

ジネンジョの茎頂からの植物体再生および順化

景山幸二・矢部和則・飯田孝則・鷲田純彦

愛知県農業総合試験場
(〒480-11 愛知県愛知郡長久手町)

(1987年6月22日受付)
(1987年8月10日受理)

ジネンジョの茎頂から植物体を得るための培地条件およびその順化について検討した。茎頂からの茎葉分化は、Linsmaier and Skoog (LS) の培地に NAA 0.01~0.1 mg/l と BA 0.1 mg/l 添加した培地が最適であり、その分化率は 90% 以上あった。つぎに、茎頂培養培地では根はほとんど分化しないため、茎頂培養で茎葉分化した個体について発根培地を検討した。その結果、LS 培地の無機塩を 2 分の 1 に希釈した培地が適しており、移植 2 カ月後には根数が多く生育良好で順化可能な幼植物が多数得られた。順化は、幼植物を殺菌土に移植し最初の約 1 週間は寒冷紗とビーカーで強光と乾燥から幼植物を保護することで容易となった。供試茎頂は、ウイルス罹病株から採取したムカゴの芽の先端部のものであったが、ウイルス症状を示さない株が多数得られた。

1. 緒 言

ジネンジョ (*Dioscorea japonica* THUNB.) は、山間地における重要な特産作物の一つであるが、栄養繁殖性作物のため連作によるウイルス病の被害が増大し、栽培上大きな問題となっている。一方、ジャガイモ¹⁾ やイチゴ²⁾ などでは、茎頂培養によってウイルスフリー株を得る技術が確立され実用的な段階になっているので、ジネンジョにおいても茎頂培養によりウイルスフリー株が得られると考え、茎頂からの植物体再分化の培地および作出了した再分化個体の順化について検討した。

2. 材料および方法

供試材料は、当試験場山間技術実験農場で選抜された優良系統のムカゴを用いた。

茎頂摘出部位は、ムカゴより 2~10 cm 伸長した芽の先端部を用い、表面殺菌は 70% エタノールに 1 分、次亜塩素酸ナトリウム溶液（有効塩素 0.5%）に 8~10 分浸漬後、滅菌水で 2 回洗浄して行った。解剖顕微鏡下で、生長点と葉原基 2~6 枚を含む 0.2~0.5 mm の大きさの茎頂を摘出した。

培地については、茎頂培養培地および茎葉分化した株の発根培地を検討した。茎頂培養培地のホルモン条件は、Linsmaier and Skoog (LS) 培地³⁾を基本とし、Table 1 に示すように 2-naphthaleneacetic acid (NAA) と

6-benzyladenin (BA) を 18 種類の組み合わせで添加して比較した。茎頂培養培地の組成は、Table 2 に示した LS 培地 (LS 1/1) を基本としその無機塩濃度を 2 分の 1 および 4 分の 1 に希釈した培地 (LS 1/2, LS 1/4), 窒素成分のみを 2 分の 1 に希釈した培地 (LS 1/2 N), 窒素成分として硝酸態窒素のみを含む培地 (LS-NO₃·1/1 N), アンモニア態窒素のみを含む培地 (LS-NH₄·1/1 N) および Murashige and Skoog 培地⁴⁾ (MS 1/1) の 7 種類に NAA 0.01 mg/l と BA 0.1 mg/l を添加して比較した。各培地とも 24×190 mm の試験管に 10 ml 每分注し、試験管 1 本当たり 1 個の茎頂を置床した。発根培地は、ホルモンを添加しない LS 培地 (LS 1/1) とその無機塩濃度を 2 分の 1 に希釈した培地 (LS 1/2) の 2 種類を用い、2 カ月茎頂培養した生育良好な茎葉分化株を培地に移植した。いずれの培地も pH 5.8, ショ糖濃度 2%, 寒天濃度 0.8~1.0% とした。また、培養は 25°C, 2,000 lux, 16 時間日長で行った。

順化は、試験管から幼植物を取り出し、根に付着している寒天を十分に洗い流した後、バー・ミキュライトと燐土を 1:1 に混合した殺菌土の入った 7.5 cm ポリ鉢に移植して行った。移植時には幼植物を乾燥と強光から保護するため上から 100 ml ビーカーをかぶせ、さらに寒天紗で遮光して、根が活着する頃に順次それらを取り除

いた。

3. 結果および考察

(1) 茎頂培養培地

茎頂培養のためにはホルモンとして NAA と BA 両方を必要とし、Table 1 に示すように NAA を 0.01~1.0 mg/l と BA を 0.01~0.2 mg/l 添加した培地では茎葉分化が認められ、その分化率は 56~100% であった。このなかで NAA 0.01 mg/l+BA 0.1 mg/l 区と NAA 0.1 mg/l+BA 0.1 mg/l 区は分化率が 100% および 95% と高く、生育も良好で培養 1 カ月目頃から肉眼で観察できる大きさになった。茎葉は、ほとんどの区で茎頂から直接分化し、1 茎頂当り 1 本伸長したが、NAA 1.0 mg/l+BA 0.01 mg/l 区では茎頂はカルス化し、カルスの一部に不定芽が形成され茎葉分化した。発根は、NAA 0.1 mg/l+BA 0.1 mg/l 区で 11%，NAA 1.0 mg/l+BA 0.01 mg/l 区で 20% とわずかに認められるにすぎなかった。発根部位は、前者が茎葉分化個体の第 1 葉・葉腋部、後者はカルスであった。

つぎに、培地の組成については上記で明らかになった最適ホルモン条件の NAA 0.01 mg/l+BA 0.1 mg/l 添加で検討した (Table 2)。LS-NH₄·1/1N 培地では、すべての茎頂が枯死し、LS-NO₃·1/1N 培地では茎頂は枯死するか肥大するものがほとんどであった。これに対し、

LS 1/1 培地、LS 1/2N 培地および MS 1/1 培地は、茎葉分化率 75~90% と高く、生育も良く、培養 2 カ月で展開葉数が 3 枚以上になる個体が多く認められた。茎葉は、カルスを経由せず、すべて茎頂から直接分化し、1 茎頂当り 1 本伸長した。発根は LS 1/4 培地で 11% の個体に認められ、その部位は茎葉分化個体の第 1 葉・葉腋部であった。

ジネンジョと同属のナガイモ (*Dioscorea opposita* THUNB.) は、イモの形態からナガイモ、ヤマトイモ、イチヨウイモの 3 群に分けられる。大澤ら⁵はヤマトイモの茎頂培養に成功しており、LS 培地を基本に NAA 10⁻⁵M (≈2 mg/l)+BA 10⁻⁵M (≈2 mg/l) 添加した培地を用い、茎頂からカルスを経由して幼植物を得ている。また、奥山ら⁶はナガイモを材料に用い、MS 培地に NAA 10⁻⁴M (≈20 mg/l) 添加した培地で茎頂からカルスを経由して幼植物を得ている。ジネンジョの茎頂培養も基本培地はヤマトイモやナガイモと同じ LS 培地または MS 培地で良いが、ホルモンは NAA, BA とも低濃度が良く、NAA 0.01~0.1 mg/l と BA 0.1 mg/l を添加した培地が最適であった。一般に、カルスを経由して得られた再分化個体は変異が多いとされるが、ジネンジョを用いた著者らの培養法によると茎頂はカルスを経由することなく直接茎葉分化しており、優良遺伝形質は維

Table 1. Effect of NAA and BA combinations on regeneration from meristem of yam after 2 months.

NAA (mg/l)	BA (mg/l)	No. of meristem	Callus formation (%)	Shoot formation (%)	Shoot growth ^a	Root formation (%)
0	1.0	9	0	0	—	0
0.01	0.01	10	0	0	—	0
0.01	0.1	9	0	100	+++	0
0.01	0.2	10	0	90	++	0
0.01	1.0	9	0	0	—	0
0.1	0.01	10	0	0	—	0
0.1	0.1	19	0	95	+++	11
0.1	0.2	10	0	100	++	0
0.1	1.0	8	0	0	—	0
0.2	0.01	10	0	0	—	0
0.2	0.1	10	0	70	++	0
0.2	0.2	10	0	100	+	0
0.2	1.0	10	0	0	—	0
1.0	0.01	10	70	10 ^b	+	20 ^b
1.0	0.1	9	0	56	+	0
1.0	0.2	9	0	0	—	0
1.0	1.0	9	0	0	—	0
10.0	1.0	10	0	0	—	0

^a — : no shoot, + : slight, ++ : moderate, +++ : vigorous.

^b Shoots and roots regenerated from callus which were formed from meristem.

Table 2. Effect of the nutrients on regeneration from meristem of yam after 2 months.

Culture medium ^a	No. of meristem	Shoot formation (%)	Shoot growth ^b	Root formation (%)
LS 1/1	8	75	+++	0
LS 1/2	9	89	++	0
LS 1/4	9	44	++	11
LS 1/2 N	10	90	+++	0
LS NO ₃ -1/1 N	9	11	+	0
LS NH ₄ -1/1 N	8	0	-	0
MS 1/1	9	78	+++	0

^a Basic media and concentration of inorganic salts or nitrogen components.

All culture media contained 0.01 mg/l NAA and 0.1 mg/l BA.

^b - : no shoot, + : slight, ++ : moderate, +++ : vigorous.

Table 3. Effect of concentration of root formation media on shoots which were formed in meristem culture after 2 months.

Concentration of medium	No. of tested shoots	Root formation (%)	No. of roots
LS 1/1	14	50	4.8
LS 1/2	14	86	6.7

持されたまま植物体に再生できるものと考えられる。

(2) 発根培地

茎頂培養で茎葉分化は進むが、発根する個体は少ないとから、茎頂培養で茎葉分化した個体の発根培地を検討した (Table 3). その結果、発根個体の割合は LS 1/2 培地では 86% と LS 1/1 培地の 50% に比べて高く、1 個体当りの根数も多く、適した培地であった (Fig. 1). 根は多くの場合茎葉分化個体の第 1 葉・葉腋部に形成された。生育の早い個体は移植後 2 カ月で展開葉数 11 枚、根数 11 本と順化可能になった。また、移植後 2 カ月以上培養した幼植物の中には茎基部に長さ約 5 mm のイモ状のものを形成する個体もみられた。さらに、培養を継続すると葉腋部の側芽が伸長するので、葉の 3 ~ 4 枚展開時に切断し、発根培地に移植したところ、約 1 カ月で順化できる個体となった。したがって、効率は劣るがこの培養段階で無菌的な増殖が可能と考えられる。

(3) 順化

試験管から取り出した幼植物は、培土に移植後数日は萎凋するが、約 1 週間後で根が活着し始める頃には萎凋はみられなくなった。2 カ月後の生存率は約 80% と順化は比較的容易であった。順化株の葉は緑色が濃く、株元には長さ約 1 cm のイモが形成された。本実験ではウイルス罹病株のムカゴの茎頂を用いたため、順化 1 カ月

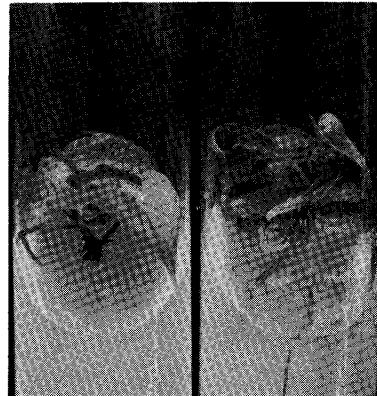


Fig. 1. Shoot and root formation from meristem of yam.

頃から葉にウイルス症状を示す株があったが、5 カ月以上株養成しても病徴を示さない株も多数あり、茎頂培養によりウイルスフリー株を得ることができると考えられる。

文 献

- 1) 小田 茂, 1983. 種苗産業と育種新技術 pp. 217-222, シーエムシー, 東京.
- 2) 矢部和則, 桜井雍三, 鶯田純彦, 宮川壽之, 飯田孝則, 景山幸二, 1986. 愛知農総試研報, 18: 110-120.
- 3) Linsmaier, E. M., F. Skoog, 1965. Physiol. Plant., 18: 100-127.
- 4) Murashige, T., F. Skoog, 1962. Physiol. Plant., 15: 473-497.
- 5) 大澤勝次, 栗山尚志, 菅原祐幸, 1981. 野菜試報, A. 9: 23-30.
- 6) 奥山 功, 八鍬利郎, 原田 隆, 1973. 北海道園芸研究談話会報, 6: 30-31.

Summary

Plant Regeneration and Acclimatization from Meristem of Yam
(*Dioscorea japonica* THUNB.)

Kohji KAGEYAMA, Kazunori YABE, Takanori IIDA, and Sumihiko WASHIDA

Aichi-ken Agricultural Research Center, Aichi-gun, Aichi 480-11, Japan

This paper deals with plant regeneration and acclimatization from meristem of yam (*Dioscorea japonica* THUNB.). Shoot formation was most frequently induced on Linsmaier and Skoog (LS) media with 0.01 or 0.1 mg/l NAA and 0.1 mg/l BA, but roots were rarely formed on all tested media. Therefore, media for root formation were further tested. Hormone-free LS medium with 1/2 strength of inorganic elements was favorable for root formation. It took 4-5 months from the start of culture to form shoots and roots.

Regenerated plantlets were readily acclimatized to natural environment, when they were transplanted to the sterilized soil and protected from strong sunshine and drying with cheeseclothes and beakers during the first week.