

## ヤマノイモのウイルス・フリー株の育成と栄養繁殖

松原幸子・石原正利<sup>a)</sup>

(蔬菜園芸学研究室)

Received July 1, 1988

### Production and Vegetative Propagation of Virus Free Plants in *Dioscorea* sp.

Sachiko MATSUBARA and Masatoshi ISHIHARA

(Laboratory of Olericulture)

Production of the virus free lines by the shoot apex culture and the vegetative propagation of the line obtained in some cultivars of the Chinese yam (*Dioscorea* sp.) were studied. The basal medium by Murashige and Skoog (1962) containing various concentrations of NAA and BA was used. As regards the method for *in vivo* vegetative propagation, two lines Nagaimo and Tsukuneimo, were used. In the former, aerial bulbil production when planted in various different depths, and with latter, four different kinds of treatments were studied. Results obtained were as follows ;

- 1) Shoot apices cultured on MS medium containing 0.01 mg/l both of NAA and BA showed shoot and root growth. Callus formation was good on the medium containing 0.1 mg/l both of NAA and BA, with shoot and root formation found when transferred to the basal medium. 6.3 plants in the average per one original shoot apex were obtained after subculturing it four times on the basal medium.
- 2) The best results were obtained when explants were cultured on the basal medium containing 0.1 mg/l NAA and 0.01 mg/l BA. For the stem explants, 2.4% of them formed adventitious buds, and 9.6% regenerated root. The same percentage was obtained adventitious bud formation in the calluses from the leaf explants, while slightly lower percentage of 9.0 was obtained for the root.
- 3) Number of bulbils produced in Nagaimo varied with the depth of soil used for the cultivation. 654, 458 and 821 bulbils per plant were obtained from 10, 30 and 50 cm of the depths of soil, respectively. Plants cultivated in 10 cm soil depth started to bear bulbils relatively earlier season. Those planted in 50 cm soil produced the slightly later than others.
- 4) In Tsukuneimo, percentages of vines that showed bulbil formation and number of bulbils per a vine were studied in relation to the treatment. Kinds of the treatment made were ; (a) A control, without treatment, (b) Pinching of shoot tips and florets, (c) Deforiation, and (d) Dark treatment of lateral buds with aluminium foil. Percent of vines that formed bulbils and number of bulbils per vine were (a) 50% and 39, (b) 74% and 71, (c) 100% and 40, and (d) 73% and 39. The highest number of bulbils obtained was in treatment by (c), and for the total fresh weight was in the treatment by (d).

### 緒 言

ヤマノイモ *Dioscorea* sp. は熱帯, 温帯に多くの栽培種があるが, 日本で栽培されている品種群としてナガイモ, イチョウイモ, ヤマトイモ (以上 *D. opposita* Thunb.) とダイシヨ (*D. Alata* L.) などがあり, それぞれにいくつかの品種がある. その他ジネンジヨ (*D. japonica*

a) 現在, 兵庫県豊岡農業改良普及所

Thunb.) は日本各地に自生しているが栽培化はみられない。これらは雌雄異株であるが栄養繁殖を続けているため、雌か雄の単性になっていることが多く種子は用いられない。栄養繁殖のためには、いも又はむかごを用いる。いもは担根体といい、根と茎の中間的な性質を有し分割して用いる。むかごはつるの葉えきに対生し、品種によって着生するものとししないものがある。しかしいもを繁殖用に用いるには収量の10%以上を用いなければならず、むかごは種いもとするために3年養成しなければならない。さらにヤマノイモは栽培の歴史も古く、地域特産の性格が強く、今後の水田利用再編対策による転作物としても有望であるにもかかわらず、近年単位面積あたりの生産量の低下、あるいは品質の低下による生産不安定が現場で大きな問題となっている<sup>3)</sup>。この生産力低下の一因としてウイルス罹病による生育不良が考えられる。ヤマノイモのウイルス様症状の発生は古くから知られているが、それによって生産皆無になる程ではない。又重要作物でもないため研究がおくれ、ウイルスの種類・媒介昆虫も明らかにされていない。しかしウイルス罹病の可能性は非常に高い。もし培養株で生産力が回復すればウイルスフリーになった可能性が高く、実際面でも利用価値がある。

本実験はウイルスフリー株育成を目的として莖頂培養を、さらに増殖を目的として器官培養およびむかご形成について能率の高い方法を開発する目的で試みたものである。

### 材料及び方法

先ず培養実験に共通の材料・方法について述べる。供試材料として兵庫県三田市で栽培されているツクネイモ“タカシロ”を1979年4月24日岡山大学農学部圃場に植付けた。苗条が伸長してきた後、必要に応じて莖頂、茎、葉を切りとって培養に用いた。培養のための基本培地はMURASHIGE & SKOOG (1962)<sup>4)</sup>の無機塩類に、thiamine-HCl 0.1 mg/l, pyridoxine-HCl 0.1 mg/l, nicotinic acid 0.5 mg/l, myo-inositol 100 mg/l, glycine 2.0 mg/l の有機成分と、30 g/l のしょ糖、0.8 g/l の bacto agar を添加したものとした。実験ごとに種々の濃度の  $\alpha$ -naphthalene acetic acid (NAA) と N<sup>6</sup>-benzyladenine (BA) を添加した。2 cm 径、20 cm 長の試験管に 20 ml ずつの培地を入れ、1 外植体ずつ植付けた。培養は 25°C、1,500 lux の人工光下で16時間日長とした。次に実験ごとの材料及び方法について述べる。

#### 莖頂培養

えき芽の莖頂を供試した。殺菌して小さな莖頂を摘出すると褐変しやすく生存率が低い。そこで無菌植物の莖頂を供試したが、先ず無菌植物を得るため、数葉原基をつけた莖頂を70%エタノールで2分、その後10倍のアンチホルミン(有効塩素1%)で5分間表面殺菌をした後、1~2葉原基をふくむ約1 mmの莖頂を摘出し植付けた。この時の培地は基本培地に0.01 mg/lのNAAとBAを添加したものとした。育成した小植物体から0.2~0.3 mmの莖頂を切りとり、再度新しい培地に植付けた。植付けは3回おこない、7月4日植付けの培地はNAAとBAを各0, 0.1, 1.0 mg/l 組合せた9種とした。7月11日植付けた培地は、両ホルモンを各0.01, 0.1, 1.0 mg/l 組合せた9種と対照区としてホルモン無添加の10種とした。8月11日植付け区は、両ホルモンを各0, 0.01, 0.1 mg/l 組合せて添加した9種とした。7月4日、11日は各培地10莖頂、8月11日は5莖頂を供試した。植付け2月後に、できたカルス又は伸長した苗条を基本培地に2月ごとに移植し、100日後の苗条伸長と発根状態を観察した。

できた小植物体を2月ごとに株分けし、基本培地に移植をくり返し、増殖した苗条数、葉数、発根状態を調査した。

器官培養による増殖

継代培養を続けている無菌の小植物体から、2 mm の茎切片、葉脈をもつ葉片 2 × 2 mm を切りとり試験管に 5 切片ずつ植付けた。培地は NAA-BA を 0.01-0.1 mg/l, 0.1-0.01 mg/l, 0.1-1.0 mg/l, 1.0-0.1 mg/l を組合せて添加した 4 種類とし、各区 50 切片を供試した。

むかご着生

増殖を目的としてむかごを能率よく生産する実験をした。供試材料として市販のナガイモとツクネイモを用いた。

ナガイモは地下部貯蔵器官の肥大阻害とむかごの着生の相関をみた。ビニールの肥料袋に 10, 30, 50 cm になる様に畑土を入れ、ナガイモを 10 cm の輪切りにして各区 2 個ずつ 1979 年 5 月 12 日植付けた。施肥量、灌水量は同じとした。8 月 21 日から 5 回にわたり最終日を 10 月 16 日としてむかごの着生数、生体重を調査した。

ツクネイモは、1979 年 4 月 24 日に圃場に定植し、6 月 22 日に 2 m の支柱を立てた。7 月 25 日、30 日、8 月 10 日の 3 回にわたって下垂する先端の摘心、および摘花をおこない、さらに摘葉区、葉えき部をアルミホイルでつつむ遮光処理をおこなった。9 月 26 日、むかごの着生数や重量を測定した。

結 果

茎頂培養

植付時期別の苗条伸長、不定根形成率をみた結果を Fig. 1. ~ 3. に示す。いずれの培地でも初代培養ではほとんどの外植体がカルスを形成し、2 月後にホルモン無添加培地に移植した後苗条伸長、不定芽、不定根の分化がみられた。初代培養時に茎頂がそのまま伸長したのは、ホルモン濃度が 0.01 mg/l 区のみであった。最も高い植物体形成率を示したのは、両ホルモンを 0.01 mg/l 添加した区で 60% であり、次いで両ホルモンが 0.1 mg/l の時 40% の苗条伸長と 60% の発根率がみられた。いずれの植付時期でも他の培地では 30% 以下の苗条伸長率であったが、発根はそれよりよかった。両ホルモン無添加区では、カルス形成も器官分化もみられず枯死した。無菌植物体の材料とするため 1 mm 以上の茎頂を植付けたものは、ほとんど 100% 近くの茎頂が伸長したにもかかわらず、0.2-0.3 mm の茎頂を供試すると苗条伸長率が低下し、又一次カルスを形成した後器官分化を始め、植物体となった率は低下した。

次にできた小植物体を 2 月ごとに株分けし、増殖率をみたのが第 1 表である。植付時期に

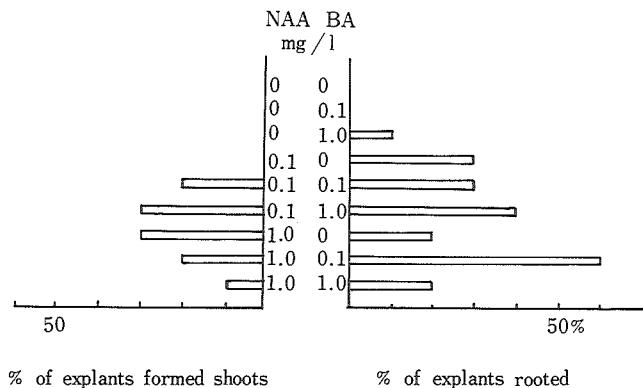


Fig. 1. Effect of NAA and BA on formation of shoots and roots by shoot apex culture of *Dioscorea opposita* Thunb. 'Tsukuneimo' (1979. 7. 4).

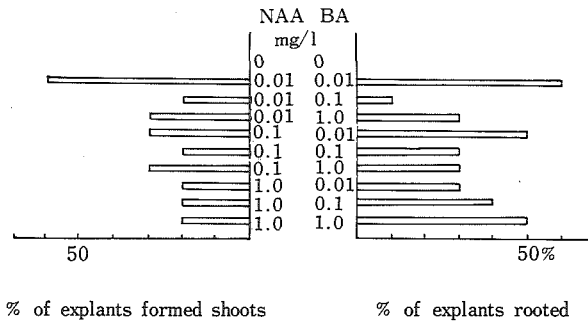


Fig. 2. Effect of NAA and BA on formation of shoots and roots by shoot apex culture (1979. 7. 11).

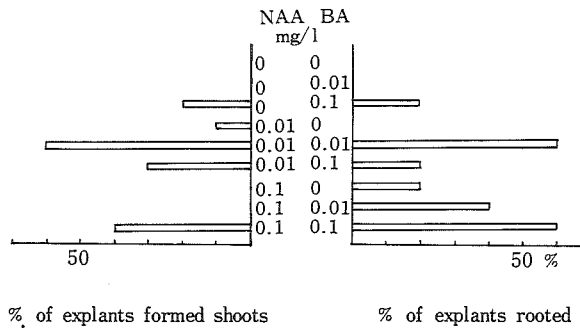


Fig. 3. Effect of NAA and BA on formation of shoots and roots by shoot apex culture (1979. 8. 11).

Table 1. Rate of proliferation of shoots by subculture (Tsukuneimo)

Date of planting		subculture		
		2	3	4
July	4	1.00	1.87	3.12
	11	1.70	4.51	6.31
August	11	1.17	1.67	

Table 2. Average number of leaves per plant at beginning of each subculture (Tsukuneimo)

Date of planting		subculture			
		1	2	3	4
July	4	1.0	1.2	1.7	2.3
	11	1.3	1.2	2.0	2.7
August	11	0	1.4	3.4	

より差があるが最も増殖率が高かった7月11日植付区をみると、第2, 3, 4回移植後にそれぞれ1.7倍, 4.5倍, 6.3倍と増加しつつあるが、増殖率としては高いものではない。この時の植物体の状態を葉数と根数でみた。移植直後の平均葉数は第2表に示した。移植の際増殖率の低い植物は切り戻しをしたので、平均葉数が必ずしも前回より増加しているとは限らないが、継代を重ねるごとに葉数が増加してゆく傾向がみられる。しかしいずれも3.4葉以下である。一方根数は第3表に示した様に増加してゆき、切り戻しの時も地下部はそのままで根付き苗条、つまり植物体を分けて増殖してゆくのが分る。7月11日植付区で第1回が1.4本であるのに第4回目では3.8本となり、かなり生育した植物体となっていた。

### 器官培養による増殖

葉切片を植付けた結果を第4表に示す。不定芽ができなかったのは葉切片を NAA 0.1 mg/l BA 1.0 mg/l 添加培地に植付けた時のみで、他は1～3%の範囲で不定芽の伸長した外植体となった。又発根はいずれの培地上でもみられ、NAA 0.1 mg/l BA 0.01 mg/l 添加培地上では葉切片の9.6%、茎切片の9.0%が発根した。この培地では不定芽形成も2.4%と高かった。カルスはいずれの外植体でもみられ、NAA 1 mg/l BA 0.1 mg/l 添加培地で最も重かった。

### むかご着生

ナガイモのむかご着生について耕土差による結果をみたのが Figs. 4. 5. である。7月中旬から着生がみられ始め、9月26日までの観察では10, 50, 30 cm 区の順にむかごの数、総生体重ですぐれていたが、10月16日の調査では50 cm 区で最も収量が多かった。いも1個あたりの重量が重い程早く種いもになるので望ましいが、10, 30, 50 cm 区のそれぞれの大きさのむかごの数は、0.4 g 以上 52, 48, 74, 0.2～0.4 g は 97, 55, 97 であった。最も小さい0.2 g 前後のむかごは 505, 355, 650 と最も差が大きかった。むかごの総数からみると50 cm 区 821, 10 cm 区 654, 30 cm 区 458 となり、30 cm 区と比較して50 cm 区はほぼ2倍、10 cm 区は約1.5倍であった。一方11月13日に測定した地下部のナガイモ重量は30 cm 区が最も重く 580 g, 10, 50 cm 区はほぼ同じの 512, 510 g で、むかごの収量とは逆であった。つるの全重は30 cm 区が一番軽く 175 g, 10, 50 cm 区は各 240, 215 g であった。

次につるに種々の処理をおこなったツクネイモの9月26日の調査結果を Table 5. に示した。摘葉処理区では処理づるのすべてにむかごが着生し、1つるあたり40と最も多かったが、むかごそのものは小さく平均49mgであった。処理をしない対照区は、50%のつるにむかごが着生し、つるあたりの数も少なく11で、1個あたり55mgと小さかった。摘心、摘花処理

Table 3. Average number of roots per plant at beginning of each subculture (Tsukuneimo)

Date of planting	subculture			
	1	2	3	4
July 4	1.5	2.5	2.7	2.8
11	1.4	2.1	3.2	3.8
August 11	2.5	2.7	3.4	

Table 4. Effects of NAA and BA on shoot and root formation by stem and leaf explants culture (Tsukuneimo)

NAA BA (mg/l)		% of explants formed		Fresh weight of explant (mg)	Browning of medium*
		shoot	root		
Stem explant					
0.01	0.10	1.2	2.4	3.7	++ ~ +++
0.10	0.01	2.4	9.6	7.4	+ ~ +++
0.10	1.00	1.0	1.0	10.4	++ ~ +++
1.00	0.10	2.0	7.4	15.1	0 ~ +++
Leaf explant					
0.01	0.10	3.0	6.0	8.1	+ ~ +++
0.10	0.01	2.4	9.0	10.1	+ ~ +++
0.10	1.00	0	2.4	11.0	+ ~ +++
1.00	0.10	2.4	4.8	16.3	+ ~ +++

\* Browning was induced with phenolic substances exuded from explants, 0; No phenolic substances, +; Small quantity of phenolic substances, +++; Large quantity of phenolic substances.

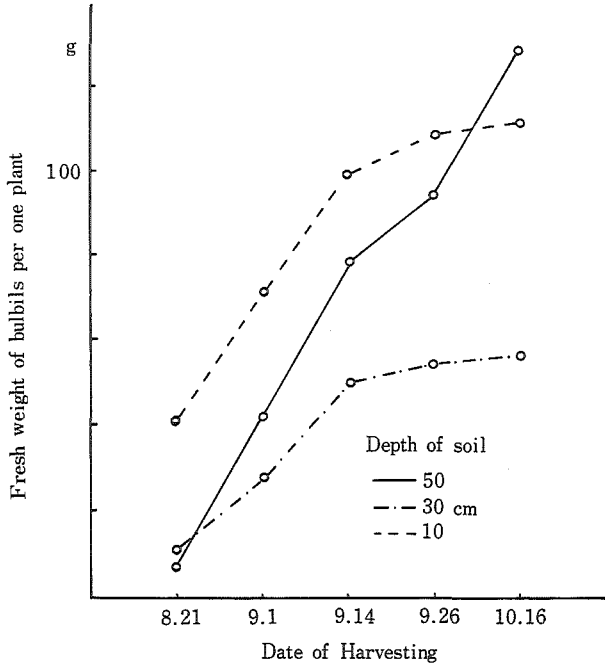


Fig. 4. Effect of depth of cultivated soil on aerial bulbil formation of *D. opposita* Thunb. 'Nagaimo'.

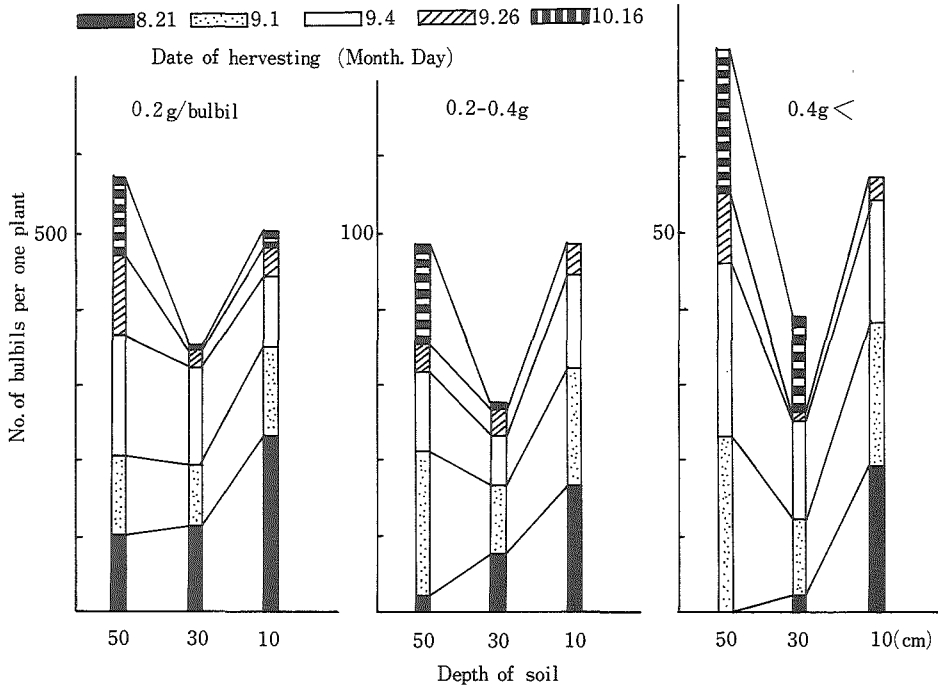


Fig. 5. Effect of depth of cultivated soil on aerial bulbil formation of *D. opposita* Thunb. 'Nagaimo'.

Table 5. Aerial bulbils formed on vines treated with four methods (Tsukuneimo)

Treatment	No. of vines treated	No. of vines formed bulbils	% of vines formed bulbils	No. of bulbils per vine	Average fresh weight of bulbil (mg)	Fresh weight of bulbils per plant (mg)
Pinching of growing tips and florets	27	20	74	71	36.8	2229.5
Dark treatment with aluminium foil on lateral buds	22	16	73	39	95.0	4104.7
Defoliation	7	7	100	40	49.0	1960.0
Control	10	5	50	11	55.0	402.5

区では74%のつるにむかごが着生し、つるあたりでは最も多く71個であるが平均36.8mgと最も小さいむかごであった。しかし200mg以上のむかごもつるあたり12個あった。葉えき部に銀紙で遮光処理をすると73%のつるにむかごが付き、つるあたり39個で各平均95mg、さらに200mg以上のむかご7と最も大きくなった。以上むかごの収量を処理つるあたりの生体重でみると、銀紙による遮光処理が最も重く4,104.7mg、次いで摘心・摘花処理の2,229.5mg、摘葉区1,960mg、対照区402.5mgといずれも対照区の5~10倍であった。

## 考 察

ヤマノイモには多くの栽培種があるが、本実験で供試したのは、*D. opposita* に属するツクネイモとナガイモである。ヤマノイモは一般に栄養繁殖性であるため、ウイルスフリー株の利用により収量、品質を向上させ得ると思われるが、まだウイルス検定植物が不明なためウイルスフリーになったかどうかの決め手がない。しかし大沢らの結果により、多くの植物で0.2~0.3mmの莖頂を植付ける事により、ウイルスフリーのヤマノイモの育成は可能と思われる。ただ本実験の結果より、ツクネイモの莖頂培養では、植付けてから苗条伸長まで約3か月<sup>1)</sup>と非常に時間がかかること、さらにほとんどの培地で一度カルスを形成してからホルモン無添加培地に移植する事により始めて苗条や根分化がみられる、の特徴があった。又得られた植物の生育速度や収量、品質の検定はおこなわれなかったので今後の課題であろう。

一度ウイルスフリーにした株は能率よく増殖しなければならない。ヤマノイモの増殖には普通種いも又はむかごを用いる。種いもは非常に増殖能率が悪く、1個から得られる次代個体数は少い。一方むかごも品種により形成されない事もある<sup>2)</sup>。又 *in vivo* での増殖をウイルスフリー条件下で行うのは非常に困難を伴う。そのため培養による増殖が望ましい。フキの例<sup>3)</sup> にならって、莖や葉脈をもつ葉切片を外植体として培養したところ、わずか数%にすぎないが不定芽の形成がみられた。しかし植物体からとれる外植体の数は莖、葉片をあわせるとなりの数になると思われるので、一つの技術と考えてよいであろう。ただ、この実験は1979年におこなわれたものであり、近年開発された苗条原基法<sup>4)</sup> を応用し、信森ら<sup>5)</sup> はツクネイモを用いて非常に興味深い方法を開発している。MS培地にアンシミドール10mg/l添加寒天培地に無菌の小植物体の頂芽および節を植付け、75日後塊状組織を得た。これを5mm角に切って同じ組成の液体培地で振とう培養すれば増殖を続けるし、一方アンシミドール無添加培地で35日間培養すれば苗化する。一種の多芽体培養法である。一方山下ら<sup>7)</sup> は、ヤマ

ノイモ属の野生種を用いて、種子の完熟胚よりカルスを形成した。このカルスを振とう培養し、遊離細胞塊よりヒメドコロやジネンジョの小植物体を得ている。この様に現在では新しい技術を導入して増殖率の悪いヤマノイモの繁殖にとり組んでいる研究者も多く、近い将来にはプロトプラストからの不定胚形成も可能となろう。

従来行われている *in vivo* の栄養繁殖法として、むかご利用がある。熊沢ら<sup>2)</sup>によれば、むかごは品種によって着生するものとしめないものがあるが、葉えきを遮光し、又はつるを下垂するといずれの品種にも、どの節位にも着生すると述べている。本実験でもツクネイモのつる処理では、いずれの処理でもムカゴが形成され、特に遮光処理で最大生体重量が収穫でき、又摘葉で最大数のむかごを生産できた。これは数が少なくても重いむかごを得てできる丈早く種イモとするか、又は数を沢山つくって一斉に肥大させるか、によって前者か後者かの方法を選べば、有用な繁殖手段となりうるだろう。次にナガイモのむかごでは、耕土の深さにより収量が違った。浅い土地に植付けるといもが横方向に肥大し、むかごの形成に関しては早生性で反応し、早期に早く着生した。一方耕土が深いといもは縦に肥大し、ムカゴの着生は晩生性にゆっくりとかつ最も多く着生した。30 cm の中間の深さでは、いもの肥大には最適であったとみえよく肥大したが、むかごは逆に着生が不良であった。この様にいもの肥大生長量とむかごの着生量には相反する関係がみられた。

## 要 約

ヤマノイモのウイルスフリー株を育成し、さらに能率よく増殖するため、茎頂、茎切片、葉切片培養を試みた。基本培地は MS (1962) にしよ糖 3%、寒天 0.8% とさらに種々の濃度の NAA と BA を添加した。ナガイモ、ツクネイモのむかごによる増殖も試み、以下の結果を得た。

- (1) ヤマノイモの茎頂 0.2–0.3 mm を 0.01 mg/l NAA と BA 添加基本培地に植付けると小植物体を再生できた。又 0.1 mg/l の両ホルモン添加培地上で 2 月間培養するとカルスが形成され、基本培地に移植することにより小植物体が再生した。株分けによる増殖率は 8 か月間で 6.3 倍であった。
- (2) 無菌植物の茎、葉切片を NAA 0.1 mg/l, BA 0.01 mg/l 添加培地に植付けることにより、いずれの器官からも 2.4% の不定芽形成、9% の発根がみられた。
- (3) ナガイモの根を 10 cm に切断し、10, 30, 50 cm の深さの畑土に植付け、むかご形成をみたところ、50, 10, 30 cm 区の順に 821 球、654 球、458 球のむかご着生がみられた。
- (4) ツクネイモのつるに 4 処理、(a) 対照、(b) 下垂づるの摘心および摘花、(c) 摘葉、(d) 葉えき部のアルミホイルによる遮光、をしてむかごの着生をみた。処理開始 2 月後に着生つる率とつるあたりむかご数を調査したところ、(a) 50%, 11 球、(b) 74%, 71 球、(c) 100%, 40 球、(d) 73%, 39 球、と摘葉区で最もむかごの着生数が多かった。しかしつるあたりのむかご重量は遮光区 (d) が最も重かった。

## 文 献

- 1) 石原正利：岡山大学農学部研修報告 (1980)
- 2) 熊沢三郎・二井内清之：蔬菜園芸各論、227–236、養賢堂、東京 (1971)
- 3) 松原幸子・益田忠雄：岡山大農学報、56、21–28 (1980)
- 4) MURASHIGE, T. and F. SKOOG : *Physiol. Plant.* 15, 473–497 (1962)
- 5) 信森達也・内藤恭典：園学要旨 昭62秋、260–261 (1987)
- 6) TANAKA, R. and H. IKEDA : *Jpn. J. Genet.* 58, 65–70 (1983)
- 7) 山下英雄・荒木 肇・八畝利郎：園学要旨 昭62秋、252–253 (1987)