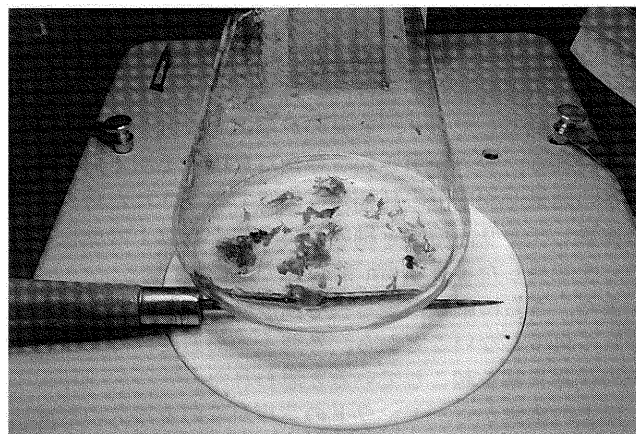


図-6 形成された胚様体

養を行うことにより胚様体の形成過程を確認し、細胞を分画する必要がある。

再生率は20日間培養した時に最も高く、50日間の培養では52%が再生した。しかし、40日間では再生が起こらず、カルスが褐変を起こし、胚様体は形成されなかった。実験は同年7月1日、2日の3回行ったが、カルス化が遅れ、培養30日経過後も団子状のカルスには至らず、50日後には褐変した。原因として外植体に用いた葉片の硬化、分化が進み、脱分化が困難になったことが考えられる。このため、本実験では最適な培養日数を判断することは不可能であった。むしろ、材料の状態によって脱分化やカルスの形成は大きく左右されるため、用いる材料には均一性が求められる。ヤマウドの葉片はこの条件を満たさず、本実験の外植体に用いることが不適当であることが示唆された。

得られた胚様体の多くは変異個体であり、これは継続して培養しても30日以内に褐変した。形態の異常では、不定芽、不定根の形成が不十分であり、正常な個体と比較し、特に不定根の発達が著しく阻害されていた(図-7)。

シロイヌナズナの例では、根の発生に異常を生じた突然変異体に一定のパターンがあり、変異体では胚発生時に受精卵が2細胞に分裂する際の分裂面、あるいは2細胞から4細胞になる時の分裂面に異常が生じた結果として子葉や



図-7 変異した個体

根の分化が阻害される現象や、根の形成、胚軸の形成に関与する遺伝子の存在が報告されている(石黒・岡田, 1994)。ヤマウドの変異体の形態は、これらシロイヌナズナの突然変異体と酷似しており、変異の形態にも一定のパターンが観察される。変異が引き起こされた原因は不明であるが、観察の結果ヤマウドの胚様体も肉眼で確認された時点で既に変異しており、培養を継続しても、それ以上の分化は起こらず変異したまま2 cm 前後まで成長した。

また、さらに継代培養しても緩慢に褐変し、クローン苗として再生しないことから、外観上の形態だけでなく何らかの代謝異常を起していると思われた。

以上の実験から、ヤマウドの葉片からのカルスの形成に最適なホルモン濃度は、2,4-D 0.5mg/l であり、培養日数は20日から50日と材料によって幅があることが判明した。カルスはホルモンフリーの1/2 MS 培地に移植すると胚様体を形成した。

なお、ホルモン剤として使用した2,4-Dは細胞に対して強力に作用し、少量で効果を示すことが知られているが、一方で遺伝子変異を引き起こしやすい。一般に植物に対して大きなストレスを起し、その性質を利用して除草剤としても使用されている。本実験でも多くの変異個体が見られたため、他のホルモン剤の使用について検討する必要がある。

系統別に培養した時の再生率を図-8に示す。

系統により再生率は大きく異なり、最も高い再生率を示したのは岡山県4号で59%を示し、低いものでは岡山県9号の1%を示した。これは同じ培養方法を用いた場合でも、系統によりクローン苗を得ることが困難であることを示している。このような系統は、従来の増殖方法である実生や挿し木、株分けの方が効率が良い可能性があるため、大量増殖を目的とした組織培養を行うには、コスト、作業量を比較した上で実施する必要がある。

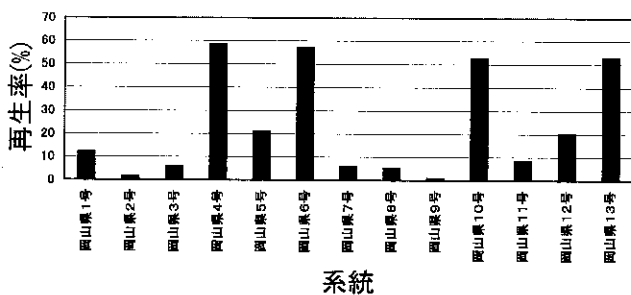


図-8 系統別の再生率

2) 順化条件

順化試験の成功率は非常に低く、加湿した順化条件で順化した個体は12個体に過ぎなかった(図-9)。また、温室内で育成したポットの発芽率を1998年3月9日に調査した。実験に供試した26株のうち、8株が発芽したが、依然として順化率は低く、実用性は期待できなかった。

特に培養容器から順化室に移動後1日以内に葉の先端から褐変するものが多く、加湿による順化は困難と思われる、ヤマウドの生理的な性質を充分調査した上で順化方法を検

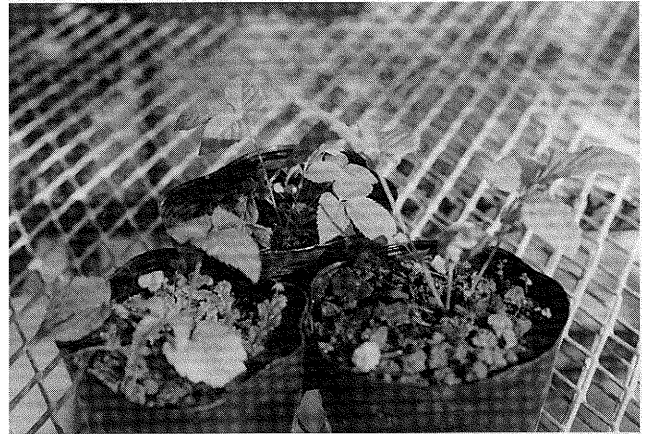


図-9 順化したクローン苗

討することが必要である。

4. 結 論

ヤマウドの葉片を用いた場合、多くの系統でカルス経由の組織培養が可能であった。しかし、多くの変異個体を生じ、正常な個体を選抜する必要があった。また、系統間で再生率に大きな差があり、大量培養を行うためには、系統の選抜が必要であった。カルスの形成からクローン苗の再生まで60日程度と短期間であり、増殖効率の良い系統であれば、クローン増殖の方法として充分実用性があると思われる。しかし、通常加湿による順化は困難であり、特に培養期間を短縮し、実用化を図るためにも今後簡便で確実な順化方法を開発する必要がある。

III. シオデの組織培養

1. 目 的

シオデ(図-10)はユリ科の植物で、種子の稔性が悪いため産地化形成へ向けた種苗の供給方法が確立されていない。そこで組織培養による大量増殖を図り、早期に種苗を育成するため、培地のホルモン組成とカルスの形成条件、不定芽、不定根の誘導条件、順化条件それぞれについて検討を行う必要があった。今回は再生条件と順化条件、作出されたクローン苗の特性について述べる。



図-10 野生のシオデ

2. 材料と方法

外植体には、1994年7月29日に予め岡山県苫田郡上齋原村内で採取したシオデの雌株を使用し、葉腋、茎、葉、つる、やくの部位別に切り分け、70% エタノールで5秒間、1%のアンチホルミンで15分間表面殺菌し、実験に供した。得られた葉腋部50本をホルモンフリーの1/2 MS 寒天培地に挿し付け、クローン苗の誘導を試みた。また、NAA 0~3.0mg/l と BA 0~3.0mg/l の組み合わせで、カルスの形成状況を調べた。

形成されたカルスはホルモンフリーの1/2 MS 寒天培地で継代培養し、不定芽、不定根の形成状況を調べた。

再生したクローン苗81本については、培養器からパーミキュライトを入れたポットへ移し、順化室で覆いを被せ、市販の液体肥料(ハイポネクス1,000倍液)を与えながら育成した。

カルス経由のクローン苗の順化は培養時と同じく、気温24℃、照度4,000LUX、16時間日長で2週間をかけて行った。湿度は、90% から2日おきに10% ずつ下げ、2週間目から70% に固定した(図-3)。

また、培養器中のクローン苗を1年間冷蔵室(気温2℃、暗黒下)で保存した。そして、1997年12月9日に培養器中の根株58株を寒天ごと取り出し、鹿沼土と腐葉土を等量ずつ配合したポットに直接植え付け、以後90日間温室内で育成した。

さらに野外での育成試験として1996年9月6日に、育成したポット苗15個体を実生苗30個体とともに、林業試験場内のスギ壮齡林の林縁の黒ボク土壤に植栽し、その後の育成状況を観察した。

3. 結果と考察

1) 培養条件

葉腋を1/2 MS 寒天培地に差し付け、不定芽の伸長について調査した。不定芽の伸長は3日目から始まり、7日後には全ての個体から不定芽の伸長が見られた(図-11)。

また、NAA 1mg/l と BA 2~3 mg/l の組み合わせで葉腋部にカルスを形成させた(表-4)。カルスは非常に硬く、液体振とう培養や超音波ホモジナイザーで分割、破砕することは出来なかった。また、ナイロンメッシュを通

表-4 カルスの形成状況

BA (mg/l)	NAA(mg/l)					
	0	0.1	0.5	1.0	2.0	3.0
0		+			-	
0.1			-		-	
0.5	-	--	-		-	-
1.0			-	-	-	-
2.0	+	+	-	++	-	-
3.0		++		+++		

基本培地：1/2MS 培地
+++：カルス大 ++：カルス中 +：カルス小 -：変化無し
空欄：コンタミネーション

過することもなく、胚葉体を誘導することも出来なかった。形成されたカルスは1/2 MS 培地に移植したが、1ヶ月後には多芽体へと変化し、多数の不定芽が伸長した。肥大した多芽体については、メスで切断して分割した。なお、カルスの形成に関するホルモンの組み合わせについては、雑菌の汚染が生じたため、最適な濃度、組み合わせについては再度検証を必要とする。

発根処理は IAA 2 mg/l を含む 1/3 MS 寒天培地を用いた(山本, 1995)が、葉腋部から得られた不定芽には変化が見られず、直接クローン苗を再生するには至らなかった。しかし、カルス経由の多芽体では、30日目までには11%の個体、43日後までには89%の個体で不定根が形成された(図-12)。

再生したクローン苗は、不定芽の大きさや不定根の発達に個体差が観察され、形質的に揃った苗を得ることが出来なかった(図-13)。一般的にカルスを經由してクローン苗を作出すると変異個体が多くなるとされ、大量培養を目的とした安定的なクローン苗の生産には、茎頂培養が用いられる。しかし、育種を目的とした細胞培養や遺伝子導入を行うためには、カルスを經由する再生経路の開発が求められる。パーティクルガン法は成体に対しても形質転換が可能であるが、カルスを形質転換の対象に用いた方が成功率が高く、アグロバクテリウム法でも同様の傾向がある。エレクトロレーション法はカルスからの再生系が無くては用

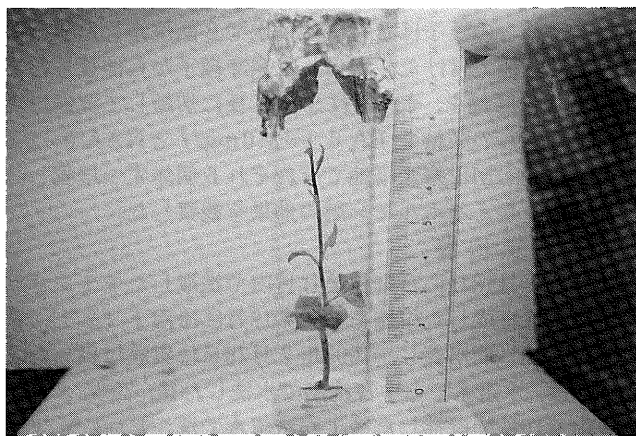


図-11 腋芽から伸長した不定芽

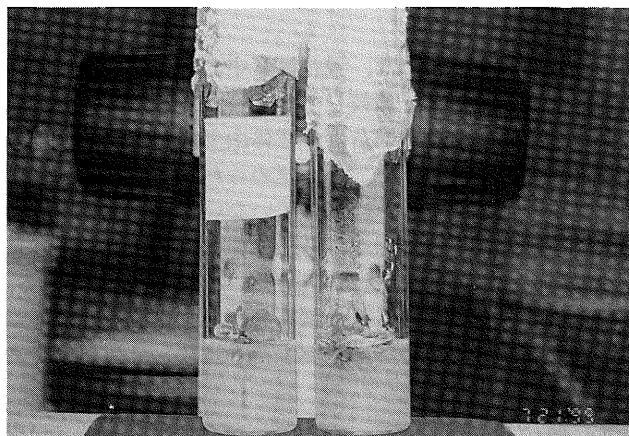


図-12 形成した不定根

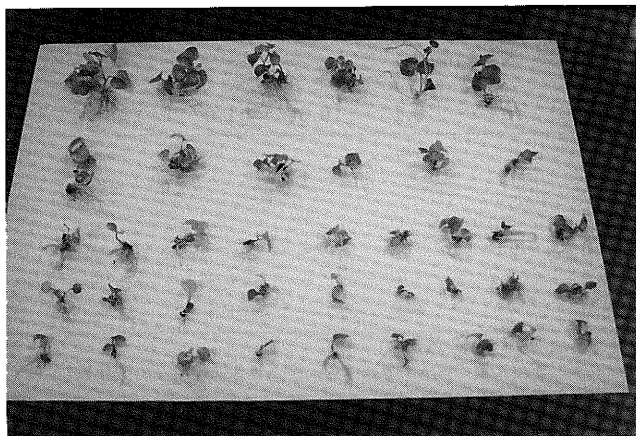


図-13 クローン苗の形態

いることの出来ない技術であり、多くの植物でカルスを経由した安定な再生経路の開発が求められる。

2) 順化条件

順化室では、パーミキュライト上に糸状菌が繁殖した。防除のために0.1%のベンザルコニウム溶液を1日1回噴霧して67個体が順化した。また、1年間冷蔵室で保存した株について、1998年3月9日に温室内で育成した根株の発芽状況を調査したところ、43個体が発芽し、シオデは1年間程度冷蔵保存に耐えることが可能で、低温処理による順化方法が有効であることが示された。



図-14 順化したクローン苗

得られたクローン苗は、現在観察中であるが(図-14)、生育は旺盛で実生苗と比較しても成長が劣る点は認められない。しかし、クローン苗は多芽体由来のため、形態上実生苗よりも分結数が多いことが認められている。発芽した芽が食用に適した大きさに達していないため、実生苗との比較は検証されていないが、多芽体を経由したクローン苗は、食用とされる芽の収量が実生苗より多い可能性がある。この点については、さらに検証を必要とする。野外に植栽したクローン苗については、実生苗と比較して観察中である。

4. 結論

以上のように、カルスを経由してクローン苗を作出する

ことが可能であったが、育成には8ヶ月を必要としているため、優良種苗を大量培養する目的を満足するためには胚葉体の誘導など、さらに培養期間を短縮する必要がある。

カルスが非常に硬いため、胚葉体の誘導のためのカルスの裏漉しや細胞の分画は茶漉しなど金属製品を用いることが必須の条件である。

ヤマウドでは、系統により増殖率が大きく異なったが、シオデにおいても系統により何らかの差異があると推測される。野生の優良系統の収集、比較が必要である。現段階の応用方法としては、種子繁殖の補助的な手段や検定材料の作出に用いられるに止まる。

IV. モミジガサの組織培養

1. 目的

モミジガサはキク科の山菜で(図-15)、種子の稔性が悪く、株分け、挿し木による増殖技術も困難であった。そのため、種苗の確保を目的として組織培養に取り組んだ。



図-15 野生のモミジガサ

2. 材料と方法

モミジガサの組織培養については、以下の3通りの方法を用いたため、それぞれに従って記述する。

1) 胚軸培養

1991年1月18日に真庭郡美甘村内で採取した種子を1993年3月2日に70%エタノールで5秒間攪拌し、滅菌水で1回洗浄した後、1%アンチホルミンで20分間表面殺菌を行った。これらの種子はさらに滅菌水で2回洗浄した後MS寒天培地に植え付けた。得られた発芽種子から伸長した7~10mmの胚軸を、それぞれ5mm長に切断して実験に供した。これらの胚軸をBA 0.1~3.0mg/lとNAA 0~3.0mg/lを含むMS寒天培地でそれぞれ6個体ずつ培養し、胚軸組織に与えるホルモン剤の効果を観察した。

2) 茎頂培養

1991年1月18日に真庭郡美甘村内で採取したモミジガサの種子から育成した根株を1992年12月に冷蔵下(2℃、暗黒下)で90日間培養し、1993年2月28日に実験に供した。これらは、水道水でと中性洗剤で水洗した後、70%エタノール中で15秒間攪拌した後1回滅菌水で洗浄し、1%アンチホルミンで20分間表面殺菌を行った後、1回滅菌水で洗

浄した。根株は顕微鏡下で茎頂部を摘出し、NAA 0.5~3.0 mg/l と BA 0.1~3.0 mg/l を組み合わせた36通りの MS 培地に各6個体を置床し、気温23°C、照度4,000 LUX、12時間日長の条件下で培養した。

また腋芽培養として、1995年5月30日に温室内で育成した実生由来のポット苗を用いた。これらは腋芽を含む節に切断した後、同様の表面殺菌を行い、同じ培養条件下でホルモンフリーの1/2 MS 寒天培地に置床した。雑菌汚染された個体を除き、実験には20本の腋芽を供試した。

腋芽を培養して得られたクローン苗は、水道水で良く洗浄した後、パーミキュライトを入れた容器に植え付け、水道水を満たしたバットに浸水して覆いを被せ、順化室で加湿して順化を行った。順化方法はヤマウドやシオデと同様な方法で、2週間をかけて徐々に湿度を下げた(図-3)。また、同年7月寒天から取り出し、鹿沼土を入れたプランターに直接植え付け、温室内で育成して順化期間の短縮を図った。

3) 葉片培養

1993年7月20日に温室内で育成したポット苗の花軸に生じた葉を外植体に用いた。茎頂培養と同じ方法で表面殺菌を行った後5 mm 角に切断し、NAA 0~3.0 mg/l と BA 0~3.0 mg/l を組み合わせた MS 寒天培地に置床した。培養条件は茎頂培養に準じた。

3. 結果と考察

1) 胚軸培養

培養113日後の同年6月23日にカルスの形成状況を観察した。雑菌の汚染が生じ、詳細な傾向を把握することが出来なかったが、BA 1.0~3.0 mg/l と NAA 0.1~1.0 mg/l の組み合わせでカルスが良く形成された。特に BA 3.0 mg/l と NAA 0.1 mg/l では葉の分化が確認された。しかし、その後の観察では、それ以上の変化は認められなかった。雑菌の汚染が生じ、その後の変化が確認されなかったため、得られた結果についても明言することは出来ないが、培養期間が100日以上にのぼるにも関わらず、特にカルスに変化が起らないことから、実用的なクローン苗の再生方法としては期待できないと判断された。

2) 茎頂培養

同年9月9日まで観察を続けたが、ほぼ全ての組み合わせで切断面に微量のカルスの形成が認められた。しかし、カルスの肥大も組織の分化も認められなかった。

腋芽の培養では、20本中16本が培養10日後から不定芽の伸長を始め、うち14本が培養21日後から発根した(図-16)。そのまま30日間培養を継続し、不定芽、特に不定根の発達を促した。

加湿による順化では、実験に供した7個体中5個体が順化した。順化処理を開始して3日目に展開した葉に褐変が見られたが、不定根が発達した個体の順化には大きな影響を及ぼさなかった。しかし、不定根の発達が貧弱な2個体は枯死した。

プランターに植え付けたクローン苗は、10ヶ月後の観察で2本が発芽した(図-17)。

5個体の枯死は順化を行った時期の気温が高いことが原

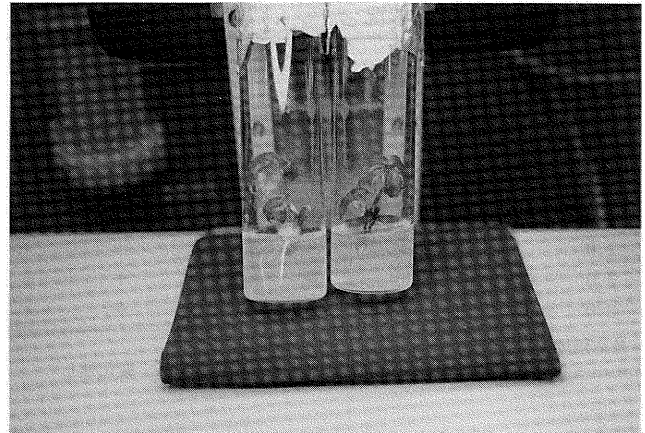


図-16 腋芽の培養



図-17 発芽したクローン苗

因と考えられ、気温が低下する11月以降に実施する事が望まれるが、現段階では加湿による順化方法が効果的である。特に腋芽由来のクローン苗の再生は、培養から再生まで2ヶ月と短期間であるため、大量増殖に適した増殖方法として実用性が高い。ただ、外植体の殺菌が困難で、大量の無菌苗を得にくいいため、無菌播種を行うことで組織培養用の無菌苗を作出し、腋芽を切り分けて増殖させる方法が効率的である。一方でモミジガサの増殖方法について、腋芽を利用した挿し木増殖は容易とされている(鈴木、未発表)。同じ成体を使用した場合、試験管内での挿し木増殖とも言える腋芽培養の優位性は、培養期間の短縮に限定される。腋芽培養を用いるに当たっては、両者の生産コスト、長短所を比較する必要がある。

3) 葉片培養

1993年1月15日までの観察で、以下の結果が示された(表-5)。

BA 無添加あるいは低濃度では、カルスの形成が微量であった。NAA は明かな傾向を示さなかったが、BA 0.5 mg/l と NAA 0.1~0.5 mg/l の組み合わせでカルスの形成が良好であった。観察を継続したが、組織の分化は確認されなかった。

表-5 カルスの形成状況

BA (mg/l)	NAA(mg/l)					
	0	0.1	0.5	1.0	2.0	3.0
0	-	-	-	-	-	-
0.1	-	-	-	+	-	+
0.5	-	++	+++	+	-	+
1.0	+	+	+	-	-	+
2.0	+	++	+	++	+	+
3.0	+	-	+	++	+	++

基本培地：MS 培地
+++：カルス大 ++：カルス中 +：カルス小 -：変化無し

4. 結 論

モミジガサでは、腋芽の試験管内挿し木が効率的であり、順化についても加湿法により簡便に行えた。短期間に大量増殖を行うには、種子繁殖と組み合わせることが考えられた。しかし、同じ腋芽を利用した従来の挿し木でもクローン苗が作れる。むしろ従来法の利点の再確認を行った結果となった。

V. ゼンマイの胞子培養

1. 目 的

ゼンマイ (図-18) の種苗生産の労力の軽減と大量増殖を目的とした組織培養を行ったが、外植体を殺菌することが困難で成長点の摘出や組織の無菌化が困難であった。また組織のカルス化も極めて微量であったため、実葉に形成される大量の胞子の培養を行った。野外でも胞子はミズゴケに散布すると発芽し、4~5年で種苗を育成することが出来るが、乾燥や高温障害、雨滴による流亡など気象害を受けやすい。これらのことから、育成環境を制御出来る試験管内での胞子培養を行った。



図-18 野生のゼンマイ

2. 材料と方法

予備実験として、1995年5月12日に苗畑で育成した選抜品種 (表-6) の胞子を採取した。

胞子の培養方法については、過去にもいくつかの文献が見られ(原田ら, 1993), これらを参考にした。ゼンマイは食用にする裸葉が展開した後に綿毛にくるまれた実葉が徐々

表-6 選抜したゼンマイの系統

系 統 名		採 取 地	
岡山県	1号	岡山県	津山市内
"	2号	" 真庭郡	勝山町内
"	3号	" "	落合町内
"	4号	" "	湯原町内
"	5号	" "	" 内
"	6号	" 苫田郡	加茂町内
"	7号	" 勝田郡	勝央町内
"	8号	" 英田郡東栗倉村	内
"	9号	" "	西栗倉村内
"	10号	" 久米郡	旭町内
"	11号	" 川上郡	成羽町内
"	12号	" 苫田郡	鐘野町内
"	13号	" "	加茂町内

に展開する。展開途中の実葉を採取し、紙袋に入れて室温で14日前後静地すると大量の胞子が落下してくる。胞子囊などのゴミを取り除いた後、胞子100mgを実験に供した。脱脂綿を割り箸に巻き付け、少量の胞子を付着させ、9cmシャーレに分注した1/2 MS寒天培地に落下させた。胞子は気温24℃、16時間日長下で培養し、顕微鏡で観察した。また胞子の保存期間を調べるため、胞子100mgを滅菌水300mlに懸濁し、30日間2℃で保存した。発芽胞子はMS寒天培地で培養し、発生した前葉体はMS寒天培地で継代培養した。

また、1997年5月16日に選抜された13系統それぞれの胞子を採取した。胞子は各100mgを100mlの滅菌水に懸濁し、50倍に希釈した後、うち2mlを9cmシャーレの素寒天培地に塗布した。胞子塗布後、クリーンベンチ内でシャーレの蓋を開放し、1時間風乾させて、胞子を寒天表面に定着させた。散布された胞子数を確認するため、トーマ血球計算板を用いて胞子密度を3回ずつ計測し、散布面積に換算した。

雑菌のコロニーが確認された時点で胞子を別のシャーレに移し、胞子を雑菌と分離した。発芽が確認された胞子は、10mlの1/2 MS液体培地を分注した100ml三角フラスコに移し、静地培養した。また胞子の保存期間を調べるため、胞子100mgを乾燥状態で樹脂製の試験管に入れ、温度別に2℃、-20℃、-80℃で30日間保存し、その後の発芽率を調べた。

発生した前葉体は同組成の培地で継代培養し、同年8月14日より幼植物体が発生すると、糖を除いたMS寒天培地で培養した。これらは同年12月24日より発根したのものから順に、糖を除いたMS液体培地を分注したミズゴケ上に移植した。

次にクローン苗を作出するため、1998年3月11日に、発生した幼植物体のイチョウ型の葉を少量の滅菌水に浮かべ、細かくメスで刻んでNAA 0~100uMとIBA 0~10uM, IBA 0~100uMとNAA 0~10uMを組み合わせたMS液体培地で14日間100 r.p.m.で振とう培養した。なお、培養器には5mlの管瓶を用い、倒立顕微鏡で培養物が明瞭に観察出来るように改良した。培地の分注量は、全量で1mlとした。

3. 結果と考察

実葉を構成している緑色の孢子嚢はブドウの房に似た形態で(図-19)、押し潰すと内容物として浸出液と孢子が確認された。茶色の孢子嚢は既に裂果して孢子が放出されており、孢子の「抜け殻」であった。脱脂綿に付着した孢子は、塊状や筋状に落下することが多く、シャーレに均一に散布することは困難であった。

散布された孢子は1日後には膨潤を始め、3~7日後には次々と発芽した(図-20)。

雑菌に汚染された個体を除き、ほぼ全数が発芽することが確認された。発芽した孢子は成長を続け、30日後には肉眼で確認する事が出来た。しかし、1年間寒天培地で継代培養を行ったが、幼植物体は発生しなかった。滅菌水中に懸濁し、30日間保存した孢子は全く発芽しなかった。

シャーレに散布された孢子の平均密度は、940個/シャーレであったが、雑菌のコロニーも多数出現したため、発芽孢子を分離するにはさらに希釈率を大きくする必要があった。

液体培地で培養した孢子は30日後には1cm前後の前葉体に成長した(図-21)。

前葉体は肥大を続け、多数の舌状の前葉体を形成した。前葉体の増殖については既に報告され(酒谷, 1989)、分割してもさらに前葉体を形成すると記述されている。分割さ

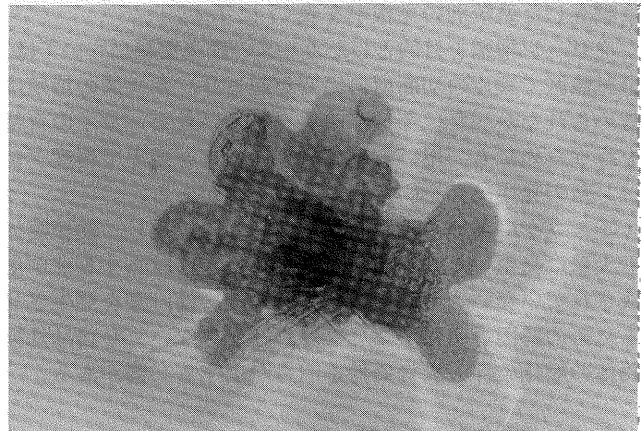


図-21 成長する前葉体

れた前葉体が単一のクローンであることを証明することは、DNAによる識別技術が考えられるが、従来のRFLP法では系統を判別するための適切な手法が確立していないため、現段階では困難と思われる。また予備実験では、MS寒天培地上で前葉体を継代培養しても全く幼植物体を得ることが出来なかったが、2回目の液体培養では培養を開始して90日前後から幼植物体が発生した。

ゼンマイやワラビなどのシグ植物の生活環では、孢子が発芽して前葉体が形成される。その後成長した前葉体上に造精器と造卵器が形成され、液体中を精子が泳いで卵に受精すると幼植物体が形成される。酒谷は、培養条件として受精には前葉体が湿潤な状態にあることが必要であると説明している。本実験の結果もこの報告の説明に沿うものと考えられ、幼植物体の発生を誘導するには液体培地を用いる必要があると結論付ける。孢子の保存試験では、2℃で保存した場合散布した孢子の半数が発芽したが、他の温度では孢子が褐変し、全く発芽しなかった。発芽率の調査を継続したが、2℃に保存した場合でも保存期間がそれ以上になると発芽は確認されなかった。これらのことから孢子は、採取後直ちに培養することが望ましい。

幼植物体の発生した前葉体からの発根は、MS寒天培地に移植後130日前後から始まった(図-22)。1998年2月26日

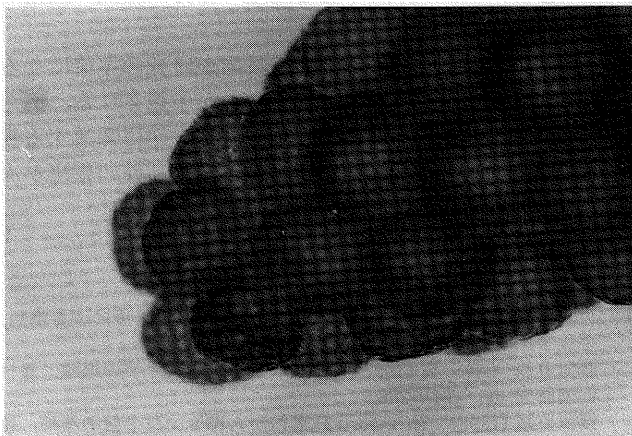


図-19 孢子嚢

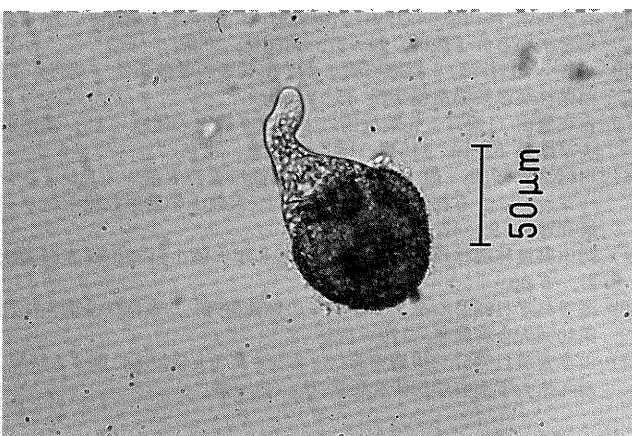


図-20 発芽した孢子

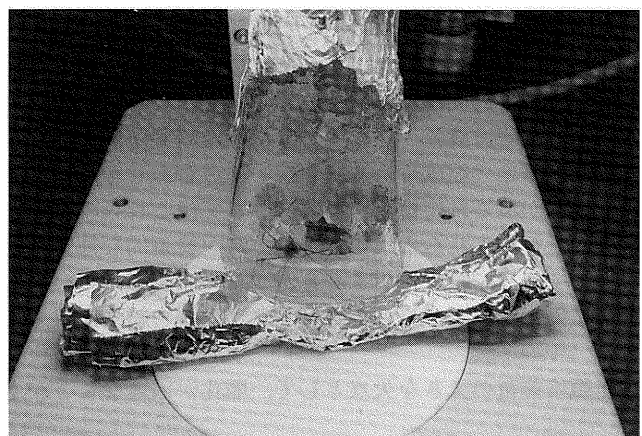


図-22 発生した幼植物体

に調査した系統別の発根率を表-7に示す。

クローン増殖を目的としたカルスの誘導実験については、全試験区で葉片の切断面の褐変が起り、カルスの増殖は認められなかった。今後バイテクを用いたゼンマイの育種を行うためにも、用いる部位やホルモンを変えて再度クローン苗の発生条件を明らかにする必要がある。

ミズゴケに移植された前葉体は旺盛に成長し、幼植物体も大量に発生した。しかし、未だ成長点に該当する芽が形成されていないことから、成長点培養には、芽を発生させるための誘因を明らかにしなければならない。今後は幼植物体の順化条件と成育条件を明らかにする必要がある。

表-7 前葉体からの発根

系統名	前葉体個数	発根個数	発根率 (%)
岡山県 1号	17	3	18
" 2号	73	11	15
" 3号	34	6	18
" 4号	32	10	31
" 5号	8	0	0
" 6号	0	0	0
" 7号	9	2	22
" 8号	72	9	13
" 9号	9	7	78
" 10号	32	12	38
" 11号	65	9	14
" 12号	15	2	13
" 13号	6	4	67

4. 結 論

これまでの実験結果から胞子を利用したゼンマイ幼苗の大量増殖については、胞子が大量に形成されることや条件が整えばほぼ全数が発芽すること、加えて培養が容易であることから、種苗生産の実用性は高いと考えられる。生産コストの低減も必要なことであるが、産地化形成を行う上で、山採りや株分けに必要とされる多大な労力を軽減することにこの技術の意義を見出すことが出来る。

VI. 総 括

本報告では、中山間地域における重要な作目である山菜のうち、ヤマウド、シオデ、モミジガサ、ゼンマイについて優良品種の大量増殖を目的とした組織培養の基礎条件と順化条件について述べた。それぞれについての技術的な問題点や今後の方向性は各項目に付加した。これらの山菜については、既に農業、林業各分野で組織培養が取り組まれており、培地の組成やホルモン剤の組み合わせ等基礎的な培養条件が示されている。実験に際してはこれらの文献を参考にした。これらの技術はそれぞれが普遍的な性質を持つものであり、特に作用させるホルモンの種類については過去に実施された多くの実験データが同様の結果に収束した。

組織培養苗の大きな欠点として、順化が困難なことが上

げられる。順化作業は組織培養の一つの壁であり、生産コストを引き上げる主要な要因にもなっている。本実験でも順化について検証したが、特にヤマウドは困難であった。植物の組織培養における環境調節に関する問題点とその解決方法についてはいくつかの報告があり、生産コストが高くなる原因やその低減方法、培養に関するガス環境、培地、光環境の影響が示されている(古在, 1987)。この報告の中ではさらに、種苗工場と加湿を中心とした順化装置の模式が示され、近い将来の植物工場の姿が窺える。組織培養に共通した今後の目標として、簡便で効率の良い順化方法を開発する必要がある。

生産コストに関して、例えば北海道上湧別町寒地園芸センターでは、アスパラガス組織培養苗を1本20円程度で農家に供給しているが、そのコストは250円掛かっている。シオデの試算例では1本70円とされる(川村・久島, 1996)、培養条件により単価は大きく変動する。培養技術が安定していないと試算できないため、不安定な再生系を用いることは出来ない。安定した再生系、培養技術の開発には、基礎研究が不可欠であり、加えて運用面に対する検証が求められる。

本報告では基礎的な培養条件と順化について取り上げたが、いずれも流通単価が安いと、生産コストを吸収することは困難と思われる。これらの技術を踏まえ、現段階では、検定クローンの作出や種苗生産の労力の軽減に技術の応用が限られている。

将来の展望として、遺伝子導入技術が研究の主流になると推測され、山菜も対象とされることが予想される。例えば耐虫性、耐病性、耐除草剤性など直接生産に関連する性質を付加し、「作り易さ」を目標とした優良品種の作出が次期の課題として考えられる。

引用文献

- 1) 天野孝之・河合(酒谷)昌孝(1990): 山菜の組織培養による増殖. 平成2年度奈良県林業試験場業務報告, 23pp
- 2) 藤原直哉・小林一貫(1997): 組織培養によるシオデの増殖. 森林応用研究 6, 207~208.
- 3) 藤原直哉(1998): In Vitorio 胚葉体からのヤマウド苗の増殖. 森林応用研究 7, 投稿中.
- 4) 原田牧人・野沢典子・庄司孝一・遊佐吉雄(1993): 組織培養によるゼンマイ (*Osmunda japonica*) の大量増殖. 宮城県農業センター研究報告 59, 12~19.
- 5) 石黒澄衛・岡田清孝(1994): 根の形成に関与する遺伝子. 植物の形を決める分子機構, 24~27. 秀潤社, 東京.
- 6) 小林一貫(1995): 組織培養による山菜等の増殖条件の解明. 岡山県林業試験場業務年報 35, 21pp.
- 7) 古在豊樹(1987): 先端技術による日本農業の展開 [4]. 農業および園芸 62-10, 1154~1160, 養賢堂, 東京.
- 8) 川村泰史・久島 繁(1996): 植物組織培養の生産コストシュミレーションによる技術改良の方向付け. 筑波大学農業技術センター研究報告 9, 47~61.
- 9) 岡山県農林部林政課(1997): 平成8年次岡山県特用林産流通統計, 6pp.
- 10) 酒谷昌孝(1989): ゼンマイ胞子の無菌発芽. 日本林学会関西支部第40回大会講演集, 170~173.
- 11) 山本友英(1995): 組織培養によるシオデの大量培養に関する研究. 南九州大学園芸学部研究報告 (A), 11~29.