

組織培養による食用ウチワサボテンの大量増殖

織田弥三郎・澤田裕樹

大阪府立大学農学部
(〒591 大阪府堺市百舌鳥梅町 4-804)

(1990年4月16日受付)

(1990年8月1日受理)

組織培養による食用ウチワサボテン (*Opuntia ficus-indica*) の大量増殖法を検討し、以下の知見を得た。

1. 基本培地としては検討した4種類の既成培地のうち MS 培地が最も適していた。
2. 増殖培地では、BA 1 mg/l, NAA 0~0.1 mg/l の植物生長調節物質の組合せでシュートの増殖が良好であった。
3. また、増殖培地中のゲル化剤に関しては寒天 0.4% またはゲルライト 0.2~0.3% が適していた。
4. 発根培地において、NAA を 5 mg/l 添加することにより発根および地上部の生長とも増加した。
5. 発根した小植物体の馴化は容易であり、生長にともなって親植物と同様の形質を示した。

1. 緒 言

食用ウチワサボテン (*Opuntia ficus-indica* (L.) Miller) は、メキシコや地中海沿岸など、一般の作物の栽培が困難な半乾燥地帯において、重要な野菜³⁾、果物²⁾および飼料作物¹⁴⁾として利用されている。このため今後は半砂漠地の耕地化などの重要な緑化資源植物としての活用が期待できる。

サボテン類は作物として遺伝的に雑ばくであるうえ、種子繁殖を行うと実生の初期生長速度が遅く立ち枯れ病にかかりやすい¹⁾。このため繁殖は通常挿し木によって行われているが、繁殖効率は極めて低い³⁾。そのため、組織培養による大量増殖法の導入の可能性を検討することが必要であると考えられる。すでに *Opuntia* 属の *O. dillenii*¹³⁾、*O. polyacantha*⁷⁻¹⁰⁾、*O. basilaris*⁹⁾ および *O. amyclaea*³⁾ の4種について組織培養の研究が行われているが、*O. ficus-indica* の組織培養に関する研究は見あたらない。そこで本研究では、大量増殖に関する基礎的な知見を得るため、培地条件が食用ウチワサボテンのシュートの増殖率および小植物体の生長に及ぼす影響と馴化以後の生長について検討した。

2. 材料および方法

供試外植体はメキシコで採取された *O. ficus-indica* の実生である。なお実生は、種子を三角フラスコ内で無菌発芽させて得た。種に先立ち、種子は 70% エタ

ノールに 30 秒、続いて、Tween 20 を含む 5% の次亜塩素酸ナトリウム溶液で 20 分間殺菌した後、滅菌水で 3 回すすいだ。殺菌済みの種子は発芽しやすいように表皮に傷をつけた。培地には 3% のしょ糖を含む MS 培地¹¹⁾を用い、pH を 5.7 に調整したのち、0.8% の寒天を加えて、オートクレーブにより 120℃ で 15 分間滅菌を行った。特に述べない限り上記の MS 培地を基本培地として用いた。

(1) 培地条件がシュートの増殖に及ぼす影響

培地中の生長調節物質およびゲル化剤がシュート増殖に及ぼす影響について検討した。外植体には発芽後 20 から 40 日経過した実生を子葉の上で切断し、茎節に相当する約 1 cm の部分を用いた。生長調節物質の濃度およびその組合せについて検討した実験では、NAA および BA の濃度をそれぞれ 0, 0.1, 1 および 5 mg/l の 4 段階とし、計 16 区を設定した。この実験ではゲル化剤として 0.2% のゲルライトを用いた。

次に、培地のゲル化剤の種類および濃度について検討した実験では、寒天およびゲルライトを使用し、寒天濃度は 0.4, 0.8 および 1.2%, また、ゲルライト濃度は 0.1, 0.2 および 0.3% のそれぞれ 3 段階とした。また、対照区としてゲル化剤無添加の液体培地の区も設け、計 7 区とした。培地の生長調節物質は BA 1 mg/l とした。

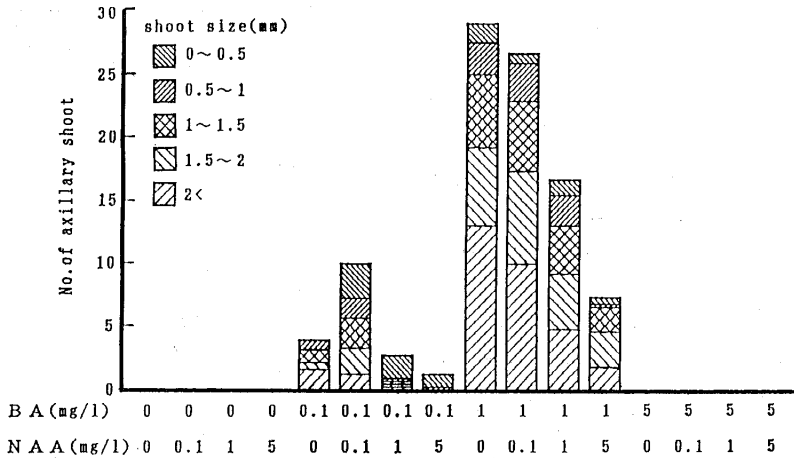


Fig. 1. Effect of various combinations of BA and NAA on axillary shoot formation from explant² of *Opuntia ficus-indica* in vitro. Basal medium: MS. Culture period: 60 days. 5 explants were used for each section. * Explants were obtained by excising the portion above the cotyledon of each seedling. Axillary shoot formation at section of BA 5mg/l could not be measured because they were abnormal.

両実験とも培養期間は60日とし、実験打ち切り日までに増殖したシュート数を調査した。反復数は5とした。

(2) 培地無機塩組成が小植物体の生長に及ぼす影響
MS, 1/2 MS, B5 および White の4種類の培地でシュートを40日間培養し生長を比較した。各培地とも、糖濃度は3%、寒天濃度は0.8%とした。また、生長調節物質は無添加とした。外植体には実生を MS+BA 1mg/l 培地で増殖して得られた約 200mg のシュートを用いた。反復数は処理区当り 10 とした。

(3) 培地の NAA 濃度が小植物体の生長に及ぼす影響

実生苗から採取した外植体を NAA 濃度を 0, 0.1, 1 および 5mg/l の4段階とした MS 培地で60日培養し、生長を比較した。反復数は処理区当り 5 とした。

なお、各実験とも培養容器には容積 40 ml の試験管を用い、培地分注量は 8 ml とした。

培養条件は各実験とも 25℃ 一定、棚面照度で 3,000 ~4,000 lux, 16時間明期とした。

馴化は発根した小植物体をパーミキュライトとピートモスを 1:1 に混合した培土に移植してガラス室内で行った。

3. 結果および考察

(1) 培地条件がシュートの増殖に及ぼす影響

(a) 生長調節物質

シュートの発生数についてみると、BA 1mg/l 単用区

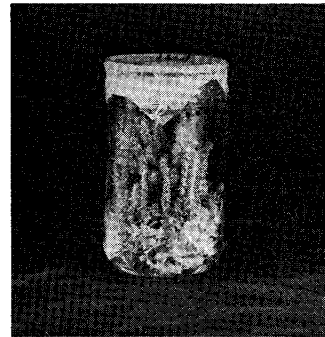


Fig. 2. Multiple shoot formation of *O. ficus-indica* on MS medium supplemented with 1mg/l BA.

および BA 1mg/l+NAA 0.1mg/l 区の両区の間には有意差がなく、本実験で設定した 16 区のうちでは最多であった (Fig. 1)。BA 濃度を 0.1mg/l とした区では、シュート発生数は BA 濃度が 1mg/l の区に劣り、一方、BA 濃度を 5mg/l とした区では NAA 濃度に関わらず、若干の組織の分化は認められたものの、その大半は表面がカルス状で、さらに褐変・肥大していたためシュートとして判別不可能であり測定はできなかった。また、BA 無添加の4区では、シュートの発生はまったくみられなかった。したがって、増殖培地中の BA 濃度は 1mg/l 前後が適していると考えられる。Mauseth は数種のサボテン科植物の組織培養において、増殖培地中

の BA 濃度は 1 および 10 mg/l が適していたと報告している¹⁰⁾。また、Hugo らは *O. amyclaea* の組織培養において、培地中の BA 濃度が 1×10^{-5} M (約 2.25 mg/l) においてシュート発生数が最大であったと報告している⁹⁾。本実験において最適であると考えられた BA 1 mg/l という濃度は、過去の報告と比較するとやや低めであると考えられる。これは本種の特性であると考えられるが、外植体が発生することも原因である可能性があり、さらに検討が必要である。

一方、NAA の添加はシュート発生に対してほとんどの場合抑制的に働いた。また、NAA 濃度の増加に伴い、外植体自体が異常に肥大し、また、発生したシュートがカルス化する傾向がみられた。カルス化したシュートは発根培地へ移植後の生長が悪く枯死する確率も高いことから、増殖培地には NAA を添加しないことが望ましいと考えられる。過去のサボテン科植物の組織培養においてオーキシンとサイトカイニンの組合せについて検討を行っている報告は多い。しかし、その大半が、カルス経由でシュートを得る目的で行われている。したがって本実験のように腋芽から直接シュートを誘導する場合にはオーキシンの添加は実用的な観点からは逆効果であると考えられた。

しかし、BA 0.1 mg/l + NAA 0.1 mg/l 区はシュートの発生数こそ 10 と少なかったが、カルス化が全くみられず健全で、さらに、発生したシュートが大きく、20 mm 以上のシュートは 2.8 本と本実験の設定条件内では最多であった。また、この区では、シュートの発生数は BA 0.1 mg/l 単用区を上回っていたことから、BA と NAA の相乗効果が現れていたと考えられた。この効果は BA および NAA のいずれも 0.1 mg/l という低濃度においてのみみられ、それ以上の濃度においてはみられなかった。このことより、食用ウチワサボテンの組織培養においては BA と NAA の相乗作用はそれぞれの濃度が低い場合のみ現れることが推察される。この現象については、小植物体内の生長調節物質のレベルと関連していることが推察されるが、本実験においては明らかではなく、さらに検討が必要であると考えられる。

(b) ゲル化剤

シュート発生数が多かったのは寒天の 0.4% およびゲルライトの 0.2%, 0.3% 区であった (Table 1)。中でも寒天 0.4% 区は発生したシュートに水浸状およびカルス化したものがほとんどみられず、シュートの増殖にとって最も適していると考えられる。

一方、液体培地では、外植体自体が異常に肥大した。

Table 1. Effect of concentration of two different solidifying agents on axillary shoot formation of *Opuntia ficus-indica* in vitro.

Concentration of solidifying agent		No. of axillary shoots
Agar	0.4%	25.8 a
	0.8%	13.4 b
	1.2%	9.0 bc
Gelrite	0.1%	10.6 bc
	0.2%	24.0 a
	0.3%	25.2 a
Liquid		1.2 c ²

Basal medium: MS containing BA 1 mg/l.

Culture period: 60 days

5 explants were used for each section.

Explants were obtained by excising the portion above the cotyledon of each seedling.

² Means followed by the same letter within columns are not statistically different (Duncan's multiple range test, $p=0.05$).

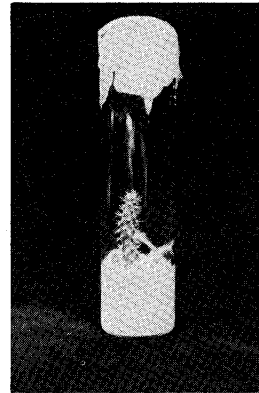


Fig. 3. A rooted plantlet of *O. ficus-indica* in vitro.

外植体内部は透き通って水浸状になっており、表面はカルス化していた。また、外植体の肥大に伴い、ほとんどの刺座は肥大し、腋芽は分化しかけていたものの、それに続く発達はみられず実際にシュートと判断できるものはほとんど得られなかった。したがって、食用ウチワサボテンの培養においては、液体培地は増殖培地には不適であることが明らかとなった。

ゲルライト 0.1% 区では液体培地に似た傾向がみられ、カルス化し褐変したシュートが多かった。また、寒天 1.2% 区は元の外植体および発生してきたシュートが萎凋気味であり、ともにシュート発生数はやや劣った。

(2) 培地無機塩組成が小植物体の生長に及ぼす影響
小植物体全体の生長は MS 区が最も優れており、次

Table 2. Effect of different basal media on growth of plantlet of *Opuntia ficus-indica* in vitro.

Medium	Plant height (mm)	Diameter of shoot (mm)	No. of roots	Root length (mm)	Fresh weight		
					Shoot (mg)	Root (mg)	Total (mg)
MS	36.4 a*	5.4 a	10.1 ab	46.5 a	513.1 a	36.1 b	549.1 a
1/2 MS	33.8 a	5.2 a	13.6 a	43.8 a	447.4 a	67.0 a	514.4 a
B 5	28.8 b	5.0 a	5.6 c	53.0 a	376.0 ab	23.4 b	399.4 a
White	25.1 b	5.1 a	6.9 bc	56.1 a	370.7 ab	37.9 b	404.1 a

Explants were obtained through the culture of seedling on MS containing BA 1 ppm.

Culture period: 40 days

10 shoots were used for each section.

* Means followed by the same letter within columns are statistically different (Duncan's multiple range test, $p=0.05$).

Table 3. Effect of NAA concentration on the growth of plantlet of *Opuntia ficus-indica* in vitro.

NAA concentration (mg/l)	No. of roots	Root length (mm)	Plant height (mm)	Diameter of shoot (mm)	Fresh weight (mg)
0	8.6 d ₂	87.4 a	26.8 c	5.0 b	314.5 c
0.1	12.0 c	58.0 bc	23.4 c	5.6 b	302.3 c
1	21.2 b	65.0 bc	41.4 b	6.7 b	755.8 bc
5	40.2 a	33.6 b	66.6 a	10.8 a	2119.8 a

Basal medium: MS. Culture period: 60 days

5 explants were used for each section.

* Means followed by the same letter within columns were not statistically different (Duncan's multiple range test, $p=0.05$).

Explant was obtained by excising the portion above the cotyledon of each seedling.

いで 1/2 MS 区, White 区, B 5 区の順であった (Table 2). Johnson らもまた, *Opuntia* 属および *Mammillaria* 属のサボテン科植物の組織培養において MS 培地が有効であったことを報告している⁵⁾. この原因は, サボテンは好窒素植物であり¹²⁾, このため供試培地中では最も窒素を多く含む MS 培地において生長が最大になったことによると考えられた. しかし, White 培地では培地中の窒素は B 5 培地の約十分の一と極端に少ないにも関わらず, 生長にはほとんど差がなかったことから, 単に培地中の窒素だけが生長を律速するとは考えられない. したがって今後は他の要因についても考慮する必要がある. 特に, NH_4^+ は培養中のサボテンの生長を抑制するという報告もあるため⁶⁾, 今後さらに, NO_3^- と NH_4^+ のバランスについても考慮する必要があるだろう.

地上部と根の生長を区別して考えると, 地上部の生長ではやはり MS 区が最大であった. White 区と B 5 区にはほとんど差がなく, 共に MS 区よりかなり劣った. 一方, 根の生長に関しては, 1/2 MS 区が最大であった.

特に, 新鮮重では 67.0 mg と他の 3 区の 2 倍近い値であった. ただし, 根長に関しては 1/2 MS 区が最も劣っていたものの, 処理区間に有意差はなかった.

(3) 培地中の NAA 濃度が小植物体の生長に及ぼす影響

NAA 濃度が高くなるにつれて発根数は増加した (Table 3). 5 mg/l 区の発根数は 40 本と, 無添加区の 4 倍以上であった. 逆に根長は, 無添加区が 87.4 cm と最も長く, 5 mg/l 区は無添加区の半分以下であった.

小植物体の新鮮重は, 無添加区と 0.1 mg/l 区には差はなかったが, 1 mg/l 区は 755.8 mg と無添加区の約 2 倍, また 5 mg/l 区は 2119.8 mg と約 6.7 倍であった. 以上のように NAA 濃度が高いほど生長が優れていたが, 本実験区の NAA 濃度設定範囲内では生長の上限は認められなかった. Mauseth は数種のサボテンの培養において, 発根培地中の NAA 濃度は 10 mg/l が最適であったと報告しており¹⁰⁾, *O. ficus-indica* においてもより高い NAA 濃度条件において生長の促進が期待されるため, さらに検討が必要である.

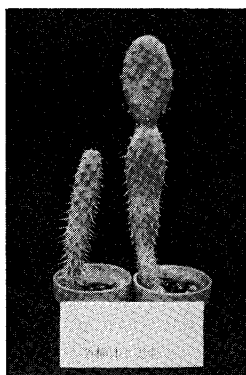


Fig. 4. Acclimated plantlets of *O. ficus-indica* 7 months after transferring to a pot. left: cylindrical shape, right: typical cladode shape.

(4) 馴化後の植物体の特性

小植物体の活着率は 100% であり、活着後は斉一な生育が認められた。小植物体は培養中は円筒状の形態であったが、馴化以後、茎節が偏平になり、典型的なウチワサボテンの形態を示した (**Fig. 4**)。また、培養中には多くの小植物体で刺の分化が見られたが、馴化後の生長に伴い芒刺以外の刺はほとんど形成されなくなった。したがって組織培養によって増殖した苗は茎節に刺(芒刺は除く)がなく、食用および飼料用としての利用の拡大が期待できる。

以上、食用ウチワサボテンは組織培養の技術を用いることにより、均一な個体を大量にかつ急速に得ることが可能であり、実用的な利用の可能性が示唆された。この手法は遺伝資源の保存および有望な交配実生の急速な増殖にも応用できるであろう。Starling¹⁵⁾ もまた数種のサボテンにおいて実生を外植体として培養を行い、従来の繁殖法に比べ極めて効率的な生産が可能であると報告している。本実験においても実生からの外植体を使用したのが、誘導された小植物体には差異は認められなかった。また、実生を外植体として利用する培養系においては、Starling が指摘しているように¹⁵⁾、きわめて不安定な発芽直後の時期を無菌的な条件下で育成できるため、立ち枯れ病の危険がなく、生存率を飛躍的に高めることが可能である。

しかしながら緒言でも述べたように実生は遺伝的に不安定であることから実用的には選抜された優良個体の成株の茎節を用いることがより望ましい。そこで本実験とは別に成株の茎節を外植体に用いた培養も試みたところ、実生から誘導されたものと外観上差がないシュート

が得られた。しかし、極めて高率のコンタミネーションが発生し、大半の外植体が枯死したため得られたシュートは極めて少数であった。対策としていくつかの消毒法を試みたが効果がなかったことから、茎節内に内在する菌が原因であると考えられる。この高率で発生するコンタミネーションはサボテンの茎節を培養するときの問題とされており^{1,4)}、実用的な生産のためには有効な消毒法および外植体に使う植物体の圃場での管理について検討する必要がある。

今後、より実用的な生産のためには、上記の諸問題に加えて継代培養の影響や馴化後長期間にわたる生長の観察などが必要である。また、食用ウチワサボテンは CAM 植物であり¹⁶⁾、通常短日および昼夜温度差などの特殊な環境条件を要求する。このため、培養環境条件についても検討する必要があると考えられる。

文 献

- 1) Ault, J. R., W. J. Blackmon, 1987. HortScience, **22**: 126-127.
- 2) Bailey, L. H., 1960. In "Manual of Cultivated Plants," p. 703-704, Macmillan Co., New York.
- 3) Escobar, H. A. A., et al. 1986. Plant Cell, Tissue Organ Cult., **7**: 269-277.
- 4) Johnson, J. L., E. R. Emino, 1979. HortScience, **14**: 605-606.
- 5) Johnson, J. L., E. R. Emino, 1979. Cact. Succ. J. (U. S.), **51**: 275-277.
- 6) Lassocinski, W., 1985. Acta Hort., **167**: 287-291.
- 7) Mauseth, J. D., W. Halperin, 1975. Am. J. Bot., **62**: 869-877.
- 8) Mauseth, J. D., 1976. Am. J. Bot., **63**: 1295-1301.
- 9) Mauseth, J. D., 1977. Cact. Succ. J. (U. S.), **49**: 80-81.
- 10) Mauseth, J. D., 1979. Cact. Succ. J. (U. S.), **51**: 186-187.
- 11) Murasige, T., F. Skoog, 1962. Physiol. Plant., **15**: 473-497.
- 12) Nobel, P. S., 1983. Am. J. Bot., **70**: 1244-1253.
- 13) Sachar, R. C., R. D. Iyer, 1959. Phytomorphology, **9**: 1-3.
- 14) Samish, Y. B., S. J. Ellern, 1975. J. Range Manage., **28**: 365-369.
- 15) Sterling, R., 1985. Cact. Succ. J. (U. S.), **57**: 114-115.
- 16) Szarek, S. R., I. P. Ting, 1977. Photosynthetica, **11**: 330-342.

Summary

In vitro Propagation of Edible Cactus (*Opuntia ficus-indica*)

Yasaburo ODA and Hiroki SAWADA

*College of Agriculture, University of Osaka Prefecture
Sakai, Osaka 591, Japan*

The method for mass propagation of edible cactus (*Opuntia ficus-indica*) was investigated by *in vitro* culture, and the following results were obtained:

1. Shoot and root growth on a Murashige and Skoog (MS) basal medium were better than those on 1/2 MS, White, and B5 basal media.
2. The optimum condition of growth regulators for shoot proliferation was 1 mg/l BA and 0-0.1 mg/l NAA.
3. Optimum conditions of gelling agents for shoot multiplication were 0.4% for Gel-rite and 0.2-0.3% for agar.
4. Maximum root and shoot growth were obtained at 5 ppm NAA.
5. Rooted plantlets were acclimatized with relative ease.