

シオデの組織培養による大量増殖

(第1報)

組織培養による冬芽からの不定芽形成

川村泰史・黒田秧(農林水産省四国農業試験場)

Mass propagation of *Smilax oldhami* Miq.
by tissue culture I

Formation of adventitious shoot from winter bud
Hirofumi KAWAMURA and Shigeru KURODA

要約

川村泰史・黒田秧(1990):シオデの組織培養による大量増殖(第1報)組織培養による冬芽からの不定芽形成. 徳島農試研報, (27):39~43.

組織培養によるシオデの大量増殖法を開発するために,冬芽から茎頂を除去した残りの組織部分の切片を供試し,組織切片から不定芽誘導を促す植物生長調節物質の種類と濃度組合せ条件について検討し,つぎの結果を得た.

組織からの直接的な不定芽形成には, NAA0.05~0.5mg/l + BA0.5mg/lの組合せが適していた。一方,カルス形成には, NAA10.0mg/l + BA0.5~1.0mg/l, または2,4-D0.5mg/l + BA0.5~2.0mg/lの組合せが有効であった。

はじめに

シオデ(*Smilax oldhami* Miq.)はユリ科シオデ属に属し,雌雄異株の多年性植物で,「山菜の王様」あるいは「山のアスパラガス」とも呼ばれる貴重な資源植物である。シオデは主として東北地方で食用として珍重されているが,これまで本格的な栽培実績がない。また徳島県の山間部にも自生するが,ほとんど利用されていないのが実情である。

すでに栽培化の試験は徳島農試池田分場⁴⁾,山形農試最北支場⁵⁾等で試みられている。しかし,種子繁殖による栽培試験では山野での種子や自生株の大量採集が難しく,また播種から発芽まで1年以上を要し,生育,発芽とも不揃いである。そのため,シオデの栽培化試験の実施と将来のシオデの産地化を図るためには,希少資源であるシオデの自生株から優良系統の選抜を行い,大量増殖による苗の確保が重要である。組織培養による大量増殖はこのための有力な手段である。

シオデの組織培養を利用した大量増殖については田沢・笠原³⁾,山本・福里⁶⁾の報告事例があるが,いずれも地上部の茎や葉を用いた培養法である。また黒田・川村¹⁾はシオデの地下部に形成される冬芽の茎頂部分を用いて,脱分化させずに効率的かつ大量に苗増殖するための培養方法を開発した。本報では,冬芽の茎頂部分以外の組織片から不定芽を誘導し,大量増殖するための培養条件について,培地への植物生長調節物質の種類と濃度を中心に検討し,若干の成果を得たので報告する。

なお,本研究は農林水産省依頼研究員として四国農業試験場育種工学研究室で行った。

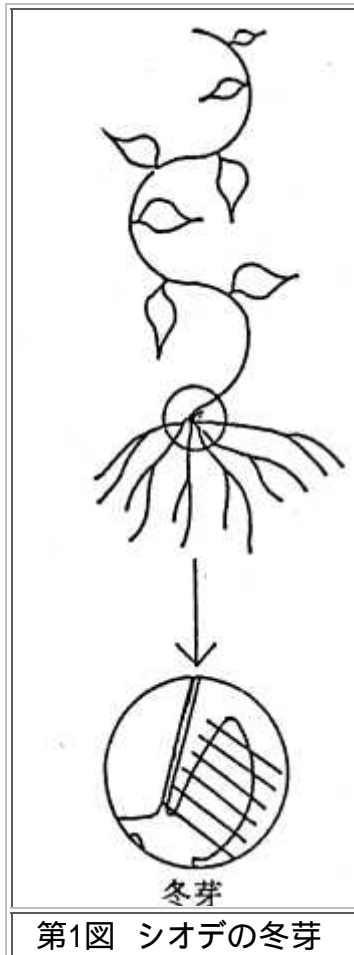
材料および方法

1 材料

徳島県三好郡東祖谷山村内で1986年11月に採種したシオデを1987年3月に池田分場の圃場に播種して栽培した幼苗を用い,1988年12月に1~2cmに伸長した冬芽部分を切除,採集して材料とした。

2 培養

○材料の殺菌



採集した冬芽を水道水で予備洗浄を行い、1%のトリトンX-100(アルキルフェノキシポリエチレングリコール型非イオン性界面活性剤)に移して10分間攪拌した後、水道水で再び洗浄した。冬芽の殺菌は、クリーンベンチ内において70%のエタノールに3分間と、有効塩素濃度5%の次亜塩素酸ナトリウム溶液に5分間浸漬処理した後、滅菌蒸留水で3回洗浄した。第1図に示すとおり、実験には冬芽の最外部を覆っている稚葉と茎頂部分を除去した冬芽組織を水平方向に約1mmの厚さに輪切りにした切片を供試した。

○基本培地、植物生長調節物質

培地は基本培地としてMS培地(MURASHIGE and SKOOG, 1962)²⁾を用い、ショ糖30g/lと寒天7g/lを加えた固体培地とした。培地に添加した植物生長調節物質は、オーキシンとしてNAA(-napht-halene acetic acid)と2,4-D(2,4-dichlorophenoxy acetic acid)を、サイトカイニンとしてBA(6-benzyl aminopurine)を用い、両者の各種濃度を組合せた培地を調製し、試験区とした。培地はすべてpH5.8に調整後、15mlの管ピンに15mlずつ分注し、オートクレーブ滅菌した。なお試験Aでは、NAAと2,4-Dの濃度をそれぞれ0, 0.5, 2.0, 10.0mg/lの4段階とし、BAの濃度については0, 0.01, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 10.0mg/lの7段階として碁盤目状の濃度組合せを作り、合計49区を設定した。さらにNAAとBAの濃度組合せを検討するための試験Bでは、NAAを0.05, 0.1, 0.5, 1.0mg/lの4段階濃度、BAについては0.05, 0.1, 0.5, 1.0mg/lの4段階濃度を設け、碁盤目状の合計16区の濃度組合せ区を設定した。

○培養条件

冬芽切片の培養は26 °Cの全暗条件で行い、培養1か月後に冬芽切片からのカルス形成と不定芽形成状態を調査した。

結果および考察

試験A

培養1か月後の冬芽切片からは、カルス状のものと直接不定芽を形成したものとが出現したため形態

別に整理して結果を第1表と第2表に表示した。なお、今回の試験区からは不定胚形成に有効な条件を見出すことができなかった。

カルス形成の特徴は、第1表に示すとおりオーキシシンとしてNAAを用いた場合、NAA10.0mg/l + BA0.5 ~ 1.0mg/lの濃度組合せ区で70%以上の供試切片がカルス化し、とくにNAA10.0mg/l + BA1.0mg/lの区で顕著であった。また、2,4Dを用いた場合には、2,4-D0.5mg/l + BA0.5 ~ 2.0mg/lの濃度組合せにおいて70%以上の供試切片がカルス化した。

第1表 カルス形成に及ぼすNAA, 2,4-D, BAの添加効果(試験A)

Auxin(mg/l)		BA(mg/l)						
		0	0.01	0.1	0.5	1.0	2.0	10.0
NAA	0	0	0	0	10	10	30	10
	0.5	0	30	10	20	0	0	0
	2.0	20	20	20	40	40	40	0
	10.0	33	40	50	70	100	44	0
2,4-D	0.5	0	40	50	80	70	80	30
	2.0	40	30	30	40	40	30	0
	10.0	30	10	0	30	20	20	30

注) 数値は培養1か月後における冬芽切片10個体中のカルス形成割合(%)を示す。汚染個体を除いて計算, 表示した。

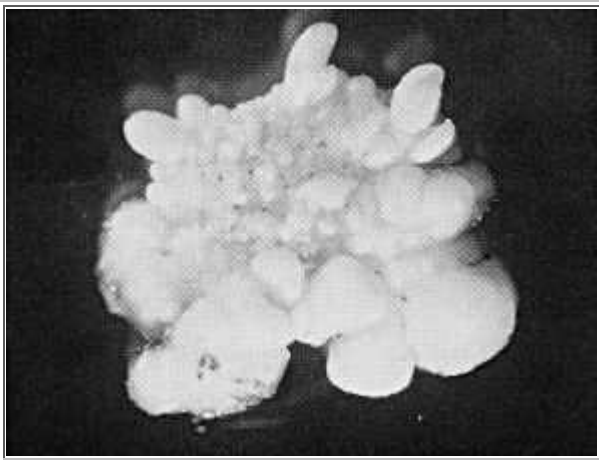
一方、冬芽切片からの直接的な不定芽形成は、第2表に示すとおりNAA0.5mg/l + BA0.1および0.5mg/lの濃度組合せ区において70%の割合で出現したが、他の区では不定芽形成割合が極めて低かった。NAAの代わりに2,4-Dを用いた場合には不定芽を誘導できなかった。

第2表 不定芽形成に及ぼすNAA, 2,4-D, BAの添加効果(試験A)

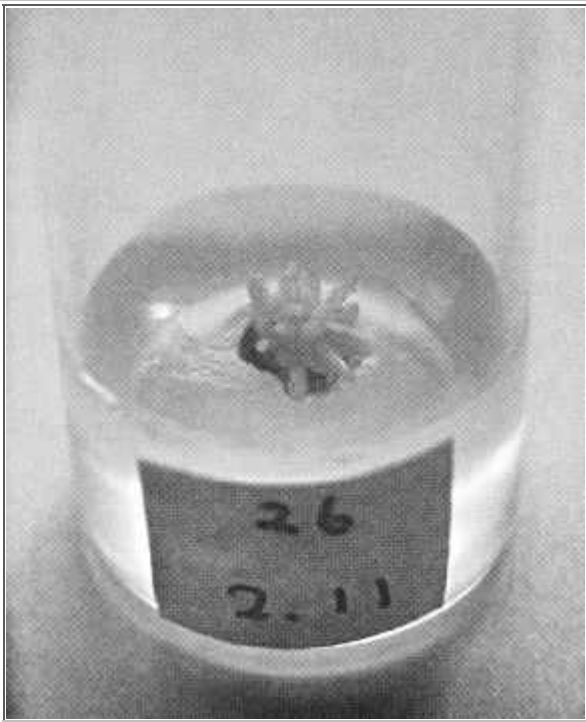
Auxin(mg/l)		BA(mg/l)						
		0	0.01	0.1	0.5	1.0	2.0	10.0
NAA	0	0	0	0	0	0	0	0
	0.5	0	0	70	70	20	20	0
	2.0	0	0	20	20	10	20	0
	10.0	0	0	0	0	0	0	0
2,4-D	0.5	0	0	0	0	0	0	0
	2.0	0	0	0	0	0	0	0
	10.0	0	0	0	0	0	0	0

注) 数値は培養1か月後における冬芽切片10個体中の不定芽形成割合(%)を示す。汚染個体を除いて計算, 表示した。

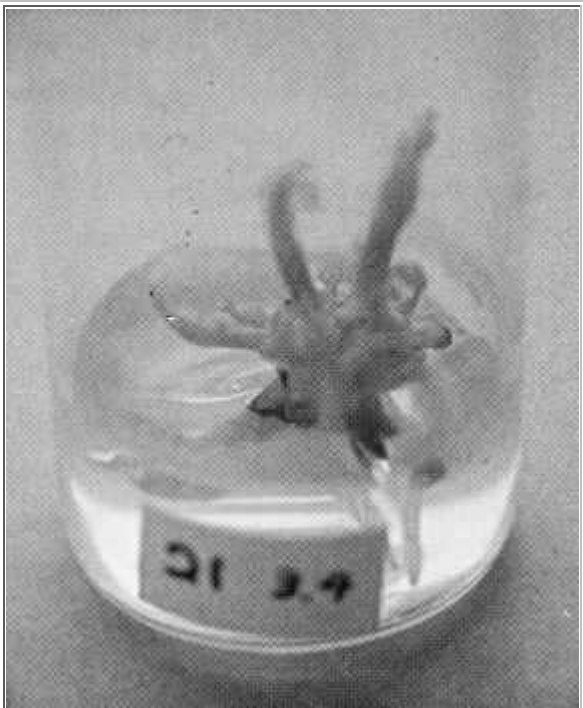
このように限られた濃度組合せ区から出現した第2図と第3図に示すような不定芽は、その後、明条件下(16時間日長, 8時間暗黒)に移すことで緑色を呈し、第4図のように健全な苗条に生長した。



第2図 茎頂部分を除いた冬芽組織
切片からの不定芽形成



第3図 不定芽の伸長(暗条件)



第4図 不定芽の緑化(明条件)

試験B

試験Aでは不定芽誘導にNAAとBAの限られた濃度範囲の組合せが有効であったので、両者の濃度組合せについて第3表に示す追試験を実施し、つぎの結果を得た。

第3表 不定芽形成に及ぼすNAAとBAの添加効果(試験B)

BA(mg/l)	0.05	0.1	0.5	1.0
NAA(mg/l)				
0.05	17	46	50	29
0.1	36	27	47	27
0.5	38	31	64	33
1.0	36	29	42	20

注) 数値は培養1か月後における15個体中の不定芽形成割合(%)を示す。汚染個体を除いて計算、表示した。

冬芽切片からの不定芽形成は、NAA0.05～0.5mg/l + BA0.5mg/lの区において47～64%の割合を示し、約2分の1の切片から不定芽を誘導することができた。また、NAA0.05mg/l + BA0.1mg/lの区においても46%の不定芽形成割合を示した。しかしこれら以外の濃度組合せ区では不定芽の形成割合が低かった。

以上の結果より、シオデの茎頂と稚葉部分を除いた冬芽組織切片からの直接的な不定芽形成にはNAA0.05～0.5mg/lとBA0.5mg/lの濃度組合せが適しており、大量増殖に有効な培地条件を見出すことができた。この濃度組合せ条件は、冬芽の茎頂培養による大量増殖条件(黒田・川村)¹⁾と概略一致していた。しかし、茎頂培養では組織の肥大と不定芽形成が並行して起こるのに対して、茎頂以外の冬芽組織では不定芽形成が優先的に起こる傾向があり、冬芽の部位による反応の違いが明らかとなった。

不定芽形成条件が判明したことにより、今後は伸長したシュートから発根を促し、馴化するための最適条件について検討する必要がある。

摘要

組織培養によるシオデの大量増殖法を確立する目的で、茎頂部分を除いた冬芽の組織切片から不定芽を効果的に誘導するための植物生長調節物質の種類と濃度条件を明らかにした。

- 1) 不定芽形成には、NAA0.05～0.5mg/l + BA0.5mg/lの濃度組合せが適していた。
- 2) カルス形成には、NAA10.0mg/l + BA0.5～1.0mg/lまたは2,4-D0.5mg/l + BA0.5～2.0mg/lの組合せが有効であった。

引用文献

- 1) 黒田秧・川村泰史(1989):シオデの茎長培養による大量増殖. 育雑, 39(別2): 62～63.
- 2) MURASHIGE, T. and F. SKOOG(1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 15: 473～497.
- 3) 田沢一二・笹原健夫(1988): 組織培養によるシオデの繁殖系の確立. 育雑, 38(別1): 34～35.
- 4) 徳島農試池田分場(1988): シオデの増殖技術の確立, 昭和62年度四国農業試験成績・計画概要集.
- 5) 山形農試最北支場(1988): シオデの栽培法確立試験, 昭和62年度野菜成績概要.
- 6) 山本友英・福里和朗(1989): 組織培養によるシオデ苗の大量増殖に関する研究. 日作紀, 58(別1): 236～237.

Summary

Smilax oldhami Miq., an extremely rare and endangered species for food plant native to Tokushima and some other regions, was successfully propagated in vitro using Murashige and Skoog media supplemented with various concentrations and combinations of auxins and cytokinin.

1 Adventitious shoots developed from winter bud segments without apical meristem by culture in media with 0.05 to 0.5mg/l NAA and 0.5mg/l BA.

2 Callus formation was enhanced from the segments on media with 10.0mg/l NAA + 0.5 to 1.0mg/l and with 0.5mg/l 2,4-D + 0.5 to 2.0mg/l BA.