

栄養繁殖性作物の組織培養による種苗生産システムの開発 —アスパラガス、ヤマノイモ、ワケギを例にして—

甲村 浩之

広島県立農業技術センター

Development of nursery plant production system by tissue culture on vegetative crops Asparagus, Chinese yam (Tsukuneimo) and Japanese shallot (Wakegi)

Hiroyuki Kohmura

*Institute of Biotechnology, Hiroshima Prefectural Agriculture Research Center,
Higashihiroshima 739-0151*

要 旨

本研究は栄養繁殖性作物であるアスパラガス、ヤマノイモ、ワケギの組織培養系を利用したクローン苗の大量生産 (マイクロプロパゲーション) システムに関する方法を開発し、その特性を調査したものである。特に、多芽体・不定胚誘導と超低温保存法を試みた。本論文は5章から構成されている。

序 論

栄養繁殖性とされる作物は、一般には種子採取が可能であることが多い。しかし、種子の形質のばらつきが大きく、栽培管理や収量・品質上の問題が生じることが多い。一方、栄養繁殖による株分けや芋の分割による種苗生産は、種子繁殖による方法と比べて極めて効率が低い。そのため、農家が苗を購入するために投資する種苗費が高かつき、経営が安定しない等の問題も生じている。そこで、組織培養を利用した種苗増殖法 (マイクロプロパゲーション) が開発され、農業利用のための応用が試みられてきたが、増殖効率が低く、生産コストも高かつくなど実用化に至った例は少ない。そこで本論文では、アスパラガス、ヤマノイモ、ワケギの低コストで効率のよい培養苗生産に必要な保存法や培養法等のシステム開発を行った。

第1章 アスパラガスの超低温保存技術の開発

アスパラガスは、食生活の欧米化と健康指向により需要が伸び、国内の西南暖地地域でも栽培面積が急増している。育種の推進上、遺伝子資源の保存が急務であり、若茎 (食用部) の茎頂組織から誘

導した多芽集塊の超低温保存法を検討した。多芽集塊は、アンシミドールを含む培地を用い、回転培養により誘導・継代維持できた。しかし、継代には培地準備、移植、培養等に労力や経費がかかる。そこで多芽集塊を液体窒素等に長期間保存する方法を検討した。従来のプログラムフリーザーや-30℃冷蔵庫を予備凍結に用いる二段階保存法と高濃度の保存溶液に一定時間浸漬処理した後、液体窒素に直接浸漬するガラス化法（一段階法）を比較した。その結果、ガラス化法のみで保存後の多芽集塊の高い生存率・植物体再生率が得られた。保存溶液には酒井ら(1990)の開発した植物ガラス化液(PVS2)を用い、25℃で45分間または0℃で120分間、浸漬処理後に液体窒素に保存すると保存後の生存率・再生率が従来の10%から80%に高まった。また、多芽集塊の茎頂部分は保存による障害が殆ど無いことを蛍光染色により観察した。この結果、アスパラガス優良株の培養組織が長期間保存可能であることが明らかになった。液体培養組織の効率的な超低温保存法は世界でも例がなく、同技術は今後の遺伝子資源の保存に有効な方法であると示唆された。また、不定胚形成カルス(Embryogenic callus, EC)や不定胚の超低温保存条件も明らかにした。

第2章 アスパラガスの培養苗生産システムの開発

アスパラガスは雌雄異株の作物である。収量や品質が個体間で大きくばらつき、雌株は種子が散布されることによる雑草化の問題があるため、優良な雄株だけを栽培する利点は高い。これまで、マイクロプロパゲーション法として腋芽培養法が開発されてきたが、培養期間が約3ヶ月と長く、再生植物が貯蔵根を形成しにくいことから実用化が困難であった。そこで、不定胚による増殖法について検討した。ニンジンの培養法に従い、カルスの観察に努めた結果、1987年に実生組織からのECの誘導と植物体再生に成功した。その後、圃場選抜した成株の茎頂組織からのEC誘導にも成功した。しかし、EC誘導の期間が長く効率も低い等の問題があり、多芽集塊からのEC誘導法を確立した。多芽集塊は、1)多くの品種・個体から容易に誘導でき、2)EC誘導の際に殺菌処理が不要で、3)EC誘導材料を必要時に大量に供用でき、4)EC誘導率が安定している等の長所が認められた。一方、不定胚形成と不定胚から植物体を再生する過程の改良も行った。その結果、浸透圧を高めた培地で不定胚を成熟させることにより発芽率を高め、通気培養・炭酸ガス施用により、培養植物の健全化と生育促進により順化率を高めた。さらに、次亜塩素酸ナトリウム溶液を培地に添加する簡易殺菌培養法を開発し、培地作成時の高圧滅菌や無菌室での培養操作を省略し、作業性・経済性を大きく向上させた。この結果、培養容器の大型化、フッソ樹脂フィルム容器等の新素材の活用により、培養20～30日で順化できる培養苗の生産が実現できた。

第3章 アスパラガスの不定胚培養苗の栽培特性

アスパラガスの培養苗生産を実用化するためには、培養苗の特性を解明し、これらの栽培が従来の種子品種と比較して有利である点を検証する必要がある。しかし、培養苗を圃場で栽培した際の特性解析に関する報告は殆どなかった。そこで、不定胚由来の培養苗を農業技術センター圃場に定植し、種子由来の品種と特性を比較した。その結果、雄株由来の培養株には雌株が混在せず、母茎を一斉立茎する際の茎の直径もよく揃った。種子品種では収穫する若茎の太さが揃わず、その原因は雌株が混在するためであると推測できた。若茎の品質では、頭部のしまり、茎色等が種子品種よりよく揃っていた。収量では、3年間の調査において、培養株の株当りの収穫量や本数の変動係数が20%以下であった。このため、培養苗では立茎や除草等の栽培管理が容易で品質・収量に関係する形質がよく揃

い、高収益を目的とした栽培に有効であることを明らかにした。その後、1993年に現地圃場の2万株中から、品質と収量の優れた数株を選抜し、これらの培養苗を増殖、定植後に特性検定を実施した。その結果、基準品種より収量が1.4倍、秀品率が30%増加し、収益性も2倍近い雄株系統「Y6」を選抜した。

第4章 ヤマノイモの培養苗を利用した新生産技術の開発

ヤマノイモ(ツクネイモ)は栄養体である芋を分割して増殖させる作物である。とろろのきめの細かさや粘りの強さ等の品質で市場や菓子加工での評価が高い。主に水田の輪換作物として栽培され、近年は減反強化により作付けが急増している。しかし、栽培面積10a当りの種苗コストは約20万円と高く、在来系統では増殖率が重量で3~5倍と低いため、優良系統の選抜とマイクロプロパゲーションを利用した早期増殖技術の開発が望まれていた。そこでウイルスフリー株や多収系統「広系1号」(増殖量8~10倍)を育成した。これらの未熟葉をベンジルアデニン(BA)8.9 μ Mを添加した培地で培養することにより多芽体を誘導した。多芽体は、ナフタレン酢酸(NAA)、BAとショ糖6%を添加した培地に移植すると植物体に再生し、約6ヶ月後に、径3~7mmのむかご大の小芋(培養むかご)を多数形成した。本法は従来法に比べて植物体再生率が高く、形成したむかごの利用により、培養苗の順化過程を省略できた。また、むかごは休眠打破後、セル成型育苗箱に播種し、発芽後に圃場に定植し半年間の養成で30~50gに肥大した。むかごから養成した種芋は、萌芽が早く、肥大率も高いため、培養むかごを用いた新生産体系の構築に応用できる可能性を示した。

第5章 ワケギウイルスフリー株茎頂の超低温保存と効率的苗生産

ワケギは、近年、ウイルス病汚染による収量・品質の低下が顕在化し、茎頂培養によるウイルスフリー株の利用が定着している。原種としてフリー株を保存するには、ウイルスを媒介するアブラムシ防除のため、隔離網室で栽培しなければならないが、試験管内で保存ができれば省力化が可能である。第1章で多芽集塊の超低温保存法を開発したので、ワケギのウイルスフリー株茎頂についても同法の適用を試みた。5月に種球を掘上げて殺菌し、茎頂培養を行った。これを4 $^{\circ}$ Cの低温で7日間培養し、茎頂を取り出して0.4Mの高濃度ショ糖液に1日処理後にガラス化液(PVS2)に浸漬することにより、超低温保存後の植物体再生率を10%から90%まで高めることができた。ワケギの茎頂では、ガラス化法のみで植物体の高い再生率が得られたが、同法は他のワケギ系統へも適用でき、供試5系統は50~80%の再生率が得られた。これらの保存はいずれも-152 $^{\circ}$ Cのフリーザーで行い、保存1年後でも植物体の再生率は変わらなかった。保存茎頂から多芽体を直接誘導し、苗生産を効率化する条件も解明しており、将来的に培養苗の生産体制が整えば実用化が可能と考えられる。

総合考察

栄養繁殖性作物であるアスパラガス、ヤマノイモ、ワケギの培養苗生産法を開発した。アスパラガスでは、多芽集塊のガラス化法による超低温保存法、また、多芽集塊からECを誘導し、不定胚形成による優良雄株の増殖法を開発した。さらに、培養苗の特性を解析し、栽培上の有利性を検証した。ヤマノイモでは、ウイルスフリー株の未熟葉からの多芽体の誘導と多芽体の常温保存条件を検討し、試験管内で培養むかごを周年生産する方法を開発した。ワケギでは、ウイルスフリー株茎頂の超低温

保存条件を検討し、ウイルスフリー株原種の長期保存と多芽体形成による増殖を可能にした。

栄養繁殖性の作物では、特に野菜類でのマイクロプロパゲーションの実用化が遅れている現状にあるが、本研究により従来より効率的な培養苗の生産が可能となり、実用化に向けて大きく前進できると思われる。今後、さらなる培養系の改良や培養組織の保存などの個別技術のシステム化に努めるとともに、育種理論に基づいて組織培養を活用し、収益性の高い優良品種を育成することが課題と考えられる。