

フキ組織培養苗の増殖と馴化

古賀正明・平島敬太・中原隆夫

フキの茎頂由来の組織培養苗について、腋芽増殖のための好適培養条件、増殖率並びに馴化法について検討し、以下の事項を明らかにした。①フキの茎頂由来の組織培養苗を2 mg/lのBAを添加した1/2MS培地に移植し、生じた腋芽を分割し0.01mg/lのNAAを添加した1/2MS培地（発根培地）に移植して培養することにより、100日間で約40倍に増殖することができる。②増殖したシュートを発根培地で再度16日間培養後、バーミキュライトを入れた98セルのセル成型トレイに移植し、2週間ポリ塩化ビニリデンフィルムで被覆することにより、高い生存率かつ良好な生育状態で馴化できる。③上記方法により、増殖開始後約134日で定植用苗の供給が可能である。

[キーワード：フキ、組織培養、増殖、馴化]

Micropropagation and Acclimatization of Tissue Culture Plantlets of Japanese Butterbur (*Petal japonicus* Miq.). KOGA Masaaki, Keita HIRASHIMA and Takao NAKAHARA. (Fukuoka Agric. Res. Cent., Chikushino, Fukuoka 818, Japan) *Bull. Fukuoka Agric. Res. Cent.* 14: 87-91 (1995)

In order to develop the supply technique of tissue culture plantlets of Japanese Butterbur (*Petal japonicus* Miq.), conditions for micropropagation by means of axillary bud and for acclimatization were optimized and propagation rate were elucidated. Tissue culture plantlets are able to be propagated about fortyfold by 100 days through transplanting the axillary buds generated from the plantlets on the 1/2MS solid media supplemented with 2mg/l BA to the same media containing 0.01mg/l NAA (root inducing medium). The plantlets propagated through above method and followed by 16 days culture on the root inducing media are able to be acclimatized with high viability and quite healthy by transplanting the cells in a 98 wells-tray filled with vermiculite and wrapped for 2 weeks. By these methods, the transplantable plantlets to soil are ready for supplying by 134 days since propagation starts.

[Key words : Japanese butterbur (*Petal japonicus* Miq.), Tissue culture, Micropropagation, Acclimatization]

結 言

フキは古来から春の味覚として愛好され、本県では主に二丈町や庄内町で産地が形成されている。多収性、早生性の品種「愛知早生」を栽培しているが、地下茎を分割する長年の栄養繁殖の結果、生産現場ではウイルス病や土壌伝染性病害による収量及び品質の低下が大きな問題となり、ウイルスフリー株の導入が強く望まれている。

しかしながら、圃場に定植されたウイルスフリー株も、栄養繁殖を繰り返す過程で、アブラムシ等の媒介虫により次第にウイルスに再感染するため、定期的な種苗更新が必要である。他方、フキは種根採取を目的としても、1年間で僅かに10倍程度にしか増殖できず、更新用の多数のウイルスフリーの母株をウイルスの再感染を防ぎつつ圃場で増殖することは極めて困難である。

このため、ウイルスフリーの組織培養苗を試験管内で効率よく増殖した後、定期的に生産現場に供給する体系を確立する必要がある。フキの大量増殖には、カルス²⁾、腋芽^{1,2)}、苗条原基^{3,6)}及び不定胚⁵⁾を利用する方法が報告されている。これらのうち、腋芽を用いた増殖法は、変異が極めて少なく¹⁾培養操作が簡便なため、最も普及性が高いと考えられる。

カルスと腋芽を組合わせた増殖体系は森下ら²⁾により、腋芽増殖は岩本ら¹⁾により報告されている。しかし、これらの供試材料はいずれも、葉柄や頭花のカルスからの再生直後のシュートであり、変異の発生も懸念される。また、

実用レベルでこのようなシュートを定期的に用意するのは労力の点からも困難である。そこで、本研究では、培養容器内で継代中の茎頂由来の組織培養苗を材料に用い、腋芽増殖のための培養条件及び増殖率について検討した。

また、フキ組織培養苗の馴化法についてもいくつかの報告^{1,2)}があるが、セル成型トレイの利用、フィルムの被覆期間、植物体の生育状態と馴化との関係については報告されていない。そこで、これらの点について検討を行った。

試 験 方 法

1 腋芽増殖

フキ「愛知早生」の地下茎の成長点をBA 0.1mg/l、ショ糖 30g/l、ゲランガム 2g/lを含むMurashige-Skoog培地⁵⁾に置床・培養することにより無菌植物を育成し、40mlの固形培地の入ったプラントボックス(60×60×100mm)中で継代した。継代には、無機塩濃度を1/2に減じたMurashige-Skoog(以下1/2MSと表示)培地にショ糖 30g/l、ゲランガム 2g/l、1-ナフタレン酢酸(NAA) 0.01mg/lを添加した発根培地を用い、25℃、約6,000Lux、16時間照明の条件下で培養を行った。以下、培地のpHは全て5.8とした。

(1) サイトカイニンが腋芽増殖に及ぼす影響

ショ糖 30g/l、ゲランガム 2g/lを加えた1/2MS培地に、各々2.0mg/lのベンジルアデニン(BA)、ゼアチン(Zeatin)、N-(2-クロロ-4ピリジル)-N'-

フェニルウレア (4-PU) 及び 6-(γ - γ ジメチルアリルアミノ) プリン (2-ip) の 4 種のサイトカイニンを添加し、増殖培地とした。継代中の草丈約 40~70 mm の無菌植物を、1 個のプラントボックス当たり 4 本移植して 48 日間培養後、腋芽の増殖状態を調査した。

(2) BA 濃度が腋芽増殖に及ぼす影響

BA を 0.1, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0mg/l 添加した増殖培地を用いて、(1)と同様の試験を行った。培養日数は 59 日間とした。さらに、増殖培地上に生じたシュートを 1 本ずつに分割し、発根培地 1 個当たり 4 本ずつ移植し、45 日間培養して同様に調査した。

2 組織培養苗の馴化

(1) フィルムの被覆期間が馴化に及ぼす影響

バーミキュライトを入れた 98 セル (セル容積約 38cm³) のセル成型トレイ (27 × 54cm) 3 つに各々、発根培地で十分に養成した草丈約 40~70mm の無菌植物を、1 セル当たり 1 本ずつ、展開葉を 2~3 枚にして移植した。トレイを各々プランター (27 × 55 × 27cm) に入れ、セル成型トレイの底部が浸る程度に水を張った。プランター上部を厚さ 0.01mm のポリ塩化ビニリデンフィルムで被覆し、25℃、約 6,000Lux、16 時間照明下で 42 日間育成した後、生存率、草丈、葉数を調査した。被覆期間は、各々 0, 7, 14 日間とした。

(2) セル成型トレイのセル数と用土が馴化に及ぼす影響

バーミキュライトを入れた 98 セルと 128 セル (セル容積約 31cm³) のセル成型トレイ及び園芸培土 (清新産業株式会社製) を入れた 98 セルのセル成型トレイに発根培地で十分に養成した組織培養苗を 1 セル当たり 1 本ずつ移植し、(1)と同様の方法で馴化した。ただし、被覆期間は 12 日間とし、フィルムの除去後はプランター中の水位を維持したまま、ブラインドで直射光を遮断した 25℃の実験室内に 17 日間置いた。馴化 12 日目と 29 日目に、生存率及び最長根長を調査した。

(3) 組織培養苗の生育状態が馴化に及ぼす影響

BA 2.0mg/l の増殖培地での 55 日間の培養に続き、発根培地で 27 日間培養して得られた全シュートを再び発根培地に分割・移植した。2 回目の発根培地での培養 0, 8, 16, 24 日後に、バーミキュライトを入れた 98 セルのセル成型トレイを用い 2 週間のフィルム被覆により馴化した。2 回目に発根培地に移植した日から起算して 51 日目に植物体の生死を調査した。

結 果

1 腋芽増殖

(1) サイトカイニンが腋芽増殖に及ぼす影響

培地に添加した 2mg/l の 4 種のサイトカイニンが腋芽増殖に及ぼす影響を第 1 表に示した。シュートの発生は BA を添加した場合に最も多く、5.7 本であった。また、シュート塊の重量についても BA を添加したときが最も重かった。しかしながら、BA を添加した場合、増殖培地上での発根は認められなかった。一方、Zeatin と 2-ip を添加した場合にはシュート長、最長根長が長く、葉数が多かった。

第 1 表 サイトカイニンが腋芽増殖に及ぼす影響^{1,2)}

サイトカイニン	シュート数 (本)	シュート塊 重量(g)	シュート長 (mm)	葉数/シュート (枚)	最長根長 (mm)
BA	5.7a ³⁾	2.37	40.2b	3.2b	0b
Zeatin	3.7b	2.08	48.0a	3.4b	58.1a
2-ip	2.5c	2.07	50.6a	4.1a	63.5a
4-PU	3.2bc	1.91	39.1b	2.6c	0b

1) 培養期間は 48 日。

2) 調査数は各 30~90。

3) 最小有意差法により、異文字間は 5%水準で有意差あり。

(2) BA 濃度が腋芽増殖に及ぼす影響

増殖培地の BA 濃度が増殖培地での腋芽増殖とその後の発根培地での培養に及ぼす影響を調査し、第 2 表に示した。増殖培地上に形成されたシュート数が最も多い BA 濃度は 2mg/l であり、15.4 本のシュートが生じた。BA 濃度が 2mg/l までは、濃度が高いほど増殖培地上で発生したシュート数が多かったが、2mg/l 以上にすると逆に、濃度が高いほど発生したシュート数は少なかった。また、5.0mg/l までは、濃度が高いほど短いシュートが発生する傾向が認められた。

さらに、BA を含む増殖培地で生じたシュートを発根培地に移植し 45 日間培養すると、増殖培地の BA の影響が発根培地上のシュートに現れ、その影響の程度は増殖培地の BA 濃度に依存していた。発根培地での培養後、最も多数のシュートを形成したのは、BA10mg/l を添加した増殖培地で得られたシュートであり、そのシュート数は 7.6 本であった。逆に、BA0.1mg/l を含む増殖培地で得られたシュートが発根培地上で形成したシュートは 1.6 本で、最も少なかった。また、BA5.0mg/l まで

第 2 表 BA 濃度が腋芽増殖に及ぼす影響^{1,2)}

増殖培地の BA濃度 (mg/l)	増殖培地上での増殖状態			発根培地上での増殖状態			増 殖 率 (A×B) (倍)
	シュート数 (A) (本)	シュート長 (mm)	葉数/シュート (枚)	シュート数 (B) (本)	シュート長 (mm)	葉数/シュート (枚)	
0.1	6.1bc ³⁾	30.8a	2.9a	1.6c	53.0a	4.5	9.8
1.0	8.9b	14.7c	2.4b	3.2b	52.4a	3.5	28.5
2.0	15.4a	14.4c	2.5ab	2.6bc	39.7b	4.5	40.0
5.0	5.8bc	9.1d	1.8c	3.1b	25.2d	3.5	18.0
10.0	4.9c	25.0b	2.7ab	7.6a	34.0c	2.8	37.2

1) 増殖培地での培養期間は 59 日。発根培地での培養期間は 45 日。

2) 調査数は各 16~30。

3) 最小有意差法により、異文字間は 5%水準で有意差あり。

は増殖培地の BA 濃度が高いほど発根培地では短いシュートが発生する傾向が認められた。

さらに、増殖培地の BA 濃度がいずれの場合でも、発根培地で生じたシュートは、増殖培地で生じたシュートよりもシュート長が長く、葉数が多かった。

2 組織培養苗の馴化

(1) フィルムの被覆期間が馴化に及ぼす影響

フィルムの被覆期間が馴化に及ぼす影響を第3表に示した。いずれも 95 % 以上の高率で生存しており、フィルムの被覆は生存率にはほとんど影響を及ぼさなかった。

また、草丈及び展開葉数については、フィルム被覆を行ったものが無被覆に比較していずれも優っており、フィルム被覆が植物体の生育に効果を持つことが明らかとなった。但し、被覆7日間と14日間では草丈、展開葉数に差は認められなかった。

第3表 フィルムの被覆期間が馴化に及ぼす影響^{1,2)}

被覆期間 (日)	生存率 (%)	草 丈 (mm)	展開葉数 (枚)
0	95	36.8b ³⁾	4.8b
7	95	75.5a	5.8a
14	100	72.0a	6.0a

1) 馴化開始後 42 日。

2) 調査数は各 20。

3) 最小有意差法により、異文字間には 5 % 水準で有意差あり。

(2) セル成型トレイのセル数と用土が馴化に及ぼす影響

セル成型トレイのセル数と用土が馴化に及ぼす影響を第4表に示した。

バーミキュライトを使用した場合、98セルのセル成型トレイを用いると、馴化12日目及び29日目のいずれについても生存率は100%であった。一方、126セルでの生存率は、馴化12日目には91.6%に、馴化29日目には38.1%に低下した。また、園芸培土を入れた98セルのセル成型トレイでは、馴化12日目の生存率は100%であったが、フィルムを取り去った後、急激に枯死し始め、馴化29日目の生存率は33.3%に低下した。

馴化29日目の最長根長は、バーミキュライトを入れた98セルのセル成型トレイに移植した場合が最も長かった。

第4表 セル成型トレイのセル数と用土がフキ組織培養苗の馴化に及ぼす影響

試 験 条 件		馴化12日目 ¹⁾		馴化29日目 ¹⁾
セル成型 トレイ(セル)	用 土	生存率 (%)	生存率 (%)	最長根長 (mm)
98	バーミキュライト	100	100	61.5* ²⁾
126	バーミキュライト	91.6	38.1	45.3
98	園 芸 培 土 ³⁾	100	33.3	44.7

1) 馴化12日目の調査数は約72～98。29日目については各21～24。

2) * : 5 % 水準で有意。

3) 園芸培土：非固結火成岩・赤色土、のこずくん炭、ピートモス、ゼオライト混合、pH 5～6、EC 0.7mS/cm 以下、N 約 200mg/l、P₂O₅ 約 700mg/l、K₂O 約 100mg/l。

(3) 組織培養苗の生育状態が馴化に及ぼす影響

発根培地での植物体の生育状態と馴化との関係を明らかにするため、増殖培地での培養に引き続き発根培地で培養して生じたシュート塊を分割して再び発根培地に移植し、2回目の発根培地での培養日数毎に組織培養苗の生育状態と馴化後の植物体の生死を調査し、その結果を第1図に示した。

1回目の発根培地において組織培養苗の発根は、数本の個体についてのみ促された。2回目の発根培地では、草丈、最長根長は、移植後8日目まではほとんど伸長していなかったが、移植後16日目までに急激に、その後24日目にかけてやや緩やかに伸長した(第1図)。

また、生存率は、発根培地で再度培養せず、直ちに馴化した場合には70%であり、最も低かったが、発根培地での培養日数が長くなるにつれて高まり、発根培地で16日間以上培養することによって100%に達した。

枯死は、再度発根培地に移植せず直接馴化した場合、馴化開始時の草丈が60mm以下又は最長根長が10mm以下の個体で生じ、発根培地で再度8日間培養した場合には、馴化開始時の草丈が50mm以下又は全く発根していない個体で生じた。

考 察

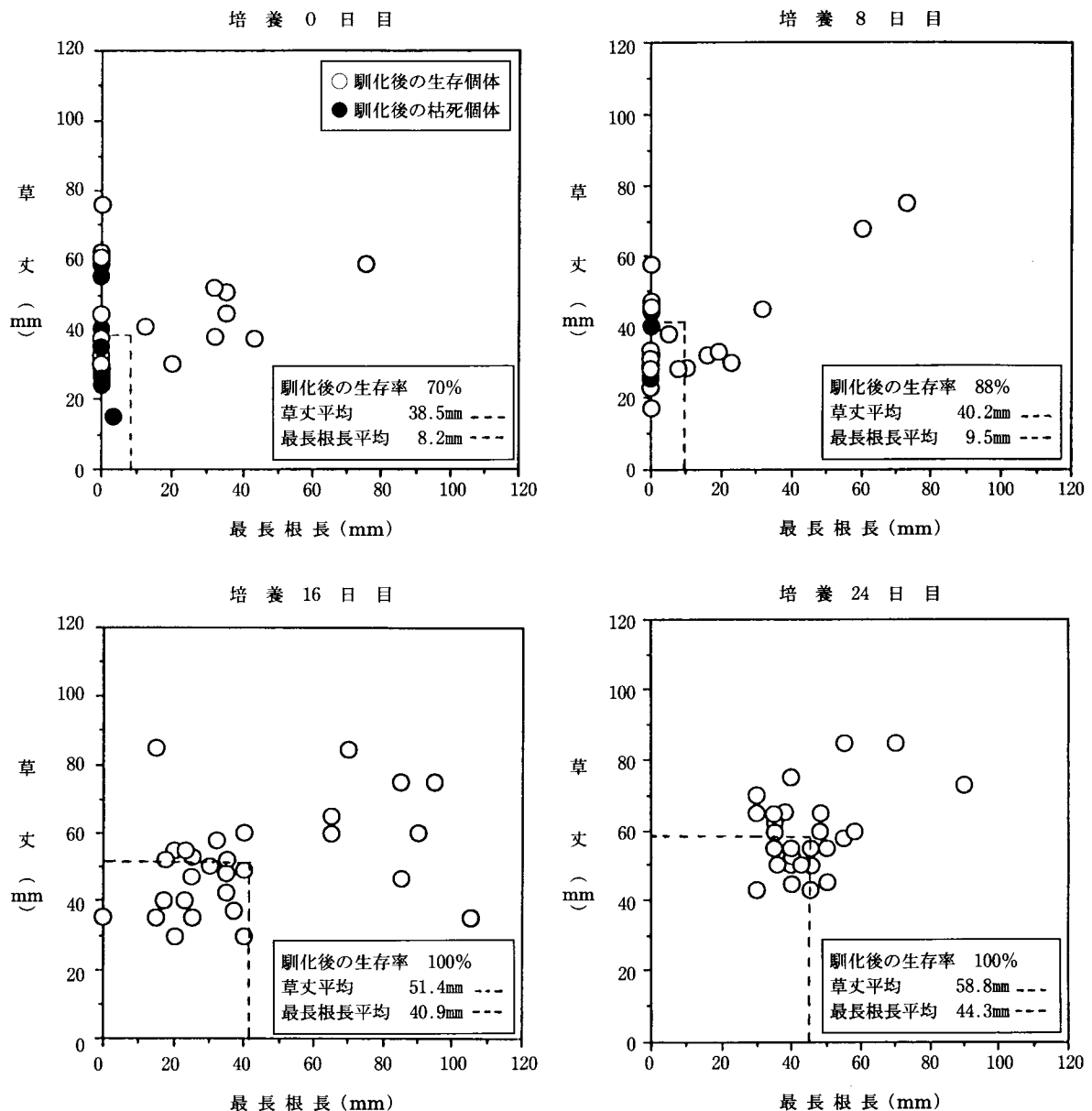
第1表に示す通り、2.0mg/lの濃度で添加した4種のサイトカニンの中で、BAは発根は促進しなかったものの、最も多数のシュートを誘導した。このため、サイトカニンとしてBAを用い、増殖培地での増殖の後、発根培地で培養する試験を行った。

第2表の結果では、BA 2.0mg/lを添加した場合に増殖培地での増殖率が最も高く、培養59日後に15.4倍であったのに対し、岩本ら¹⁾はBA 0.1mg/lを添加した場合に増殖率が最も高く、培養56日後に31.6倍であると報告している。これは、彼らの供試材料が頭花のカルスからの再生直後のシュートであり、植物成長調節物質の影響が残っていたためと考えられる。

増殖培地に引き続き、発根培地で培養することによりシュートはさらに増殖し、培養104日での増殖率は第2表に示す通りであった。増殖率が最も高いのはBA 2.0mg/lの増殖培地を用いた場合で、約40倍に増殖できる。この方法で増殖を繰り返すことにより、圃場では年間に僅かに10倍程度にしか増殖できないフキが、64,000倍以上もの高率で増殖可能となる。

セル成型トレイのセル数については、126セルのものが98セルのものに比較して生存率、最長根長ともに劣っていた。これは、馴化に用いた組織培養苗に対してセルの容積が小さいために、用土が不足して根部の覆土が十分でなく、移植後に倒伏したりフィルム除去後に根部が乾燥したためと考えられる。

岩本ら¹⁾は、用土としてバーミキュライトを使用した場合、馴化率が低く、62%であったと報告している。しかし、本試験の結果、バーミキュライトを用いても、98セルのセル成型トレイに組織培養苗を移植し、これをプランターに入れて上部をフィルムで被覆することにより、極めて高率の生存率で、しかも良好な状態で馴化が可能であることが明らかとなった。



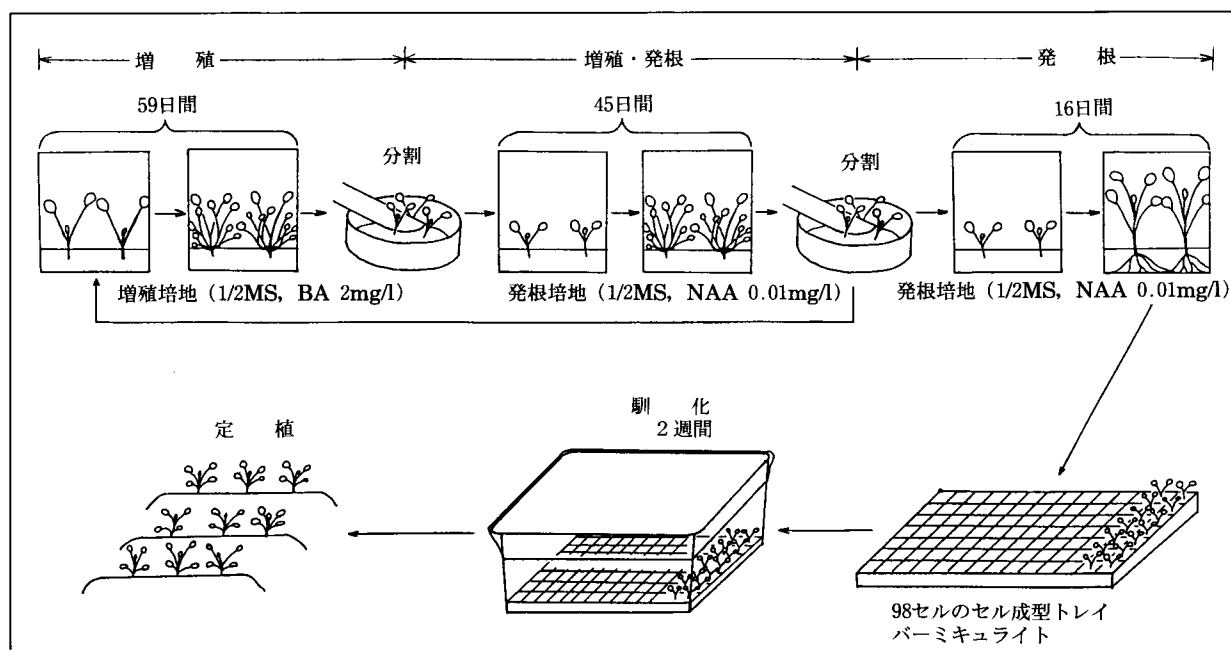
第1図 2回目の発根培地での各培養日数における馴化供試苗の生育と馴化後の生存率との関係

用土として園芸培土を使用すると、馴化12日目から29日目にかけて生存率が大きく低下した。これは、馴化29日目には培土表面が白く変色していたことから、高塩類濃度によるストレスが原因の一つであると推測される。

増殖培地で生じた腋芽を分割し、発根培地に移植・培養して生じたシュート塊は、再び分割して1本ずつにすると、草丈の小さなものが多く、発根程度も貧弱である。これらのシュートを直ちに馴化すると98セルのセル成型トレイとバーミキュライトを用いても30%の個体が枯死した(第1図)。このことから、発根培地での培養に引き続いて再度発根培地に移植し、苗をさらに育成する必要がある事が判明した。再び発根培地で培養することにより、シュート長が伸び、発根が進むに従って馴化後の生存率も向上し、発根培地で16日間以上培養後に馴化することによって生存率が100%に達した(第1図)。枯死した個体は草丈60mm以下、もしくは最長根長10mm以下のものであった。このことから、発根培地で育成した草丈60mm以上かつ

最長根長10mm以上の個体については直ちに馴化を行っても良い。一方、この基準以下のものについては、発根培地で再度16日間以上培養を繰り返し発根及び生育を促進する事により馴化可能な苗となることが明らかとなった。

以上の結果から、増殖から馴化に至る流れ図は第2図の通りとなる。即ち、BA 2mg/lを含む増殖培地で多数の腋芽を生じさせた後、腋芽を分割し、発根培地に移植し、培養する。さらに増殖を繰り返す場合には、生じたシュートを増殖培地に移植する。また、馴化を行うには、分割したシュートを再び発根培地に移植し、16日間の培養の後、バーミキュライトを入れた98セルのセル成型トレイに移植し、2週間フィルムで覆い、馴化を行う。この方法により、組織培養苗を100日間で約40倍に増殖することができ、増殖開始から134日後に健全な定植苗の供給が可能である。



第2図 フキ組織培養苗の大量増殖及び馴化の流れ図

引用文献

- 1) 岩本 嗣・嘉儀 隆 (1994) 組織培養によるフキ (*Petasites japonicus* Fr. Schmidt) ウイルスフリー株の大量増殖. 大阪農技セ研報 30 : 28 ~ 33.
- 2) 森下正博・嘉儀 隆・山田貴義 (1980) フキの花茎および葉柄組織からのウイルスフリー株大量育成. 大阪農技セ研報 17 : 1 ~ 6.
- 3) 村上 章 (1991) 苗条原基と大量増殖 フキの誘導法. バイオホルティ 6 : 26 ~ 27.
- 4) Murashige, T and F. Skoog (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15 : 473 ~ 497.
- 5) 矢部和則・景山幸二・宮蔦成壽 (1990) フキの葉身組織からの体細胞不定胚形成と植物体再分化. 園学雑 59 別 1 : 270-271.
- 6) 矢部和則・景山幸二・宮蔦成壽 (1990) フキの茎頂組織からの苗条原基作出と植物体再分化. 園学雑 59 別 2 : 316-317.