

ワサビの茎頂培養による大量増殖法

山田 員人*・春木 和久*

Mass Propagation of Wasabi (*Wasabia Japonica* MATSUMURA) through Shoot Apex Culture

Kazuto YAMADA and Kazuhisa HARUKI

I. 諸 言

ワサビはアブラナ科に属する多年性の植物で、深山溪流に分布し、わが国のほかサハリンにも自生していることが知られている。最近では台湾などの外国でも営利栽培が行われ始めている。また、特有の風味を持つ香辛料として珍重されており、更に、食欲と血行を増進させるとともに、消化吸収も高める効果を有しているため、根強い需要がある。

わが国におけるワサビの栽培は、ほぼ全国に及んでいるが、島根県は古くからの産地で、特に、山間部の有力な特産物となっている。しかし、近年は度重なる水害による栽培環境の悪化に加え、墨入病等の病害虫の蔓延などに伴う品質低下や減収により、産地としての地位が急速に低下し、まさに危機的な状態となっていることが指摘されている。その解決策として、優良種苗の供給と、その栽培法の確立が強く求められている。

ワサビの繁殖は、実生では遺伝的純度が低いことによる形状の分離がみられることから、従来、株分けによる栄養繁殖が主体となっている。しかし、この方法では増殖率が極めて低いうえに、墨入病やウイルス病など種苗伝染性病害に侵されている割合の高いことも指摘されている。したがって、組織培養を利用したワサビの大量増殖技術の開発が重要、かつ、緊急の課題となってきた。しかし、この点についての研究^{1,2,4,5)}は少なく、なお体系的な技術の確立には至っていない。

そこで、本研究では、容易な無菌培養法と効率的な

シュートの形成と増殖法を検討し、実用的な大量増殖技術を確立するとともに、実用技術として普及⁶⁾することができたので、その概要を報告をする。

本研究を実施するに当たり、前場長北井三喜雄氏、場長山根国男博士には種々助言を賜った。本研究の一部は、農林水産省農林水産技術会議の地域バイオテクノロジー研究開発促進事業によったものであり、これらの各位、関係機関に深く感謝の意を表する。

II. 外植体の無菌培養

ワサビは根茎の茎頂を培養するに際し雑菌による汚染が著しく、無菌化の極めて困難な作物である^{1,5)}。そこで、茎頂培養を行う際の表面殺菌法と、外植体の選定法について検討した。

1. 実験材料及び方法

培養材料のワサビは‘島根3号’を対象とし、当場ハウスで前年又は前々年の11月中旬に播種、育成した株及び現地栽培の2年生株を用いた。

培養に当たっては、根茎では掘り取った株の茎頂とその近傍の葉柄組織を、また、花茎については腋芽とその着生部の上、下各1 cm程度の組織を摘出、調整して十分水洗後、ろ紙で吸水、軽く乾燥して、表面殺菌した。

表面殺菌は、次亜塩素酸ナトリウムの有効塩素1%液で10分間浸漬により行った。ただし、表面殺菌試験については、次亜塩素酸ナトリウムの有効塩素1, 2, 4%液、塩化第2水銀0.1%液及びダイメトン10%液の各10分間浸漬区、次亜塩素酸ナトリウム1%液5分

間浸漬+ダイメトン10%液5分間浸漬区, 塩化第2水銀0.1%液5分間浸漬+ダイメトン10%液5分間浸漬区を設けた。表面殺菌後はいずれも滅菌水で十分洗浄した。

外植体は表面殺菌した材料から、茎頂については根茎部の生長点と葉原基2~3枚を含む組織を、腋芽については花茎の腋芽とその着生部周辺の若干の花茎の組織とともに摘出したものである。なお、ハウス育成株については、茎頂は1年生株から、腋芽は2年生株から採取した。

花茎腋芽は、主として根茎から伸長した第1花茎から摘出して用いたが、花茎の培養部位の試験については、現地栽培株の第1花茎と、その腋芽から伸長した第2花茎を用いた。

培地は、MS培地の NH_4NO_3 、 KNO_3 の濃度を1/2に希釈したものに、しょ糖20~30g/l、寒天0.8%又はジェランガム0.2%添加して、pH5.8に調整したもの(以下、ワサビ用改変MS培地と略称)を基本とし、BA 0.1mg/lを添加したものである。

培養には径18mm、長さ120mmの試験管を用い、20°C、3000lx12時間日長で行った(特記しない限り、以下の試験同様)。

調査は、30日後に置床した外植体について、無菌的にシュートを形成した個体数、無菌化したもののほとんど枯死した個体数、及び雑菌に汚染された個体数を調べ、それぞれシュート形成率、枯死率及び雑菌汚染率としてその割合を算出した。

なお、供試数は、外植体の表面殺菌法については61~83個体の4回実験平均、外植体の部位及び栽培場所の試験については60個体、花茎の種類試験については第1花茎が176個体、第2花茎が148個体で、根茎茎頂は59個体であった。

2. 実験結果

1) 茎頂培養における外植体の表面殺菌法

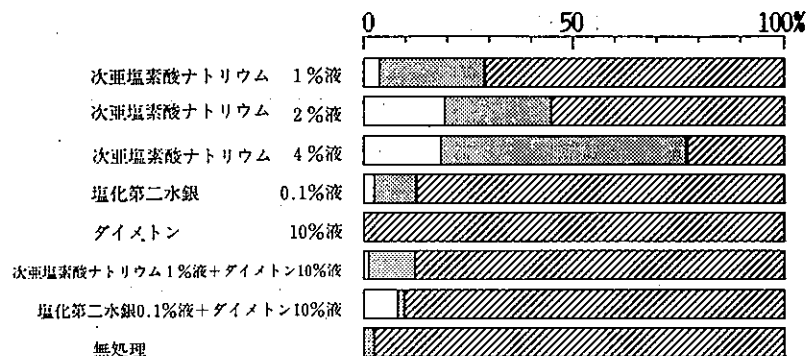
ハウス育苗の1年生株を用い、根茎茎頂を外植体として茎頂培養を行う際の表面殺菌法を検討し、その結果を第1図に示した。

これによると、次亜塩素酸ナトリウム4%液殺菌を除く各区では、外植体の過半が雑菌に汚染され、た、外植体の枯死率も、特に、次亜塩素酸ナトリウムの各区で高かった。シュート形成率は、次亜塩素酸ナトリウム4%液及び同2%液殺菌区が18~19%でありこれに次いでおり、次亜塩素酸ナトリウム1%液塩化第2水銀0.1%液、ダイメトン10%液での殺菌区は4~1%であった。しかし、比較的効果の高かった次亜塩素酸ナトリウム2%液と4%液でも、実験区による殺菌効果の変動幅が大きく、かつ、生育が阻害されるなどの薬害もみられ、特に、4%液でその害が顕著であった。

一方、雑菌による汚染率は各区とも顕著で、そのうちでは次亜塩素酸ナトリウムが比較的低率であった。

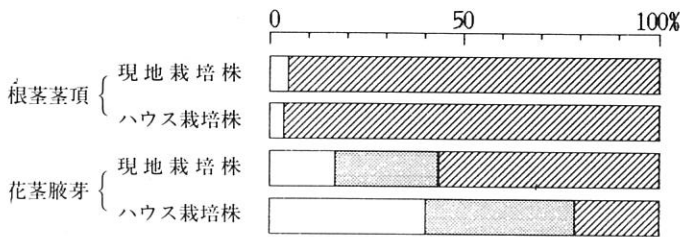
2) 外植体の種類がシュート形成に及ぼす影響

花茎腋芽を培養に用い、根茎茎頂と比較した場合無菌化によるシュート形成の難易について検討した。その結果は第2図に示すとおり、シュート形成率根茎茎頂では現地栽培株及びハウス栽培株とも4%後であった。これに対し、花茎腋芽を用いた場合はシュート形成率が明らかに高く、根茎茎頂と比較し現地栽培株で3.5倍の17%、ハウス栽培株では10倍の%となった。ハウス栽培株と現地栽培株とを比較した場合、根茎茎頂ではシュート形成率に差がみられなかったが、花茎腋芽ではハウス栽培株は現地栽培株の約

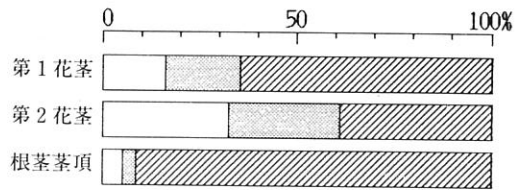


第1図 茎頂培養における外植体の表面殺菌とその効果

□ シュート形成率 ■ 枯死率 ▨ 雑菌汚染率



第2図 外植体の種類と表面殺菌



第3図 外植として花茎の種類と表面殺菌効果

倍のシュート形成率を示した。

一方、第1花茎と第2花茎の腋芽を対象に培養した場合の雑菌の混入率は第3図のとおりである。花茎は茎頂より雑菌の混入率が低く、花茎のうちでは第2花茎を用いた場合に明らかに雑菌の混入が少なく、シュートの形成率も高いことを認めた。

Ⅲ. シュート形成に及ぼす植物ホルモンの影響

植物ホルモンのうちでも、オーキシンとサイトカニンが不定芽や不定根の形成に重要な役割を果たしており、その作用濃度は培養作物により異なることが知られている。そこでワサビについて、シュート形成に関与する植物ホルモン組成及びその最適濃度を明らかにしようとした。

1. 実験材料及び方法

外植体は、塩化第2水銀0.1%液に2分間、次いで次亜塩素酸ナトリウム1%液に10分間浸漬して滅菌した‘島根3号’の種子を、ハイポネックス培地(1000倍液)に播種、育成した苗(約1か月)の茎頂とその近傍組織を用いた。各区10個体を供試した。

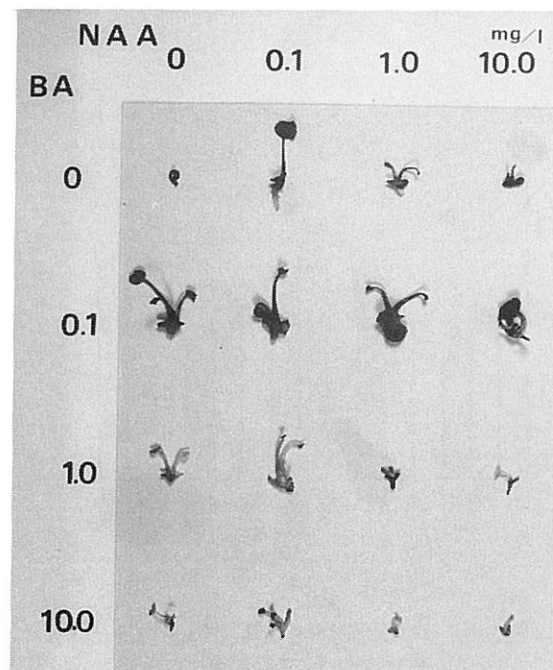
培地はワサビ用改変MS培地を使用し、BA, NAAを0, 0.1, 1.0, 10mg/lの濃度で組み合わせて添加し、ゼランガムで固化したものである。また、別に最適なBA濃度を知るため、BAを0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0mg/lを添加した培地を用い、検討した。

調査は、培養30, 50日後に置床した外植体からシュートを形成した個体数を調べ、シュート形成率を算出した。また、同時に葉柄数と草丈を調査した。なお、葉柄は2~3mm丈以上で、外観的にそれと判断できるものとした(以下の試験同様)。

2. 実験結果

BA, NAAの各濃度の組合せにより、これらがシュートの形成に及ぼす影響をみたのが第1表である。シュートは、置床30日後にはいずれの区とも形成され、特に、BA無添加とBAを0.1mg/l添加した区ではNAAの添加、無添加にかかわらず、形成率100%であった。また、50日後にはホルモン無添加区においてシュートが枯死したものの、他の区ではそのまま生育していた。しかし、BA 1.0mg/l, 10mg/l添加した区では枯死するか、それに近い状態であった。

シュートの丈はBA 0.1mg/l添加区では、NAA添加量に関係なく、10mm内外で平均的に優れており、BA 0, 1.0mg/l添加区では、劣る傾向にあった。また、BA 10mg/l添加区では明らかに劣った。一方、葉柄数はBA 0.1~1.0mg/lでNAA 0~1.0mg/l添加の範囲



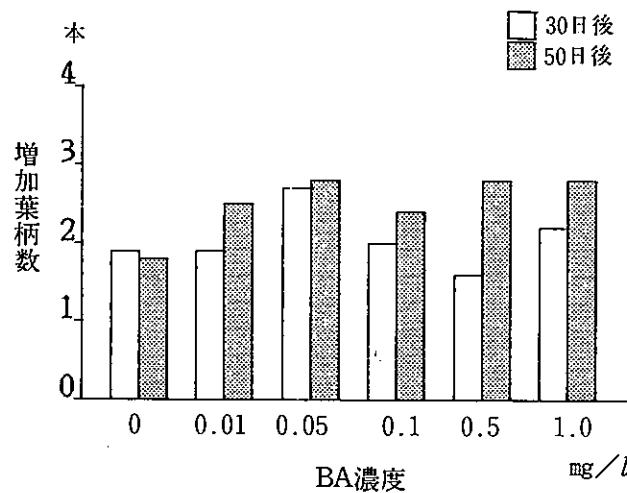
第4図 植物ホルモンとシュートの形成状況

第1表 茎頂からのシュート形成に及ぼす植物ホルモンの影響

植物ホルモン濃度		30 日 後			50 日 後		
BA mg/l	NAA mg/l	シュート 形成率%	葉柄数	草 丈 mm	シュート 形成率%	葉柄数	草 丈 mm
0	0	100	1.0	3.0	枯死	—	—
0	0.1	100	1.2	12.4	100	1.8	8.8
0	1.0	100	1.0	4.2	100	1.8	4.0
0	10.0	100	1.0	4.2	100	1.0	—
0.1	0	100	3.7	9.3	100	4.5	13.5
0.1	0.1	100	2.2	9.0	100	1.8	9.0
0.1	1.0	100	2.4	9.8	100	2.5	11.5
0.1	10.0	100	2.0	8.8	100	1.5	9.5
1.0	0	60	2.3	8.6	20	4.0	15.0
1.0	0.1	75	2.7	11.3	40	3.0	17.0
1.0	1.0	80	3.5	1.8	枯死	—	—
1.0	10.0	80	1.2	5.8	枯死	—	—
10.0	0	80	2.0	4.3	枯死	—	—
10.0	0.1	80	1.5	3.5	枯死	—	—
10.0	1.0	50	1.5	4.0	枯死	—	—
10.0	10.0	33	1.5	5.0	枯死	—	—

で多い傾向にあり、特に、BA0.1mg/l 添加区が多かった。

シュートの形成率、草丈、葉柄数に外観的な生育状況を加味すれば、BA0.1mg/l 添加区にNAA無添加区が優れる傾向にあり、次いでBA0.1mg/l にNAAの0.1mg/l 又は1.0mg/l を組み合わせて添加した区が良好であった(第4図)。したがって、NAAの添加の効果はほとんどみられず、BA0.1 mg/l 添加区がよ



第5図 BA濃度が根茎頂形成シュートの葉柄数に及ぼす影響

かった。

このように、シュートの形成にはBAの単独添加がよいことが明かとなったので、更に、BA濃度について詳細に検討した。その結果、BA各添加区ともシュートが90%以上形成され、草丈も各区10mm前後で、特に差がみられなかった。しかし、葉柄数は第5図に示すように、培養30日後になると区間差がみられ、0.05mg/l 添加区が多かった。50日後になるとBA添加区は、いずれも葉柄数が多くなり、0.01mg/l 以上の濃度では各区とも葉柄数にほとんど差がみられなくなった。

以上のことから、培養30日後の結果を中心に考えた場合、シュートの形成にはBAの0.05mg/l 添加がよいことが判明した。

IV. シュートの生育、増殖、発根に及ぼす要因

シュートの生育、増殖、発根の過程で個体に内在している遺伝的要因の他に、個体をとりまく環境や栄養、特に、植物ホルモンが大きく関与することは周知のとおりである。しかし、ワサビについては、なお、不明な点が多いので、その条件を検討した。

1. 実験材料及び方法

外植体は、花茎腋芽を培養して形成したシュートをBA0.1mg/l 添加したワサビ用改変MS培地で継代培養したもので、特記しない限り、2葉柄に分割²⁾して

用いた。ただし、分割シュートについて葉柄基部の腋芽の有無は、特に確認しなかった。

培地はワサビ用改変MS培地を使用し、特記しない限り、シュートの生育、増殖試験にはBA0.1mg/l を、発根試験にはNAA0.05mg/l、植物ホルモンの試験にはBAとNAAの各0.1mg/l を単独又は組み合わせて添加し、ゼランガムで固化したものである。また、液体培地については、BA0.1mg/l を添加したワサビ用改変MS培地に固化剤を加えないものとした。

培養は、温度試験については10、15、20、25、30℃区を、光条件については全暗、1000、3000、8000lx、発根試験では1000、5000lxの連続照明、及び3000lxの8時間日長、16時間日長、連続照明区を設けた。

調査は、特記しない限り、培養30日後に、分割、置床したシュートから新たに葉柄が発生した個体数を調べ、シュート形成率を算出した。また、シュート形成個体について、新しく増加した葉柄数を調べるとともに、場合によっては草丈を調査した。シュートの発根については、シュートの発根率と発根程度(少:発根なし、中:主根が発生、多:数本の主根と主根にわずかな側根発生)を調べた。また、NAAと発根との関係試験については、発根までの日数を調査した。

2. 実験結果

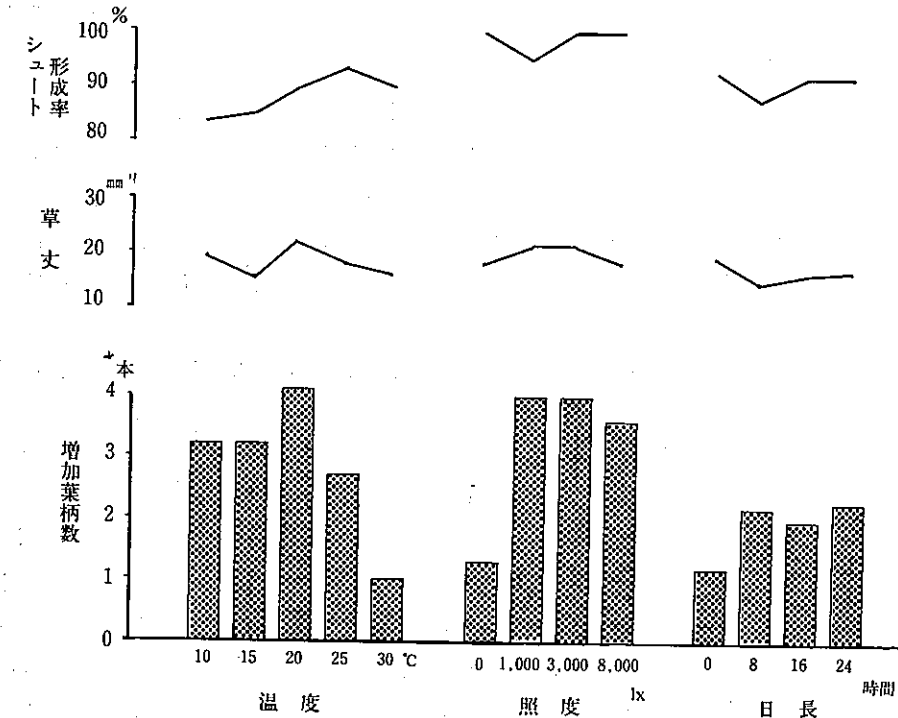
1) シュートの生育

シュートの生育に及ぼす温度、光及び植物ホルモンの影響について検討した。各区10個体を用い、2回実験の平均で示した。結果は第6図に示すとおりである。

まず、温度条件についてみると、分割したシュートの84~93%から葉柄が伸長し、形成率は20℃以上でやや高い傾向がみられた。分割後、新たに増加した葉柄数は、20℃が4.1本で最も多く、15.0℃が3.2本でこれに次いでいた。また、温度の高い25℃では2.7本と少なくなり、30℃ではわずか1本の葉柄増加にとどまった。草丈は20℃が最も高く、他の温度では低かった。以上から、20℃において生育が明らかに優れていた。

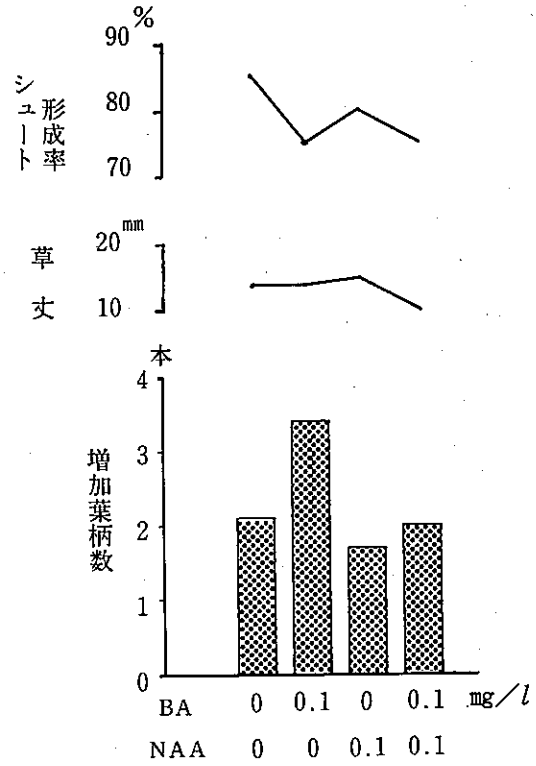
照度との関係を見ると、各区とも分割したほとんどのシュートから葉柄が伸長した。また、増加葉柄数は1000、3000、8000lx の間に差がなく、いずれも4枚程度であったが、全暗区では1.3本で明らかに少なかった。ただし、照度の高い区ではシュートの葉柄が太く、葉は濃緑色をしていた。また、日長についてみると、シュート形成率は各区とも93%前後であったが、増加葉柄数は全暗区において少なかったほかは、各日長とも2枚程度で区間差がみられなかった。

次に、植物ホルモンとの関係については、300ml 容コニカルビーカーを用いて培養し、増加葉柄数と草丈



第6図 温度、照度、日長がシュートの生育に及ぼす影響

に対する影響をみたのが第7図である。すなわち、シュート形成率は各区とも80%前後で、区間に大きな差はみられなかった。増加葉柄数はBAの単独添加区が3.4本で最も多く、他の区は2本前後であった。また、草丈



第7図 植物ホルモンがシュートの生育に及ぼす影響

はBA又はNAA添加区が高く、BAとNAAを組み合わせる添加区では低かった。以上のように、シュートの生育を促進させるには、BAの単独添加がよかった。

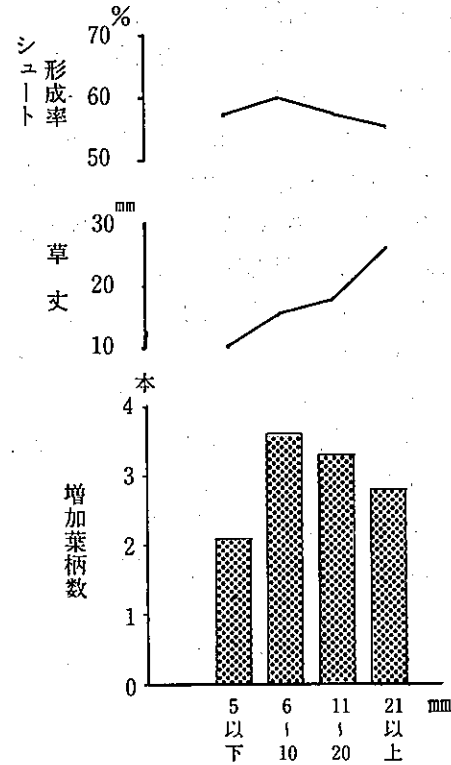
2) シュートの増殖

シュートの増殖は、再生した小植物体の主茎を徒断して分割するか、側枝の基部を切り離し、葉柄基部に存在する腋芽の生長点の生長を促すことにより可能である^{2,4)}。したがって、増殖率はシュートの分割できる数に影響されることになる。そこで、葉柄が1本又は2本になるように主茎又は側枝を縦断して分割し、その増殖効率について検討した。

1葉柄に分割した葉柄の丈とシュートの生育状況を第8図に示した。これによると、シュート形成率は60%前後で、各区にほとんど差がみられなかったが、その中では6~10mm丈の葉柄がやや高率であった。また、増加葉柄数は、6~10mm丈の葉柄では3.6本で最も多く、11~20mm丈がこれに次いで3.3本、5mm丈以下の葉柄では2.1本で最も少なかった。また、生育したシュートの

丈は、分割時の葉柄丈に比例し、大きいものほど長かったが、伸長率は6~10mm丈の葉柄で高率であった。全般をとおしてみた場合、6~10mm丈の葉柄での生育がやや旺盛であった。

次に、分割時の葉柄数とシュートの生育状況をみたのが第2表である。これによると、1及び2葉柄分割



第8図 分割時の草柄丈とシュートの増殖

とも、日数の経過とともにシュート形成率が高くなり、30日後には前者では75%、後者では93%であった。また、新たに伸長した葉柄数も増加し、特に、1葉柄分割より2葉柄分割で、その傾向が顕著であった。葉柄1本が展開に要する日数は、1葉柄分割で10日、2葉柄分割で7日であった。

一方、固形培地と液体培地(静置培養)を用いて比較した結果を第3表に示した。シュート形成率は、1葉柄分割では固形及び液体培地とも50~60%で、両者に差がほとんどみられなかったが、2葉柄分割では固形培地で明らかに高く87%であった。増加葉柄数は、液体培地に比べ固形培地では1葉柄分割で2.4倍の3.4本、2葉柄分割では2.2倍の4.8本であった。また、この場合の葉柄1本が展開するに要する日数は、1葉柄分割では8.8日、2葉柄分割では6.3日であった。このように、葉柄数の増加は明かに固形培地で勝ったが、シュートの丈は液体培地の方がはるかに大きくなった。

第2表 シュートの分割法と増殖

置床後の経過日数	1葉柄分割			2葉柄分割		
	葉柄増加シュート率 %	増加葉柄数	葉柄展開日数	葉柄増加シュート率 %	増加葉柄数	葉柄展開日数
10日	38.2	1.3	-	57.5	1.5	-
20	54.3	1.8	-	73.6	2.5	-
30	74.5	3.0	10.0	92.9	4.3	7.0

注) 増加葉柄数は分割後新たに伸長した葉柄(以下の表同様) 供試数: 20個体, 2回実験平均

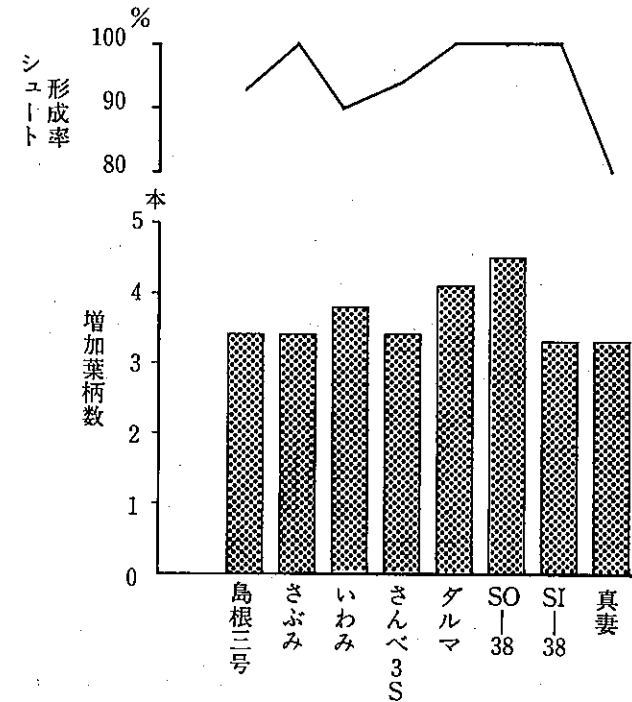
第3表 シュートの分割法と固形及び液体培地における増殖

培地の種類	1葉柄分割				2葉柄分割			
	葉柄増加シュート率 %	増加葉柄数	葉柄展開日数	草丈 mm	葉柄増加シュート率 %	増加葉柄数	葉柄展開日数	草丈 mm
固形	50.0	3.4	8.8	16.2	87.0	4.8	6.3	16.0
液体	57.1	1.4	21.4	20.1	63.2	2.2	13.6	25.1

注) 供試数: 25個体, 2回実験平均

固形培地による2葉柄分割を基本とすると、葉柄は約6~7日に1本の割合で増加することが明らかとなった。

次に、'島根3号'ほか5品種、3系統について検討した結果を第9図に示した。これによると、シュート形成率は'真妻'がやや低く80%、'いわみ'、'島根3号'、'さんべ3S'では90~94%で、他の品種、系統では100%の



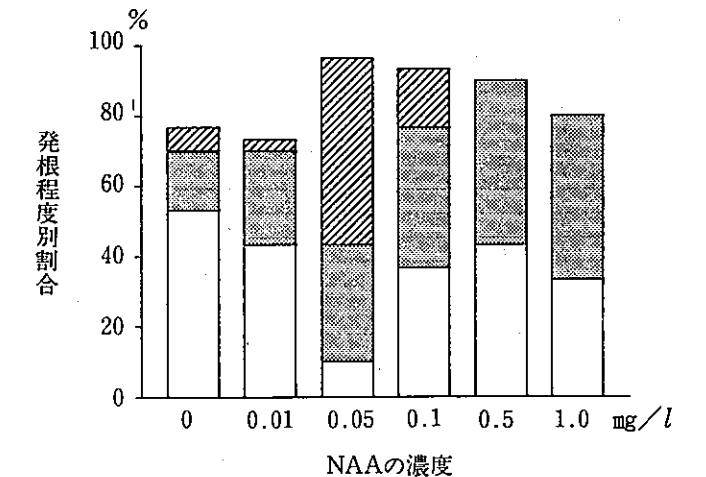
第9図 品種とシュートの生育

高率であった。増加葉柄数は'SO-38'、'ダルマ'でやや多く4本以上、他の品種、系統では3.5本前後であった。

このように品種、系統によりシュートの形成、生育に若干の差があるので、増殖率にも多少の違いが生じるものと判断された。

3) シュートの発根

ワサビシュートの発根に関して2, 3の要因について検討し、まず、培地に対するNAAの添加と発根との関係をみたのが第10図である。

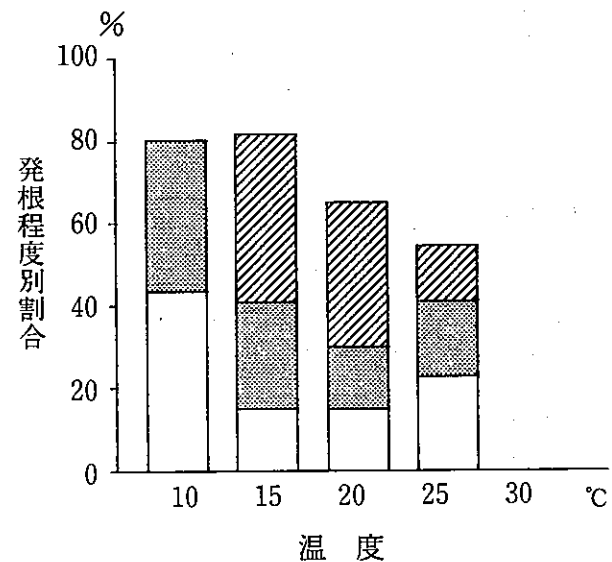


第10図 NAA濃度がシュートの発根に及ぼす影響

注) □多 ■中 ▨少 供試数: 10個体, 3回実験平均

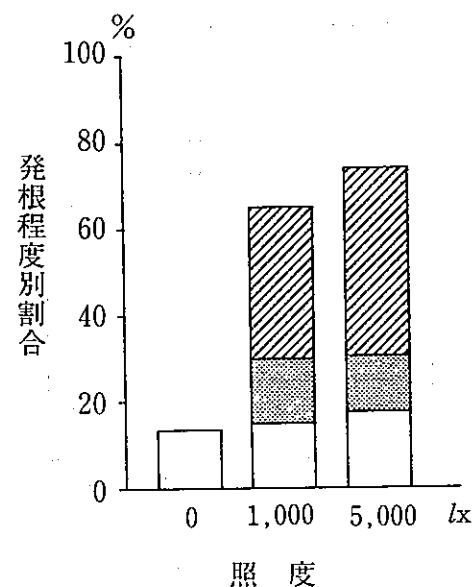
これによると、シュート発根率は0.05~0.5mg/l 添加の間で高く、発根程度は0.05mg/l 添加で高かった。また、発根までの日数も0.05mg/l 添加区において、10日程度と最も短かった。しかし、NAA無添加でも75%程度の高い発根シュート率を認めた。

温度との関係については第11図に示すとおり、シュ-



第11図 温度がシュートの発根に及ぼす影響

ト発根率は15, 10°Cで80%, 20, 25°Cで55%であり, 30°Cでは発根が認められなかった。また、発根程度は15と20°Cで高く、25と10°Cでは低かった。すなわち、発根率及び発根程度からすると、発根は15°Cが優れ、20°Cがこれに次いだ。



第12図 照度がシュートの発根に及ぼす影響

照度との関係については、第12図のとおりである。シュートの発根率は5000lxが勝り、1000lxではやや劣っていたが、その差は少なかった。また、発根程度には差がみられなかった。しかし、全暗では明かに劣った。

次に、培地の固化剤としての寒天と、ゼランガムを使用した場合の発根に及ぼす影響をみた結果は、判然とした差はなく、いずれもよく発根した(データ省略)。

V. 考 察

植物組織の培養に際し、表面殺菌は外植体を無菌化するための必須の操作であり、その効果は培養の可否を左右するものである。ところがワサビの茎頂培養においては、表面殺菌の効果が劣り、雑菌の混入が著しいことが指摘されている^{1, 5)}。

筆者らもワサビの茎頂を用い、表面殺菌剤の効果を検討し、次亜塩素酸ナトリウムの有効塩素2%液が有効であることを認めたものの、シュートの形成までに至った外植体は20%程度にすぎず、その効果はなお不安定であった。堀¹⁾も各種殺菌剤の中では、次亜塩素酸ナトリウムの有効塩素4%液が有効であったが、高温、多湿の季節には殺菌効果が著しく劣ったと述べている。

ワサビの茎頂は根茎に存在するため、地際部に位置し、かつ、茎頂が通常の植物のように未展開葉に幾重にも覆われていないことから、雑菌に常にさらされ易い状態にある。すなわち、雑菌による茎頂の汚染は、沢ワサビでは茎頂が常時水中にあるか、水に濡れる状態にあること、畑ワサビでは雨水等による土壌からの雑菌の跳ね上がりがあること、更に、ワサビの茎頂部を覆っているゼリー状の物質^{1, 5)}とともに、雑菌も生息していることなどに起因しているのは疑いのないところであろう。加えて茎頂部のゼリー状物質の存在は、表面殺菌の効果を減退させる一因になっていると考えられる。また、表面殺菌の効果は外植体の雑菌による汚染程度に影響され、変動するものと推測される。このことは、外植体を中性洗剤でよく洗浄した場合¹⁾や、根茎を伏せ込み、清浄栽培した場合⁵⁾に雑菌の汚染をある程度抑制することが出来ることから肯定される。つまり、培養に際し、新鮮な材料を用いる必要があることが示唆される。

このように、ワサビの茎頂に対する表面殺菌が極めて困難であることから、優良株内の限られた茎頂の培養によって、シュートを形成させることは至難の業で

あり、貴重な遺伝資源を失う危険性も高い。松本ら⁴⁾は花茎腋芽の培養では、雑菌による汚染が比較的少ないと述べている。筆者らも外植体として花茎腋芽を用いた場合に、根茎茎頂に比べ無菌化が明らかに容易で、特に、ハウス等で清浄栽培した株では、約半数からシュートの形成が可能であることを認めた。これは、第1花茎の腋芽と第1花茎から新たに伸長した第2花茎の腋芽では、後者を外植体に用いた場合にシュートの形成率が高いことも、このことを裏付けるものであろう。花茎は開花時あるいは採取時に摘除するものであり、親株はそのまま栽培、保存でき、更に、次年度にも花茎培養が可能であるので、遺伝資源を失う危険性も極めて少ないといえる。ただ、花茎腋芽では培養開始時期が、花茎の出現する春季に限られるのが欠点であろう。

松本ら⁴⁾は花茎培養は組織が大きいので、ウイルスフリー化が困難で、健全株を選抜する必要があると述べている。しかし、優良、かつ、無病の種苗を一般圃場から選抜することは容易でない。筆者らはウイルスフリー化は、培養後形成したシュートを対象に、茎頂培養することが可能であることを認めている(未発表)。したがって、生長点からシュートを形成するための外植体は、花茎腋芽を対象とし、かつ、雑菌による汚染の少ない清浄栽培株を用いるのが基本であると結論付けられる。

植物の生長、生理に植物ホルモンが深くかわり、その作用は植物の種類、生理条件等によって異なるものである。茎頂又は腋芽の培養によるシュートの形成及び生育に適する植物ホルモンの種類とその濃度について、堀¹⁾はBA 1ppm、松本ら⁴⁾はBA 10⁻⁶M、細木ら²⁾はBA 0.1ppm、大塚ら⁵⁾はIAA 2mg/l が適しているとしている。また、細木ら²⁾はBA 0.1ppmでは、茎頂部が異常に肥大する個体が多いと報じている。筆者ら⁶⁾は細木らの結果に近い、BA 0.1 mg/l から0.05mg/l が適量で、なかんずく0.05mg/l の添加がよいことを認めた。このように、シュートの形成、増殖に適する植物ホルモンの種類、濃度が研究者によって異なるのは、基本となる培地、品種、外植体の生理条件の違いによるものと考えられるが、BA 0.05mg/l 添加が適当であると思なしてよさそう。

ワサビの培養温度として、筆者らは20°Cにおいて生育が優れていることを認めており、細木ら²⁾も同一結果を得ている。一方、堀¹⁾、大塚⁵⁾は15°C、松本ら⁴⁾は16°Cが適すると報じている。これは、筆者らが10°C

から5°C間隔に5段階で培養温度を検討したのに対し、堀は15, 20, 25°C、大塚は25°Cと15°C、松本らは6, 26, 16°Cとの比較であり、設定温度の違いが培養適温の判断に差を生じたものである。したがって、なお、詳細な検討が残されているものの、20°Cかそれよりやや低いところに培養適温があるとみてよいと考えられる。

ワサビの培養に対し、照度、日長についての報告はないが、堀¹⁾は6000lx連続照明、細木ら^{2, 3)}は1000~2000lxの連続か15時間日長、松本ら⁴⁾は2000lx16時間日長の概して低照度で培養している。筆者らは、暗黒条件では生育が明らかに劣ったものの、照度1000から8000lxの範囲と8, 16時間日長及び連続照明では生育に特に差を認めなかった。これらのことからすると、通常の培養には1000lx, 8時間日長でよいと判断される。ただ照度の高い場合には、濃緑で葉柄の太い、いわゆる健苗となることを認めているので、順化直前のシュートに対しては、照度を高くする必要も生じると考えられる。

シュートの増殖は、シュートを分割することによって可能であり^{1, 2, 3, 4, 5, 6)}、増殖率は分割できた株数によって決定される。すなわち、シュートの生育は葉柄基部に存在する腋芽の伸長によるものであり、葉柄数の多少が増殖率の指標になるものと判断される。このことは、葉柄単位に分割できることを示唆しており、事実、分割葉柄はその丈に関係なく、シュートに生育するものの、シュート形成可能な葉柄は60~75%程度であった。しかし、2葉柄を1株として分割した場合には、シュートへの再生率は90%以上に向上することを認めた。これは、分割の際の腋芽切除の有無に起因するものと考えられ、細木ら²⁾の分割個体は生長点を含む必要があるとの指摘に合致するものである。したがって、分割は2葉柄か、それ以上の単位で行うのが安定した増殖法として結論付けられる。

分割による増殖率について堀¹⁾は3~4週間で倍加し、年間2¹²~2¹⁶本、細木ら^{2, 3)}は35日ごとに3倍となり、年間6000本、2年半で1億本、松本ら⁴⁾は約3倍に増え、年間4000本、大塚⁵⁾は2カ月で約5倍となり、年間約3000本に増殖できると述べている。筆者らは2葉柄分割を基本とした場合には、6~7日に1本の割合で葉柄が展開するので、36~42日ごとに3倍の割合で増加することを認めた。つまり、年間8~10回の分割増殖が可能であり、1回の平均分割数が3倍となるため、理論的には3⁸=6,561本ないし3¹⁰=59,049本のシュートが1茎頂から得られることになる。

このように、35日前後で2.5~3倍に増殖できるのは、各研究者のほぼ一致した見解である。しかし、年間の増殖率についてはかなり幅がみられており、分割間隔や、初回の培養期間等による増殖数算出基礎の違いに基づく結果と考えられる。いずれにしても、親株から少なくとも数本から数十本の腋芽を培養できることから、理論的には年間10万本以上の増殖が可能であると考えられる。

一方、シュートの発根について、細木ら²⁾はIBAの0.2mg/lの添加で、堀¹⁾はIBAよりNAAがよく、その1ppmの添加で発根すると述べているが、発根は困難であるとの報告⁵⁾もあり、なお一致した見解は得られていない。筆者らは、堀¹⁾よりさらに希薄なNAA 0.05mg/lの添加で発根率及び発根程度とも高く、10日後には発根することを認めており、かつ、5~20℃、1000lxの条件でよいことも明らかにし得た。

発根したシュートは、パーミキュライトを用土として仮植し、多湿下に置くことにより、容易に活着、順化できることを経験しているが、この点については別の機会に報告したいと考えている。

これまでに述べてきた一連の試験から、ワサビの大量増殖技術を体系化すると第13図のように要約できよう。

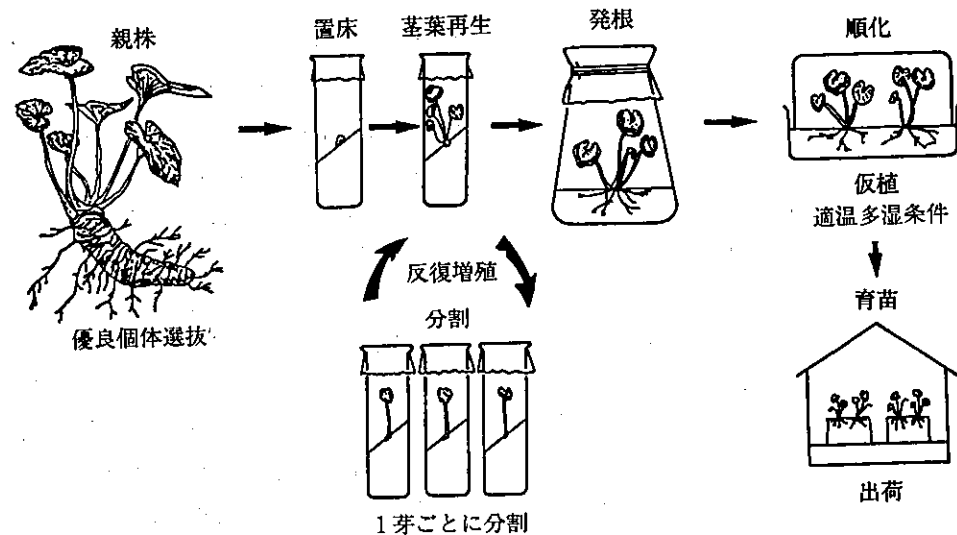
すなわち、選抜したワサビの優良親株から伸長した花茎腋芽を外植体として、次亜塩素酸ナトリウムの有効塩素2%液に10分間浸漬して表面殺菌後、腋芽とその近傍組織を摘出して培地に置床する。培養はBAを

0.05mg/l 添加したワサビ用改変MS培地を用い、20℃、1000lx、8時間日長の条件下で行う。形成したシュートは2葉柄ずつに36~42日間隔で分割、増殖し、必要量若しくは作業上の都合を配慮して、一定量のシュートが得られたときに発根処理する。発根はNAA 0.05mg/lを添加した培地で20℃、1000lxで培養することによって20~30日後には順化することが可能となる。この方法により、無病苗を短期間に計画的に大量生産することが可能となった。

VI. 摘 要

本報告はワサビについて茎頂培養のための、外植体の無菌培養、シュートの形成、増殖及び発根の条件を明らかにし、大量増殖技術を開発したものである。

1. 外植体の表面殺菌は次亜塩素酸ナトリウムの有効塩素2%液が有効であった。
2. 外植体の無菌培養はハウスなどで清浄栽培した株の花茎腋芽がよかった。
3. 培地に添加する植物ホルモンとその濃度は、シュートの形成にはBA 0.05mg/l、発根にはNAAの0.05mg/lがよかった。
4. ワサビの培養温度は20℃か、それよりやや低いところ、照度は1000lxの8時間日長でよかった。
5. 増殖は、シュートを分割することにより可能で、2葉柄分割を基準とすると、理論的には1個の腋芽から年間6,500~59,000本に増殖できる。



第13図 ワサビの大量増殖体系

引用文献

- 1) 堀 秀隆(1986)：ワサビ苗の試験管内大量増殖法。植物バイオテクノロジー 現代化学 増刊5；118~123.
- 2) 細木高志・角田和美・浜田守彦・瀬尾光弘(1986)：ワサビの組織培養による増殖。農および園61：995~996.
- 3) 細木高志・白石一剛・岩井元康・稲葉久仁雄(1988)：ワサビの組織培養苗の増殖。農および園63:653~654.
- 4) 松本理・山本雄慈(1987)：ワサビの花茎及び根茎組織の培養による試験管内大量増殖。近畿中国農研73：22~27.
- 5) 大塚寿夫(1988)：わさびの増殖法。農および園63：185~189.
- 6) 山田眞人(1988)：ワサビにおけるバイオテクノロジーの実用化と問題点。島根県山葵協会報26：2~6

Summary

The present studies were carried out in order to establish the mass propagation technique by shoot apex culture of Wasabi (*Wasabia japonica* MATSUMURA).

1. The sterilization of explant surface by sodium hypochlorite solution contained 2% available chlorine seemed to be effective.
2. The axillary bud of scape was better than shoot apex of rootstalk for shoot apex culture. In that case, the explant taken out sanitary culture hill was better than open culture hill.
3. Growth regulators favorable for the culture were supplemented in Murashige and Skoog(MS) basal medium reduced one-second concentration of ammonium nitrate and potassium nitrate to 0.05mg/l BA for shoot formation and proliferation, 0.05mg/l NAA for rooting.
4. The favorable temperature for the culture was approximately 20℃ or a little low. And favorable light condition was 8hr/day photoperiod by 1000lx of fluorescent light.
5. Thus, from scores thousands to tens thousands of plants could be obtained in a year from a single shoot apex.