

ハス培養苗の増殖および順化のための培養条件

隔山普宣・小川純一

Culture condition for propagation and acclimatization of cultured plantlets in Lotus

(*Nelumbo nucifera* GAERTN)

Hironobu KAKUYAMA, Jun-ichi OGAWA

要約

隔山普宣・小川純一(1997):ハス培養苗の増殖および順化のための培養条件. 徳島農試研報(33):7~12

組織培養によりハスの優良種苗の増殖を図るため,増殖および順化のための培養条件について検討した。

照明時間を14~18時間とし,培養温度を明期 30°C ,暗期 24°C の変温管理でとし,シヨ糖 30g/L を加えた標準濃度MS液体培地で培養することにより,地下茎の伸長が優れ,節数も多くなった。また地下茎を2節で分割し,30日毎の継代培養により,優良種苗が90日間で47倍に増えた。

照明時間を8~12時間とし,炭酸ガスを施用し,シヨ糖 30g/L を加えた標準濃度MS液体培地で振とう培養すると地下茎の肥大が進み,順化を順調に行うことができた。

キーワード:ハス,優良種苗,組織培養,増殖,順化,培養条件

はじめに

ハスは鳴門市を中心に吉野川の北岸下流域で約820ha栽培されており,徳島県の代表的な野菜である。しかし近年,病害,生理障害等による品質低下および優良な種ハスの確保が栽培上の問題点となっている。特に種ハスは同じ系統のものを何年も使用しているため,株そのものの活性低下等が心配される。そのため生産者は優良な系統の種ハスを選抜し,確保するのに頭を痛めている⁷⁾。

そこでハスの生産を安定させるため,優良な系統の無病苗の育成・増殖が望まれている。

無病苗の育成・増殖は組織培養技術を用いることにより施設内で行うことができる。また茎頂培養法を用いることにより,変異を生じることなく優良個体の増殖が可能となる。また「若返り現象」が見られ,生育が旺盛になるなどの利点が考えられる⁸⁾。

ハスの組織培養については山本・松本¹⁰⁾¹¹⁾,岩本ら⁵⁾の報告があるが,増殖過程および順化前の培養環境条件についてはほとんど報告がない。

そこで組織培養により,ハスの優良種苗の効率的増殖を図るための培養条件について検討したので報告する。

試験方法

1 材料

品種 備中 の葉原基1枚を付けた生長点を, NAA(1-naphthalene acetic acid) 0.2mg/L , BA(6-benzyl aminopurine) 0.2mg/L , シヨ糖 30g/L を加えたMS(Murashige and Skoog, 1962) 液体培地で初代培養し, BA 0.2mg/L , シヨ糖 30g/L を加えたMS液体培地で茎葉を伸長させ, ホルモン無添加, シヨ糖 30g/L を加えたMS液体培地で培養した苗条の地下茎の頂芽, 側芽の先端を2節程度(分割節数の試験を除く)切り取り材料とした。

2 地下茎の生育に及ぼす培養条件の影響

1) 照明時間と地下茎の伸長, 肥大

培地はシヨ糖 30g/L を添加したMS液体培地をpH5.8に調整後, 容量300mlの無菌通気膜付きプラントボックスに15mlずつ分注し, 121°C で15分間オートクレーブした。照明時間8, 10, 12時間区は培養温度

を明期27 , 暗期22 とした。照明時間12, 14, 16, 18時間区は培養温度を明期25 , 暗期25 とし、静置培養を行った。照度は全区10,000 luxとした。

2) 培養温度と地下茎の伸長

培養温度は明期, 暗期とも30 , 27 , 24 とした区および明期を30 , 暗期を24 と変温管理した4処理区を設け, 10,000 lux, 14時間照明下で培養を行った。培地は2の1)の試験に準じた。

3) 炭酸ガス施用, 振とう培養と地下茎の肥大

炭酸ガスを明期800ppm, 暗期100ppm施用したもの, 水平振とうを60回/分したもの, 両方を併用したものおよび無処理の4処理区を設け, 明期27 , 暗期24 , 10,000 lux, 10時間照明下で培養を行った。培地は2の1)の試験に準じた。

4) 培地濃度と地下茎の伸長

培地はシヨ糖7.5g/Lを添加した1/4濃度MS(以下1/4MS), シヨ糖15g/Lを添加した1/2濃度MS(以下1/2MS), シヨ糖30g/Lを添加した標準濃度MS(以下MS)の3種類の培地で, 培養は明期30 , 暗期24 , 10,000 lux, 14時間照明下で行い, 地下茎の伸長を調査した。培地作成は2の1)の試験に準じた。

5) 培地濃度, シヨ糖濃度と地下茎の肥大

培地はシヨ糖15g/Lを添加した1/2濃度MS(以下1/2MS・シヨ糖1.5%), シヨ糖30g/Lを添加した1/2濃度MS(以下1/2MS・シヨ糖3%), シヨ糖15g/Lを添加した標準濃度MS(以下MS・シヨ糖1.5%), シヨ糖mg/Lを添加した標準濃度MS(以下MS・シヨ糖3%)の4種類の培地で, 培養は明期27 , 暗期24 , 10,000 lux, 10時間照明, 炭酸ガス1,000ppm施用, 水平振とう80回/分の条件下で行い, 地下茎の肥大を調査した。培地作成は2の1)の試験に準じた。

6) 継代期間, 分割節数と地下茎の生育, 増殖

継代は継代期間を30日, 45日ごと, 継代時の地下茎の分割節数を1節, 2節で行った。培養は明期30 , 暗期24 , 10,000 lux, 14時間照明下で行った。培地は2の1)の試験に準じた。増殖率は3カ月間に増えた種苗数を調査した。

3 地下茎の肥大が順化に及ぼす影響

シヨ糖30g/Lを添加した標準濃度MS培地で試験2の5)培養条件で60日間培養した苗を, 地下茎の肥大程度を観察により, 肥大無, 肥大中, 肥大良好の3段階に分け, 次の条件で順化した。

順化は市販のプラスチックプランター(12cm×25×11.5)に育苗培土(クレハ園芸培土, 窒素:りん酸:加里 = 0.4:1.5:0.4g/kg)を入れ, 葉を切除した培養苗を1996年1月25日に植え付け, 温室内の最低温度20 に設定したプールで行った。移植30日後に調査し, 生育している個体を活着個体とした。



培養状況

結果

1 照明時間と地下茎の伸長, 肥大

照明時間が地下茎の生育に及ぼす影響を第1表に示した。

8~12時間の間では照明時間が長くなるほど側枝の節数が多くなった。全重は8時間, 12時間が重く, 茎径は各区ともあまり差がなかった。

節数は14時間～18時間の間では主枝，側枝ともに12節以上あり，各区間の差もあまりなかった。しかし，12時間では主枝，側枝ともに少なく，特に側枝は極端に少なかった。全重も12時間が最も軽かったが，茎径は最も太かった。

第1表 照明時間が地下茎の節数，肥大に及ぼす影響

照明時間	全重 (g)	節数		茎径 (mm)
		主茎	分枝茎	
8時間	24.0	12.9	9.4	5.5
10時間	21.6	11.5	11.5	5.7
12時間	23.4	12.0	17.6	5.3
12時間	15.5	11.5	5.8	5.8
14時間	20.9	12.9	13.1	3.8
16時間	22.1	13.1	12.6	2.9
18時間	22.4	12.7	13.5	3.1

注) 8～12時間区:移植113日後12株調査, 12～18時間区:移植76日後13株調査
茎径:主茎の最大茎径

2 培養温度と地下茎の伸長

培養温度が地下茎の生育に及ぼす影響について第2表に示した。

節数は主枝では明期30・暗期24が，側枝では明期27・暗期27が最も多かった。茎長も節数と同様の傾向が認められ，主枝茎長は明期30・暗期24が，側枝茎長は明期27・暗期27が最も長かった。明期24・暗期24は節数，茎長ともに最も劣った。全重は明期27・暗期27がやや重かった。



地下茎の伸長状況

第2表 培養温度が地下茎の伸長に及ぼす影響

温度()		全重 (g)	節数		茎長(mm)	
明期	暗期		主茎	分枝茎	主茎	分枝茎
30	30	24.2	13.1	11.6	192	113
30	24	24.5	15.1	8.0	263	90
27	27	26.1	12.0	14.0	204	149
24	24	25.0	11.1	7.7	149	66

注) 移植58日後10株調査

3 炭酸ガス施用, 振とう培養と地下茎の肥大

炭酸ガス施用と振とう培養が地下茎の生育に及ぼす影響について第3表に示した。

静置培養では炭酸ガス施用は地下茎の肥大が認められず, 生育も無処理とほとんど差がなかった。振とう培養は無処理に比べ側枝の肥大節数が多くなり, 肥大茎径も大きくなったが, 全重および茎長は劣った。炭酸ガス施用と振とう培養を併用すると側枝の肥大節数が多くなり, 肥大茎径が最も大きくなった。



地下茎の肥大状況

第3表 炭酸ガス施用, 振とう培養が地下茎の肥大に及ぼす影響

試験区		全重 (g)	節数		肥大節数		肥大 茎径 (mm)	茎長(mm)	
CO ₂	振とう		主茎	分枝茎	主茎	分枝茎		主茎	分枝茎
無	無	17.1	9.6	6.1	4.5	0.0	6.3	103	39
有	無	17.3	9.8	6.2	5.3	0.3	6.3	108	46
無	有	15.9	9.7	7.2	4.6	3.3	7.7	86	44
有	有	16.2	9.2	7.3	4.9	5.3	9.7	84	54

注) 移植62日後10株調査

肥大節数: 主茎の肥大した節数, 肥大茎径: 主茎の肥大した最大茎径

4 培地濃度と地下茎の伸長

培地濃度が地下茎の伸長に及ぼす影響について第4表に示した。

MSが節数, 茎長, 全重すべてに優れた。培地濃度がうすくなるにしたがって生育が劣り, 1/4MSでは側枝の発生も認められなかった。

第4表 培地濃度が地下茎の伸長に及ぼす影響

培地濃度	全重 (g)	節数		茎長(mm)	
		主茎	分枝茎	主茎	分枝茎
1/4MS	7.9	11.6	0.0	127	0
1/2MS	14.5	12.2	4.6	154	42
MS	24.5	15.1	8.0	263	90

注) 移植58日後10株調査

5 培地濃度, ショ糖濃度と地下茎の肥大

培地濃度, ショ糖濃度が地下茎の肥大に及ぼす影響について第5表に示した。

MS・ショ糖3%, 1/2MS・ショ糖1.5%が地下茎の肥大が良好であった。MS・ショ糖1.5%は肥大節数, 肥大茎径ともに最も劣った。全重はMS・ショ糖3%が, 主枝茎長は1/2MS・ショ糖3%が優れた。

第5表 培地濃度, ショ糖濃度が地下茎の肥大に及ぼす影響

培地濃度	シヨ糖濃度 (%)	全重 (g)	主茎長 (mm)	肥大節数		肥大茎径 (mm)
				主茎	分枝茎	
1/2M	1.5	12.6	49	3.3	3.0	9.1
1/2M	3.0	12.0	81	2.2	2.5	8.5
MS	1.5	13.3	55	1.9	0.5	5.3
MS	3.0	18.2	65	2.8	4.3	9.5

注) 移植61日後10株調査

肥大節数: 主茎, 分枝茎の肥大した節数

肥大茎径: 主茎の肥大した最大茎径

6 継代期間, 分割節数と地下茎の生育, 増殖

継代培養での継代期間および分割節数が地下茎の生育, 増殖率に及ぼす影響について第6表に示した。

継代期間は45日継代が全重, 節数, 茎長ともに優れたが, 増殖率は低かった。分割節数は2節分割が全重, 節数, 茎長に優れたが, 増殖率は低かった。45日継代・2節分割は, 生育は最も優れたが増殖率が劣り, 30日継代・1節分割は, 生育は劣ったが増殖率は高かった。

第6表 継代期間, 分割節数が地下茎の生育, 増殖に及ぼす影響

継代期間	分割節数	全重 (g)	節数		茎長 (mm)		増殖率 (倍)
			主茎	分枝茎	主茎	分枝茎	
30日	1節	9.7	5.9	0.8	10.0	0.8	80
30日	2節	14.7	8.9	1.5	12.8	1.5	47
45日	1節	16.8	7.7	3.0	10.7	3.0	38
45日	2節	18.4	11.1	3.1	15.4	3.1	19

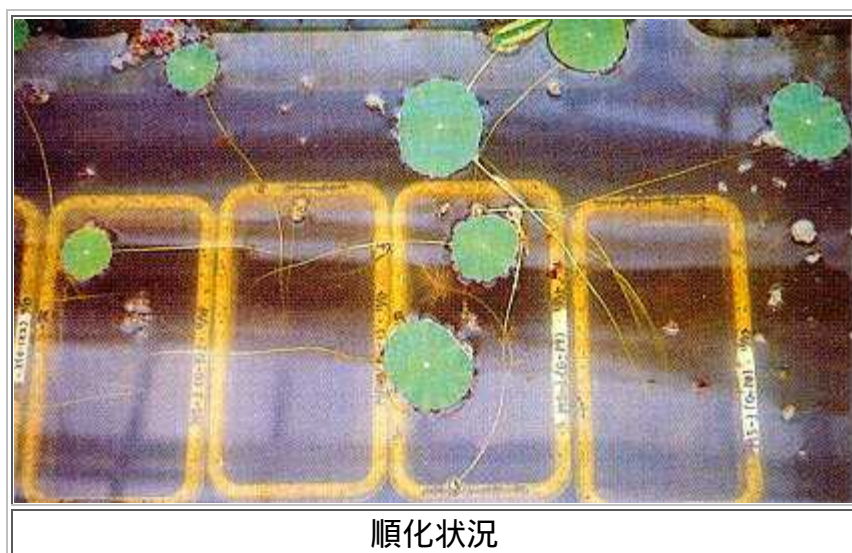
注) 全重, 節数, 茎長: 4回継代し, 継代毎に10株調査, 40株平均

増殖率: 3ヶ月間の増殖率

7 地下茎の肥大と順化後の活着率

地下茎の肥大が順化後の活着率に及ぼす影響について第7表に示した。

地下茎の肥大程度が良好であった茎径9.1mmの活着率が高かった。肥大していない茎径4.8mmでは全く活着しなかった。



順化状況

第7表 地下茎の肥大が順化後の活着率に及ぼす影響

肥大程度	茎径 (mm)	活着率 (%)
------	---------	---------

無	4.8	0
中	7.4	50
良好	9.1	88

注) 茎径, 活着率は8株調査

活着率: 順化した8株の内活着した個体の割合, 移植30日後に調査

考察

地下茎の分割による増殖を行うためには地下茎の伸長を促進し, 節数を増やす培養条件を設定する必要がある。また, 山本・松本¹¹⁾は培養した苗の順化を順調に行うためには, 地下茎の肥大を進めておく必要があると報告している。

そこで培養中の照明時間, 培養温度, 炭酸ガス施用, 振とう培養, 培地濃度, 継代期間, 分割節数が地下茎の生育に及ぼす影響を明らかにした。また地下茎の肥大が順化に及ぼす影響についても明らかにした。

露地栽培ではハスの茎葉の発育旺盛な時期は日照時間が長い7月上旬～8月上旬であり, 日照時間が短くなっていく8月中旬以降に地下茎の肥大がはじまる⁶⁾。培養時の照明時間も一般栽培と同じように14～18時間の長日条件で地下茎の節数が増加し, 8～12時間の短日条件で地下茎の肥大が進んだ。

また露地栽培におけるハスの茎葉の生育最適温度は25～30℃といわれている⁶⁾。培養時の明期の温度管理は一般栽培と同様に温度を低めにすると生育が悪く, 30℃と高めの管理が主茎の生育を促進した。しかし暗期で明期と同様の高めの管理をすると逆に主茎の生育が抑制された。これは暗期の温度を高くすると呼吸量が増え, 貯蔵養分を消耗するとともに光合成産物の葉から地下茎への転流がうまくいかなくなるためであると思われる。

これらのことより, 培養時の照明時間および温度管理は, 地下茎の伸長を進めるには照明時間は14～18時間の長日条件とし, 温度管理を明期30℃, 暗期24℃の変温管理とする。また肥大を進めるには照明時間を8～12時間の短日条件にするのがよいと推測された。

培養中の炭酸ガス施用の効果については, 荒井ら²⁾がヤマトイモに生育促進と塊茎形成重量の増加, キクに生育促進効果が認められると報告している。また本條・高倉⁴⁾は施用により光合成が盛んになることを示唆している。ハスでも同様に振とう培養と併用すると地下茎の肥大促進効果が認められた。

振とう培養は培養液内に酸素を供給する効果と培養物に物理的ストレスを与えるという特徴を持っている⁹⁾。本試験では振とう培養により, 地下茎の伸びが抑えられ, 地下茎が肥大した。1分間に60～80往復程度では酸素の供給量はあまり多くなく⁹⁾, 生育に及ぼす影響は少ないと思われる。そこで50～60日間連続して振とうする物理的ストレスが地下茎の肥大を進めているのではないかと思われる。

培地濃度は, 生育に大きな影響を与えており, 特に濃度が低い場合には生育が極端に劣った。これは荒井ら²⁾がイチゴで報告しているように, 培養植物体が培地に添加したショ糖による従属栄養生長を行っているためであると考えられる。そこで地下茎の伸長等の栄養生長を進めるには標準濃度のMS培地でよいと思われる。

また, 山本・松本¹¹⁾はショ糖濃度を8%まで高めると浸透圧が高くなり地下茎の肥大が認められたと報告している。しかし本試験を実施した培養条件下では極端にショ糖濃度を高くしなくても, 標準的な濃度で肥大を進めることができた。また培地濃度に対してショ糖濃度を変えると地下茎の肥大程度が変わることから, 地下茎の肥大については培地濃度とショ糖濃度のバランスが肥大に影響を及ぼしているように思われた。

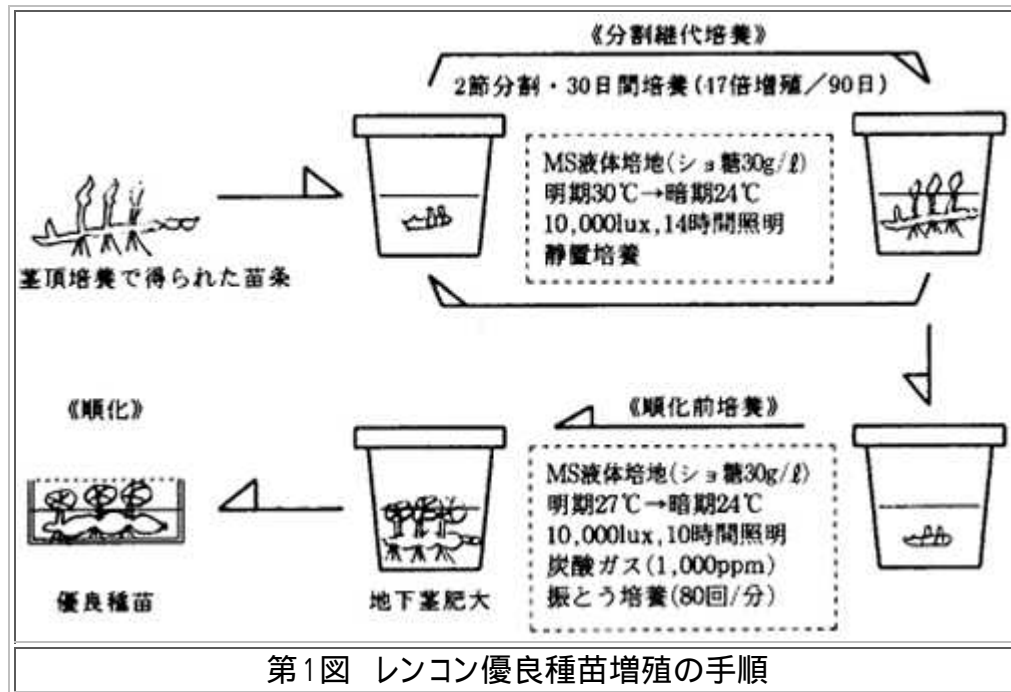
地下茎を分割し継代培養して培養苗を増やしていく方法では, 培養の労力の割に増殖効率が低い。増殖率を上げるためには培養期間を短縮すること, 分割できる節数を増やすことが重要である⁸⁾。地下茎の生育を進める最適培養条件については既に述べたとおりである。この培養条件下で培養期間と分割する節数について検討した。

培養期間については期間が長いほど地下茎の生育は優れるが, 増殖率は低くなる。期間を短くすると増殖率は高くなるが, 生育は劣る。しかし培養期間30日でも地下茎の分割節数を2節にすると継代培

養に使える苗の生育となった。また分割節数は節数を少なくするほど増殖率が高くなるが、1節分割では分割した地下茎の貯蔵養分が少なく、芽も1芽しかないためか、2節分割に比べ生育が劣った。特に1節分割で継代期間30日は増殖率が最も高くなるが、生育が非常に劣るため苗生産には不適であることから、継代期間30日で、地下茎の分割節数2節が培養苗増殖に適していると思われた。

順化後の活着については、山本・松本¹⁾が報告しているように独立栄養に移行するまでは地下茎に蓄積した養分を使用するため、地下茎を順化前に充分肥大させることにより順化後の活着率が非常に高くなった。

以上のことより、優良な形質のレンコンを選抜、その生長点を培養して得られた苗条を分割し第1図のように本試験で明らかとなった培養条件下で培養すると優良種苗を増殖、順化させることが可能となった。



摘要

組織培養によりハスの優良種苗の増殖を図るため、増殖および順化のための培養条件について検討した。

- 1 照明時間は14～18時間の長日条件で地下茎の節数が多くなり、8～12時間の短日条件で地下茎の肥大が認められた。
- 2 培養温度は長日条件下で明期30℃、暗期24℃の変温管理で地下茎の伸長が優れ、節数も多くなった。
- 3 短日条件下で炭酸ガスを施用し、振とう培養すると地下茎の肥大が進んだ。
- 4 地下茎の伸長を促進する培養条件下では、シヨ糖30g/Lを加えた標準濃度MS液体培地が地下茎の伸長を促進した。
- 5 地下茎の肥大を促進する培養条件下では、シヨ糖30g/Lを加えた標準濃度MS液体培地が地下茎の肥大を促進した。
- 6 地下茎を2節で分割し、30日毎の長日条件、明期30℃、暗期24℃の変温管理での継代培養により、優良種苗が90日間で47倍に増えた。
- 7 地下茎を9mm程度に肥大させることにより、順化後の活着率が高くなった。

以上の培養条件を組み合わせることにより、地下茎の伸長が進み、節数が増え、分割継代による増殖に適した生育となった。また地下茎の肥大を進めることにより、順調に順化を行うことができた。

引用文献

- 1) 秋田求(1990):マイクロチューバー大量増殖法.野菜の組織・細胞培養と増殖.農業図書(東京):308～323.

- 2) 荒井滋・浅尾浩史・小畠博文(1991):イチゴ培養苗の生育と苗質における炭酸ガス施用効果.奈良農試研報, 22:9~16.
- 3) 秀田章人・堀本圭一(1992):ヤマノイモ,キクの培養中のCO₂,施用効果.平成3年度近畿中国農業研究成果情報, 326~327.
- 4) 本條毅・高倉直(1987):植物組織培養によるシンビジウムPLB増殖へのCO₂濃度,光強度および液体培地組成の影響.農業気象, 43(3):223~227.
- 5) 岩本嗣・浜田広延・嘉儀隆(1988/1989):ハスの組織培養に関する研究(1)茎頂組織からの個体再生.大阪農技セ研報, 25:47~53.
- 6) 南川勝次(1974):生育のステージと生理,生態.農業技術体系野菜編10,農文協(東京):16~18
- 7) 鳴門農業政良普及所(1988):夢を呼ぶれんこん:34.
- 8) 斉藤猛雄(1990):茎頂培養法.野菜の組織・細胞培養と増殖.農業図書(東京):41~49.
- 9) 田中秀夫(1992):植物細胞用バイオリクターの現状と展望.バイオリクターの世界.ハリオ研究所(東京):167~200.
- 10) 山本雄慈・松本理(1988):ハスの組織培養(第1報)生長点からの苗条誘導.山口農試研報, 40:44~48.
- 11) (1990):ハスの組織培養(第2報)増殖・馴化・培養苗の生産力.山口農試研報, 42:1~6.