

# 組織培養によるイセイモの種苗増殖に関する研究

## 第2報 多芽体の効率的増殖及び植物体の再生方法

服部英樹・平野三男

Studies of Micro-Propagation of Chinese Yam,  
Ise-imo (*Dioscorea opposita* Thunb) by Tissue Culture

2. Effective mass-production of multiple shoot and method  
for regeneration from multiple shoot

Hideki HATTORI and Mitsuo HIRANO

### 緒言

イセイモはヤマノイモ (*Dioscorea opposita* Thunb.) の一種で、三重県の特産品であり、品質や食味が良いことから市場で高い評価を得ている。従来から指摘されているように、イセイモは増殖率が低いために、生産されたイモの1/3~1/4を翌年度の種イモとして保存しなければならない。この問題を解決するために、前報でイセイモの腋芽から誘導した多芽体が大量増殖技術として有望であることを明らかにした<sup>1)</sup>。しかしながら、この多芽体を利用した増殖にも問題点が多い。イセイモ幼植物体の茎葉を分割し試験管内で挿し木して増殖させる方法と比較して多芽体の増殖率は高いものではなく、効率的な増殖法としては不十分である。また、多芽体から植物体を再生させるには多くの時間を要する。

そこで、多芽体の効率的増殖に有効な化学物質や植物体再生に及ぼす植物ホルモンと培養方法について検討した。なお本試験は農林水産省地域バイオテクノロジー実用化技術研究開発促進事業による助成をうけて行ったものである。

### 材料及び方法

#### 1. 基本培地

基本培地として Murashige and Skoog の培地<sup>2)</sup> (以下 MS 培地と略) の塩類のうち、 $\text{NH}_4\text{NO}_3 \cdot \text{KNO}_3$  の濃度を1/2とし、ショ糖を30 g/l、ベンジルアデニン (以下 BA と略) を5 mg/l 添加した。pHを5.8に調節し、固体培地とするため支持体にはジェランガム

(和光純薬製) を0.2%添加し、試験管1本当りの培地量を8 mlとした。なお、液体培地として試験する場合はジェランガムを添加しないものを用いた。

#### 2. 多芽体の増殖に及ぼすオーキシシン、矮化剤、及び硝酸銀の影響

上記の基本培地にオーキシシン、矮化剤及び硝酸銀を添加し、多芽体の増殖に及ぼす効果を検討した。オーキシシンとしてナフトレン酢酸 (以下 NAA と略, 0.05, 0.5 mg/l) 及び Picloram (0.5 mg/l), 矮化剤としてアンシミドール (5, 10 mg/l) 及び塩化クロロコリン (CCC, 1 mg/l) 並びに硝酸銀 (10 mg/l) を用いた。それぞれの成分を組み合わせて培地に添加し、合計11の試験区 (第1表) を設けた。試験管内で腋芽上に形成させた多芽体をカミソリで分割し、1切片当たり、芽を2~3個有する切片を調製した。切片を各培地に置床し、25°C, 2,000~3,000 lux, 明期14時間の培養室内で、40日間培養した後、切片上に形成される芽数増加率及び芽の伸長度を調査した。

#### 3. 多芽体の増殖に及ぼすサイトカイニンの影響

固体の MS 培地に BA 以外のサイトカイニンを添加し、その効果を検討した。サイトカニンとしてゼアチン (0.001, 0.01, 0.1 mg/l) 及びカイネチン (0.01, 0.1, 1.0 mg/l) を用いた。前項と同様に多芽体を分割した切片を各培地に置床し、25°C, 2,000~3,000 lux, 明期14時間の培養室内で、32日間培養した後、切片を観察

第1表 オーキシン、矮化剤、硝酸銀の組合せ

処	理	区
1	BA (5 mg/ℓ)	
2	BA (5 mg/ℓ) + 硝酸銀 (10mg/ℓ)	
3	BA (5 mg/ℓ) + NAA (0.05mg/ℓ)	
4	BA (5 mg/ℓ) + NAA (0.5mg/ℓ)	
5	BA (5 mg/ℓ) + NAA (0.5mg/ℓ) + 硝酸銀 (10mg/ℓ)	
6	BA (5 mg/ℓ) + Picloram (0.5mg/ℓ)	
7	BA (5 mg/ℓ) + アンシミドール (5 mg/ℓ)	
8	BA (5 mg/ℓ) + アンシミドール (10mg/ℓ)	
9	BA (5 mg/ℓ) + アンシミドール (10mg/ℓ) + 硝酸銀 (10mg/ℓ)	
10	BA (5 mg/ℓ) + CCC (1mg/ℓ)	
11	BA (5 mg/ℓ) + CCC (1mg/ℓ) + 硝酸銀 (10mg/ℓ)	

第2表 イセイモの多芽体増殖に及ぼすオーキシン、矮化剤、硝酸銀の影響

処	理	区	芽数増加率 <sup>a)</sup>	芽の伸長度 <sup>b)</sup>
BA (5 mg/ℓ)			2.7	—
BA (5 mg/ℓ) + 硝酸銀 (10mg/ℓ)			2.8	—
BA (5 mg/ℓ) + NAA (0.05mg/ℓ)			2.4	+
BA (5 mg/ℓ) + NAA (0.5mg/ℓ)			3.2	++
BA (5 mg/ℓ) + NAA (0.5mg/ℓ) + 硝酸銀 (10mg/ℓ)			2.7	++
BA (5 mg/ℓ) + Picloram (0.5mg/ℓ)			1.0	—
BA (5 mg/ℓ) + アンシミドール (5mg/ℓ)			3.2	±
BA (5 mg/ℓ) + アンシミドール (10mg/ℓ)			3.2	±
BA (5 mg/ℓ) + アンシミドール (10mg/ℓ) + 硝酸銀 (10mg/ℓ)			3.6	±
BA (5 mg/ℓ) + CCC (1mg/ℓ)			2.5	—
BA (5 mg/ℓ) + CCC (1mg/ℓ) + 硝酸銀 (10mg/ℓ)			3.1	—

a) 次式で算出し、25~50個体の平均を示す。芽数増加率 = 培養40日後の芽数 / 置床時の芽数

b) 次の基準により肉眼観察を行い、25~50個体の平均を示す。

— : 伸長せず, ± : わずかに伸長, + ~ ++ : 伸長程度を表す

し、多芽体形成切片（多芽体を形成した切片）、茎葉伸長切片（多芽体を形成しないで茎葉を伸長した切片）、枯死切片（芽が枯死した切片）、切片上の芽の増加率、茎葉の伸長量を調査した。

#### 4. 多芽体から植物体再生に及ぼす植物ホルモン並びに培地の種類と培地交換の影響

##### (1) 植物ホルモンの影響

前項と同様に多芽体を分割した切片を、BA (0, 0.02, 0.2mg/ℓ) 及びNAA (0, 0.02, 0.2mg/ℓ) を組み合わせた培地に添加し、合計9試験区を設けた。25℃、2,000~3,000 lux, 明期14時間の培養室内で、70日間培養した後、植物体再生率、草丈、葉数、及び発根率を調査した。なお、供試多芽体は、カイネチン1mg/ℓを含む培地で維持、継代したもの10個を用い、培養70日後に調査した。

##### (2) 培地の種類と培地交換の影響

多芽体を分割した切片を、BA 0.02mg/ℓを含むMS培地（固体及び液体）に置床した。固体培地では、0, 10, 20, 30日間隔で、液体培地では10, 15, 30日間隔で新しいそれぞれの培地に移植した。培養は25℃、2,000~3,000 lux, 明期14時間の培養室内で行い、培養開始60日後、植物体再生率、草丈、及び葉数を調査した。なお、供試多芽体は、BA 5mg/ℓを含む培地で維持、継代したもの10~30個を用い、培養60日後に調査した。

#### 結果及び考察

組織培養では *in vitro* で増殖させる方法がいくつか報告されているが、その中で多芽体を利用した増殖法<sup>3)</sup> はイチゴやカーネーションで一部実用化され、他の多くの作物で実用化に対する期待が高まっている。多芽体は複数の芽から構成される構造であり、先にイセイモの側芽から多芽体を形成させたことを報告<sup>1)</sup> したが、ここではさらにイセイモの多芽体の芽の効率的な増殖や植物体へ

の再生について試験を行い、得られた結果について考察する。

### 1. 多芽体増殖に及ぼすオーキシシン、矮化剤、及び硝酸銀の影響

多芽体増殖に及ぼすオーキシシン、矮化剤、硝酸銀の効果第2表に示した。BA 5 mg/lのみを含む基本培地で培養すると、40日後に多芽体の芽数は2.7倍に増加した。この培地にさらにPicloram, CCC, 硝酸銀を加え培養した結果、BAのみを添加した培地で培養した場合と比較しても芽数の増加が見られず、多芽体の芽数増加に及ぼすこれらの薬剤の顕著な効果は見られなかった。またNAAを0.5mg/l添加すると、芽数の増加はみられたが、個々の芽が伸長して、多芽体構造を形成することができなかつたため、NAAは多芽体の増殖という点からは不適當であると考えられた。BA及びアンシミドールを添加した場合にはBA単用の培地に比べ高く、わずかに芽は伸長したものの多芽体構造を形成することができた。また、アンシミドールにさらに硝酸銀を添加すると芽数が3.6倍に増加した。このように、イセイモ多芽体の増殖培地としてはBA 5 mg/l + アンシミドール 10 mg/l + 硝酸銀 10 mg/l を添加した修正MS培地が適していた。アンシミドールは穂の節間を短縮させる効果があり、この矮化作用がイセイモ多芽体から茎葉の伸長を抑制し、多芽体構造を維持するのに有効であると考えられる。また硝酸銀はその作用機構については明らかでないが、アンシミドールの作用を助長する効果があることが推察できた。

### 2. 多芽体の増殖に及ぼすサイトカイニンの影響

BA以外のサイトカイニン類が多芽体の増殖に及ぼす効果を第3表に示した。ゼアチン0.1mg/l区及びカイネチン1.0mg/l区においてBAを含む培地で培養した場合よりも芽数増加率が高くなる傾向であった。またゼアチンを添加すると茎葉を伸長する切片の割合が低くなり、カイネチンを添加すると枯死する切片が少なかった。以上のように、ゼアチンあるいはカイネチンは芽の増加を促進する効果を有することが明らかになった。さらにゼアチンは茎葉の伸長を抑え、カイネチンは芽の枯死を防ぐことがわかった。多芽体は複数の芽から構成される構造であり、多芽体のみで増殖させる期間中は茎葉が伸長したり、枯死することは避ける必要がある。従って、多芽体として一定の芽が増殖し、なおかつ多芽体構造を維持させるのに有効な培地添加物として、BA、アンシミドール、硝酸銀、ゼアチン、及びカイネチンが有効であると考えられた。

### 3. 多芽体から植物体再生に及ぼす植物ホルモン並びに培地の種類と培地交換の影響

#### (1) 植物ホルモンの影響

植物体再生に及ぼす植物ホルモンの効果を第4表に示した。BAとNAAの組み合わせがそれぞれ0.02mg/lと0mg/l、0.2mg/lと0mg/l、0mg/lと0.02mg/lの組み合わせで、植物体が再生する切片が多くなり、またBAを0.02mg/l含む区では、発根切片が多かった。再生した植物体の生育状況を見ると、草丈・葉数はBA及びNAA濃度が低い方がより大きくなる傾向であった。

植物体再生率が高い傾向にあったのはBAのみを添加した試験区であり、草丈、葉数、発根率を調査した結果でも、BA 0.02mg/lを単独で培地に添加したときに多

第3表 イセイモの多芽体増殖に及ぼすサイトカイニン類の影響

区分	濃度 (mg/リットル)	a) 多芽体形成切片 (%)	b) 茎葉伸長切片 (%)	c) 枯死切片 (%)	d) 芽数増加率 (%)	e) 茎葉の伸長量 (cm)
BA	5.0	78	10	12	2.5	0.46
	0.001	32	58	10	2.0	1.45
	0.01	54	44	2	2.1	1.18
ゼアチン	0.1	84	4	12	3.3	0.77
	0.01	16	76	8	2.1	1.45
カイネチン	0.1	40	58	2	1.5	1.19
	1.0	90	10	0	3.8	1.06

- a) 多芽体形成切片 = 培養32日後の多芽体形成切片数 / 置床時の切片数 × 100  
 b) 茎葉伸長切片 = 培養32日後の茎葉伸長切片数 / 置床時の切片数 × 100  
 c) 枯死切片 = 培養32日後の芽枯死切片数 / 置床時の切片数 × 100  
 d) 芽数増加率 = 培養32日後の芽数 / 置床時の芽数。25個体の平均値を示す。  
 e) 伸長した茎葉の長さを測定し、25個体の平均値を示す。

第4表 植物体再生に及ぼす植物ホルモンの影響

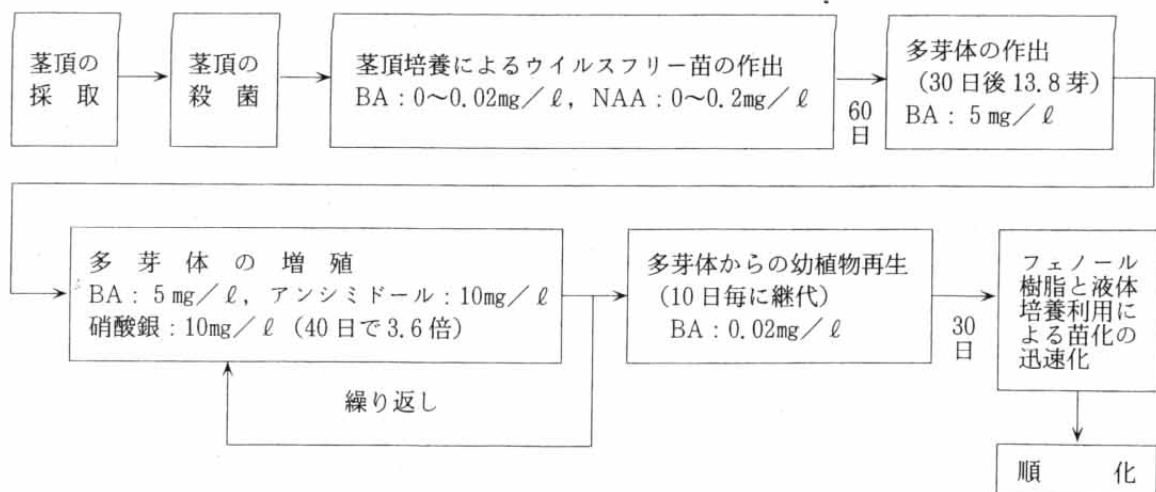
BA	NAA (mg/リットル)	a) 植物体 再生切片 (個)	b) 植物体 未再生切 片(個)	c) 発根切 片(本)	d) 枯死切 片(個)	e) 草 丈 (cm)	f) 葉 数
0	0	4	0	3	6	2.13	2.50
	0.02	9	0	8	1	1.79	2.44
	0.2	8	1	5	1	1.46	2.13
0.02	0	9	0	9	1	1.96	2.44
	0.02	6	0	6	4	2.15	2.33
	0.2	6	2	5	2	1.85	2.00
0.2	0	9	0	3	1	1.28	2.22
	0.02	8	1	5	1	1.31	2.00
	0.2	8	0	2	2	1.30	1.50

- a) 植物体を再生した切片  
 b) 植物体を再生しなかった切片  
 c) 植物体を再生した切片のうち発根した切片  
 d) 芽が枯死した切片  
 e) 再生した植物体の平均草丈  
 f) 再生した植物体の平均葉数

第5表 植物体再生に及ぼす培地の種類と培地交換の影響

区 分	a) 植物体再生 切片 (%)	b) 植物体未再 生切片 (%)	c) 枯 死 切 片 (%)	d) 草 丈 (cm)	e) 葉 数
ホルモンフリー	70	10	20	1.30	2.00
固 体 10	75	15	10	1.47	2.00
” 20	80	15	5	1.51	1.25
” 30	60	10	30	1.53	2.40
” 60	65	5	30	1.31	1.43
液 体 10	80	13	7	2.28	2.00
” 15	57	23	20	2.26	1.57
” 30	53	13	33	2.27	1.75

a) ~ e) は第4表に準じる。



第1図 イセイモ多芽体を利用した種苗の大量増殖システム

芽体から植物体再生が最も良好であった。

#### (2) 培地の種類と培地交換の影響

植物体再生に及ぼす培地の種類と培地交換の影響を第5表に示した。多芽体から植物体を再生した切片のうち最も再生率が高かったのは、固体培地で20日ごと及び液体培地で10日ごとに移植した区であり、再生率は80%であった。また液体培地で移植する場合には固体培地よりも草丈が大きくなる傾向がみられた。

以上の結果から多芽体からイセイモの植物体を再生させる大量増殖システムを推定すると第1図のようになる。すなわちこのシステムは①茎頂培養によるウイルスフリー苗の作出、②試験管内のウイルスフリー苗の腋芽からの多芽体の作出、③多芽体の分割による芽の増殖、④多芽体からの植物体再生、⑤液体培養とフェノール樹脂を用いた迅速な苗化から構成される。ただしこのシステムは現在までに行った個別の試験結果を継ぎ合わせたものであり、今後、個別技術を組み合わせた体系的な試験を行い、多芽体に由来する種イモを栽培し、収穫したイモの実用性及び変異の発生程度を調査する必要がある。

#### 摘 要

イセイモの多芽体を利用したイセイモの増殖法を確立するため、多芽体の効率的増殖に有効な化学物質や植物体再生に及ぼす植物ホルモンと培養方法について検討し、次の結果を得た。

1. MS培地にBA 5 mg/l, アンシミドール 10mg/l, 硝酸銀 10mg/l を添加すると, BA 5 mg/l の単独添加よりも多芽体上の芽数が増加した。
2. ゼアチン 0.1mg/l あるいはカイネチン 1.0mg/l をMS培地に添加すると高い芽数増加率が得られた。
3. 多芽体から植物体を再生させるにはMS培地にBA 0.02mg/l を添加するのが有効であった。
4. 液体培地で10日ごとに新しい培地に移植すると植物体再生率は80%で、再生した植物体の草丈は2.8 cmであった。

#### 引用文献

- 1) 平野三男, 立松伸夫, 服部英樹, 橋爪不二夫, 河野満 (1993): 三重県農業技術センター研究報告 21, 41-50.
- 2) Murashige, T. and F. Skoog (1962) *Physiol. Plant* 15, 473-497.
- 3) 大沢勝次 (1998) 農業及び園芸 63, 92-96.

Studies of Micro-Propagation of Chinese Yam,  
Ise-imo (*Dioscorea opposita* Thunb) by Tissue Culture

2. Effective mass-production of multiple shoot and method for regeneration from multiple shoot

Hideki HATTORI and Mitsuo HIRANO

### SUMMARY

The work for the establishment of the micro-propagation of Chinese yam was undertaken to investigate the effects of several chemicals on the propagation of buds and also to elucidate the effect of plant hormones and culture methods on the regeneration by the tissue culture of the Japanese yam. The results obtained were as follows.

1. The number of buds which were formed on a multiple shoot increased on a MS medium supplemented with 5 mg/ℓ of benzyl-adenine (BA), 10mg/ℓ of ancymidole and 10mg/ℓ of silver nitrate more than that with 5 mg/ℓ of BA alone.
2. When 1 mg/ℓ of kinetin or 0.1mg/ℓ of zeatin was supplemented in MS medium containing of 5 mg/ℓ of BA, the number of buds on a multiple shoot increased more than that with 5mg/ℓ of BA alone.
3. MS medium including 0.02mg/ℓ of BA was suitable for a regenerating medium.
4. When multiple shoots were transferred to a new liquid medium at 10-day intervals, the frequency of regeneration was 80% and the regenerated plantlet indicated 2.8 cm in height.