

組織培養法を用いた KMV フリー コンニャクの計画的増殖法

小林光子・米内貞夫

I 緒言

栃木県内のコンニャクはそのほとんどが在来種で、平成2年度の作付け面積及び収穫量はそれぞれ1,040ha, 1,060tであり、隣接の群馬県に次ぎ全国第2位の生産県である。

栃木農試では将来県内でのウイルスフリー種の生産供給体制確立のために、昭和58年度から61年度までは栃木分場において、62年度から生物工学部において生物工学的手法を用いた大量増殖法の研究に取り組んできた。これらの手法が実用に適したものとなるためには 1) 健全な球茎を 2) 特定した時期に 3) 目的とする数だけ供給できることが必要条件となる。

‘健全な’とは本来コンニャクに關与する全ての病害を排除することであるが、本試験では供試材料とした在来種についてコンニャクモザイクウイルス (KMV)^{2,3)} のフリー個体を獲得した。試験はまず茎頂培養により KMV フリー元株を育成し、無菌元株の展開葉を用いて KMV がフリーであることを確認してから増殖を開始することとした。増殖は KMV フリー元株の塊茎、葉柄、根の部位を用いた。これまでコンニャクの増殖には外植体の茎頂⁵⁾、塊茎、葉柄、小葉を用いた報告があるが、今回我々は無菌葉柄からのカルスを誘導し増殖する方法と無菌根からのカルスおよび胚様体を誘導し増殖する方法について明らかにしたので報告する。

本報の中で用いた‘生子の初代培養’、‘同継代培養’、‘塊茎の増殖’、‘発根誘導’等の培地組成および明、暗培養、固、液体培養などの基本的な培養条件については、先に検討を行

い、昭和62年度、63年度生物工学部試験成績書に記載した結果を基に決定した。また本県で通常生子の植付けが行われる5月中、下旬ごろまでに目的とする数だけの馴化株の球茎もしくは生子を用意することを想定し、これらを逆算する形で増殖系を組み立てた。

II KMV フリー元株の育成

生子を用いて茎頂培養を行い、KMV フリーの個体を獲得する。

1. 試験方法

1) 供試材料

平成2年産在来種の生子50個

2) 材料の調製

生子を流水で洗浄後、コルクボーラーで茎頂を含む塊茎を抜き取った。これを70%エタノール溶液で2分間、1%有効塩素の次亜塩素酸ナトリウム溶液で15分間殺菌処理を行い更に滅菌水で洗浄し供試材料とした。次に実体顕微鏡下で、0.2~0.4mmの大きさの茎頂を摘出するとともに、同一個体から茎頂下の塊茎組織約5mm×5mm×2mmをメスで切り取りELISA検定のための試料とした。

3) 培地組成

(1) 茎頂培養初代培地

MS培地に、植調物質としてBA0.1mg/ℓ, NAA 0.01mg/ℓを用い、ショ糖3.0%, gellangum 0.2%を加えpHを5.6に調整したもの。

(2) 茎頂継代培地

MS培地にBA1.0mg/ℓ, NAA0.01mg/ℓ, ショ糖3.0%, gellangum 0.2%を加えpHを5.6に調整したもの。

第1表 茎頂摘出とフリー化率

供試生子	摘出茎頂					KMV	
	個体数	大きさmm	個体数	枯死数	生育数	KMV-個体数	フリー化率%
—	4	0.2	0	—	—	—	—
		0.3	2	0	2	2	—
		0.4	2	0	2	2	—
計	4	—	4	0	4	(4)	—
±	6	0.2	2	1	1	0	0
		0.3	4	2	2	1	25.0
		0.4	0	—	—	—	—
計	6	—	6	3	3	1	16.7
+	40	0.2	8	7	1	0	0
		0.3	18	12	6	2	11.1
		0.4	14	3	11	0	0
計	40	—	40	22	18	2	5.0
合計	50	—	50	23	25	3(7)	6.5

注. KMV検定の結果供試生子がフリーであったものはフリー化率から除いた.

(3) 発根誘導培地

MS培地にショ糖3.0%, gellangum0.2%を加えpHを5.6に調整したもの.

4) 培養条件

25mmφ試験管に1茎頂ずつ置床し, 25℃, 暗黒条件下で培養した. 約1か月ごとに分割をせずに継代を重ね生長を促した. シュートが3cm前後に伸長してきたものを25℃, 3,600lx/12hrs/dayの明条件下に移行し, 発根誘導を行った.

5) KMV 検定

(1) 供試生子のKMV感染率を調べるために茎頂を摘出した生子の塊茎組織約5mm×5mm×2mmをポリエチレンフィルム上でつぶし, その汁液を用いてELISA法⁴⁾によるKMVの検定を行った. KMVの抗血清は農水省種苗管理センターから入手したものをを用いた.

(2) 茎頂培養により生育した無菌個体の葉を直径6mmのペーパーパンチで打ち抜き試料としたものをELISA法で検定した.

2. 試験結果

ウイルスフリー化を期すため, 茎頂の摘出は葉原基付きの場合でも0.4mm以下の大きさに限定した. このため生存率は低く, 0.2mmの大きさに摘出した茎頂からの生存個体は10個体のうち2個体のみであった. 生存個体(同率)は茎頂の大きさが0.3mmになると24個体中10個体(41.7%), 0.4mmでは16個体中13個体(81.3%)と次第に増加した.

茎頂を置床して3か月後に, 生育した個体の葉を用いてKMVの検定を行った結果, 供試生子からKMVが検出されなかった4個体の茎頂由来個体からはKMVは検出されなかった. これに対し供試生子のKMVが+または±であった46個体の中で茎頂培養後フリー化を確認したのは3個体(6.5%)であった(第1表参照).

Ⅲ 塊茎分割による増殖

KMVフリーを確認した元株の塊茎を分割し増殖する場合, 初期の分割塊茎片の大きさが増殖効率に及ぼす影響について調べた.

1. 試験方法

1) 供試材料

KMVフリーであることを確認した培養元株の塊茎

2) 材料の調整

KMVフリーの塊茎から約2gずつの組織を秤り取り, 次の4通りの方法で分割し, 500ml培養びんにそれぞれ置床した.

- (1) 10mg×210個(計2.1g)
- (2) 50mg×40個(〃2.0g)
- (3) 100mg×22個(〃2.2g)
- (4) 300mg×7個(〃2.1g)

3) 培養と分割方法

塊茎増殖用培地は茎頂継代培地と同一組成のものをを用い, 20日を越えない間隔で同一組成の増殖培地に移植した. 培養は25℃, 暗黒条件下で行った. 分割は移植時に, 各区の初期の大き

第2表 初期の分割培養における分割塊茎の大きさと肥大率の関係

区 No	分割塊茎 の 平均重 g	分割 個数	供試 重量 g	2 週間後			4 週間後		
				個数	総重量 g	肥大倍数	個数	総重量 g	肥大倍数
I	0.01	210	2.1	470	4.7	2.2	1,750	17.5	8.3
II	0.05	40	2.0	146	7.3	3.7	434	21.7	10.9
III	0.10	22	2.2	80	7.9	3.6	225	22.5	10.2
IV	0.30	7	2.1	14	4.2	2.0	31	9.3	4.4

注. 肥大倍数は供試重量に対する分割培養後の総重量比を表す.

さとはほぼ同じ程度にメスで切り、培養初期の重量×1,000個体に達した時点からは分割を行わず個体の肥大生長を促した. シュートが3 cm前後に伸び始めて来た頃から発根誘導培地に移植し、明条件下で培養した.

2. 試験結果

元株の塊茎を分割する際、10mg、50mg、100 mg、300mgの4通りの大きさを分割を重ね、それぞれの肥大率を比較したものが第2表である. 4週間後、塊茎切片の総重量で肥大倍率を比較すると50mg～100mgの大きさが最も肥大効率が高かった. また、塊茎の移植時期は2週間を越ええると塊茎表面の組織の一部が水浸状になり、3週間を過ぎると組織の一部が黒変化した. 塊

茎の内部まで水浸状の組織が広がるとシュートの形成は全くなかった. 第1図に示したように50mgの大きさに分割、移植を繰り返すと6週間後には1,000個体になり、それらを暗黒下で培養すると元株の分割から2か月目ごろから筍状のシュートが形成した. シュートが3 cm程度に伸びてきた塊茎は植調物質を含まないMS培地に移植し明条件下に移行した. 塊茎からは複数のシュートが形成するが明条件下で茎葉が優位に伸長するのは1本もしくは2本であった. 茎葉の展開と前後して発根し、明条件に移行後2週間以内で馴化可能となった.

IV 葉柄を用いた増殖

培養元株の葉柄から形成したカルスを初期の段階で目的の数に分割し、肥大、生育させる.

1. 試験方法

1) 供試材料

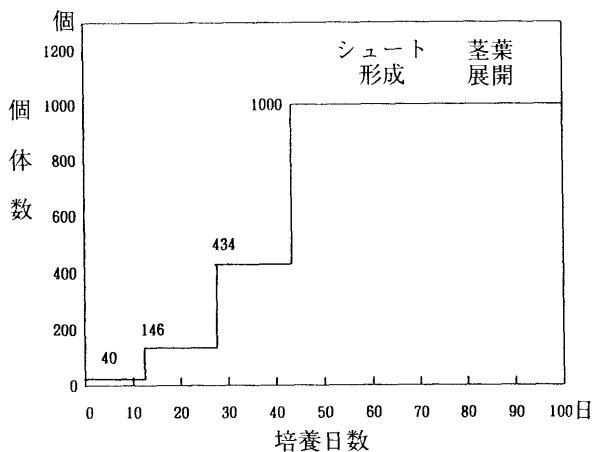
KMVフリーであることを確認した培養個体の葉柄を用いた.

2) 材料の調整

培養個体の葉柄約5 cmを切り取り、滅菌したろ紙の上で長さ約7 mmに切断し置床した.

3) 培地組成

葉柄からのカルス誘導及び増殖培地はⅡ-1-3)-(2)の茎頂継代培地と同一組成の培地、発根誘導培地は同じくⅡ-1-3)-(3)の発根誘導培地と同一組成のものを用了.

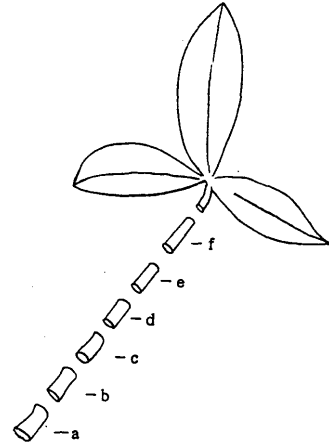


第1図 培養元株の塊茎分割による増殖
(50 mg 分割区)

4) 培養

切断した葉柄は第2図のa～fの順に90mmφシャーレの培地上に置床し、25℃、暗黒下で培養した。30日後、葉柄の切断面付近に形成したカルスをメスで切り取り、約2mmφ(約10mg)の大きさに細切してシャーレあたり40個(400mg)ずつ置床した。

カルスの移植は培養開始後40日、60日、80日、100日の計4回行い、3回目まではカルスの増殖培地、4回目は発根誘導培地にそれぞれ移植した。



第2図 無菌葉柄の切片部位

第3表 無菌葉柄からのカルス誘導

供試 No	置床 切片数 n	葉柄切片の部位別カルス重 g					葉柄あたりの カルス重 g	カルス 形成率 %
		a	b	c	d	e		
1	6	0.45	0.36	0.38	0.29	0.08	1.56	5/6
2	6	0.62	0.52	0.37	0.45	0.15	2.11	5/6
3	6	0.35	0.22	—	0.18	—	0.75	3/6
4	6	0.46	0.48	0.33	0.12	—	2.14	4/6
計(平均)	24	(0.47)	(0.40)	(0.36)	(0.12)	(0.12)	(1.64)	(71)

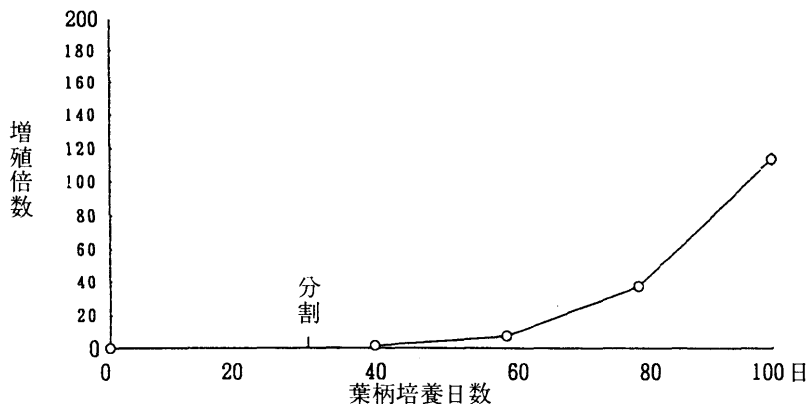
注1. 調査は葉柄置床1か月後

2. 切片部位fは全くカルスを形成しなかった。

カルスの培養は発根誘導培地に移すまでは25℃、暗黒培養とし、同培地に移植してからは3,600lx/12hrs/day照明で行った。

2. 試験結果

培養元株の葉柄を第2図に示した順に並べて培養すると約2週間目ごろから切断面に変化が現れ、培養1か月後には葉柄切片の約70%からカルスを形成した(第3表、写真1参照)。カ



第3図 元株の葉柄培養による増殖

注. 増殖倍数は元株分割時の重量を1とした時の総重量比

組織培養法を用いたKMVフリーコンニャクの計画的増殖法

ルスは葉柄の切片部位a～fのうち、塊茎に近いaから最も多く形成し、先端fの部分は培養後1か月以内にはカルスを形成しなかった。また写真-1に示したようにカルスは切片の塊茎に近い下端から多く形成した。約5cmの無菌葉柄から1か月以内に形成したカルスの重量は平均1.64gであった。形成したカルスを約10mgの大きさに細切すると葉柄1本からは平均164個のカルス塊が分割できた。これらのカルス塊を以降は分割せずに増殖培地へ移植することによりカルスは肥大し塊茎組織に変化していった(第3図参照)。4回目に発根培地に移して明所で培養すると10日以内に発根生育して馴化可能となった。

V 培養元株の根を用いた胚様体の増殖

無菌個体の根からカルスを誘導し、さらに体細胞胚を形成させる増殖法の開発を検討した。

1. 試験方法

1) 供試材料

培養元株の根、30本

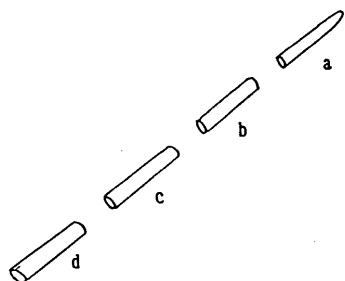
2) 材料の調製

培地内に伸びた根の先端約3cmを滅菌したろ紙上で約5mm長に切り、90mmφシャーレの培地上に置床した(第4図参照)。

3) 培地組成

(1) カルス誘導培地

MS基本培地に第4表に示すNo1～5の植調物質の組合せによりカルス誘導条件を検討した。



第4図 根端の供試部位

いずれの培地もシヨ糖は3.0%, gellangum 0.2%, pH5.6に調製した。

(2) カルス増殖培地

MS基本培地に2, 4-D 1.0mg/ℓ, シヨ糖3.0%を加えた液体培地と固体培地(gellangum 0.2%)

(3) 不定胚誘導培地

MS基本培地に2, 4-D 1.0mg/ℓ, BA0.2mg/ℓ, シヨ糖3.0%, gellangum 0.2%, pH5.6

(4) 植物体分化誘導培地

Ⅱ-1-3)-(2), 茎頂継代培地と同一組成

(5) 発根誘導培地

Ⅱ-1-3)-(3)の発根誘導培地と同一組成

4) 培養

無菌株の根はそれぞれ先端から順に第3表のカルス誘導培地No1～5に置床し、25℃, 暗黒下で培養した(写真2参照)。

約1か月後、根から形成した白色の均質なカルス(写真3参照)のみを混合して、カルス増殖のための固体培地と液体培地にそれぞれ0.5g×4反復ずつ供試した。カルス増殖培地での培養はいずれも25℃, 3,600lx, 12hrs/dayの照明下で行い、20日ごとにカルス重を測定して継代を続けた。液体培地中のカルスは30日目に植物体分化誘導培地に移行した。固体培地中のカルスは100日目に不定胚誘導培地に移した。約

第4表 根からのカルス誘導培地

培地の種類	基本培地	植調物質	
		No	
		2, 4-Dmg/ ℓ	BAmg/ ℓ
1	MS	0.1	1.0
2	〃	0.5	0.5
3	〃	1.0	—
4	〃	1.0	0.5
5	〃	2.0	—

注. いずれもシヨ糖は3.0%, gellangum 0.2%, pH5.6

第5表 培地の種類と根からのカルス誘導条件

培地 No	供試 切片	カルス 形成数 n	カルス重 g	
			白色カルス x (n ₁)	黒変カルス x (n ₂)
1	32	3	0.09 (1)	0.1 (2)
2	〃	11	0.12 (10)	0 (1)
3	〃	11	0.07 (11)	0 (0)
4	〃	14	0.24 (14)	0 (0)
5	〃	13	0.04 (4)	0.2 (9)

- 注1. 調査は培養1か月目
 2. No 1～5までの培地の種類は第10表に記載
 3. カルス形成数 $n = n_1 + n_2$
 4. カルス重はカルスを形成した切片当たりの平均重量

1か月後に形成してきた胚様組織(写真4参照)はピンセットではぐしながら生育した植物をホルモンフリーのMS培地に移した。

5) カルスの低温保存

固体培地上の均質なカルス2.0g (×5反復)をシャーレのまま5℃, 暗黒の条件下で90日間保存した後, 25℃, 明条件下に移し, 分化能の有無を調べた。この場合の培地組成は低温処理中も処理後もMS, 2, 4-D 2mg/lのカルス増殖培地とした。

2. 試験結果

1) 無菌個体の根からカルスを誘導させる条件を検討した結果, 第5表に示したように分裂の盛んな白色のカルスを最も多く形成したのは第4表中のNo 4培地であった。No 4培地での根端の変化は置床後2週間目ごろから起こり, 1

か月目に根切片から形成したカルスの平均重量は0.24gであった。次いで白色のやコンパクトなカルスを形成した培地はNo 3であった。No 1およびNo 5培地は白色のカルスより黒変カルスの方が多かった。

2) また, 根の切片部位 a, b, c, d (第4図)のうちカルス形成率の最も高かった部位は先端aであり, 置床後1か月以内に全ての先端がカルスを形成した。先端aは他のb, c, dに比べて, カルス化率およびカルス形成までの日数ともに勝っていた(第6表参照)。

3) 根から得られた白色の均質なカルスの増殖を固体培地と液体培地で比較したものが第5図である。固体培地上のカルスは20日おきの継代で, 表面は乳白色の均質なカルスの状態のまま増殖し, 増殖培地へ移植して100日目には移

第6表 根の切片部位別カルス形成

部位	供試数	カルス化数		
		< 1か月	1～2か月	計
a	30	30 (100)	0 (0)	30 (100)
b	〃	3 (10)	4 (13)	7 (23)
c	〃	1 (3)	0 (0)	1 (3)
d	〃	4 (13)	2 (7)	6 (20)

- 注1. カルス化率はカルスを形成した供試切片の割合
 2. 培地は第4表のNo 4を用いた。
 3. () 内はカルス化率 (%)

植日のカルス重量の130倍となった。液体培地中のカルスは固体培地上のカルスに比べて増殖が劣り、50日ごろから褐変化が起こり始めた。移植80日目の液体培地中でのカルス重量は固体培地上のカルスの41%であった。これらのカルスが植物体分化能を有しているかどうかⅡ-1-3)-(2)と同一組成の植物体分化誘導培地に移し約1か月間培養すると水浸状になったカルスの一部から白色のカルスが分裂し始めた。根由来のカルスを用いたこの増殖系ではメスを使わずカルスはピンセットでほぐすことによって増殖が可能であった。

4) 2, 4-D単独のカルス増殖培地にBAを0.2 mg/ℓ添加した培地に増殖したカルスを移すと約1か月ごろからカルスの一部に球状の胚様組織が形成した。これらは先端が白く不透明に変化すると数日のうちに塊茎組織となりやがて茎葉が伸長し、1個体となった。これら胚様の組織は1個体として離脱するものもあるが多くは不完全であり、ピンセットで分離する必要があった。生長した塊茎組織は複数のシュートを形成した不定形のものが多かった(写真5参照)。

5) 5℃、暗黒下で3か月間保存したカルスを肉眼で観察すると、やや水浸状になりかかっ

た白いカルスと一部変色枯死したカルスが認められた。カルス重量は5枚のシャーレの平均で2.42 g ($\sigma_{n-1}=0.13$)であった。白いカルスを実体顕微鏡で観察するとembryogenicなカルスが観察できた。この白いカルスのみをカルス増殖培地に移し、25℃、明条件下で培養すると約1か月は増殖が停止した状態であったが、その後は徐々に増殖を始め低温処理を行わないカルスと同様に個体分化に至った。

Ⅵ 増殖個体の馴化

培養増殖個体の馴化後の生育について調査した。

1. 試験方法

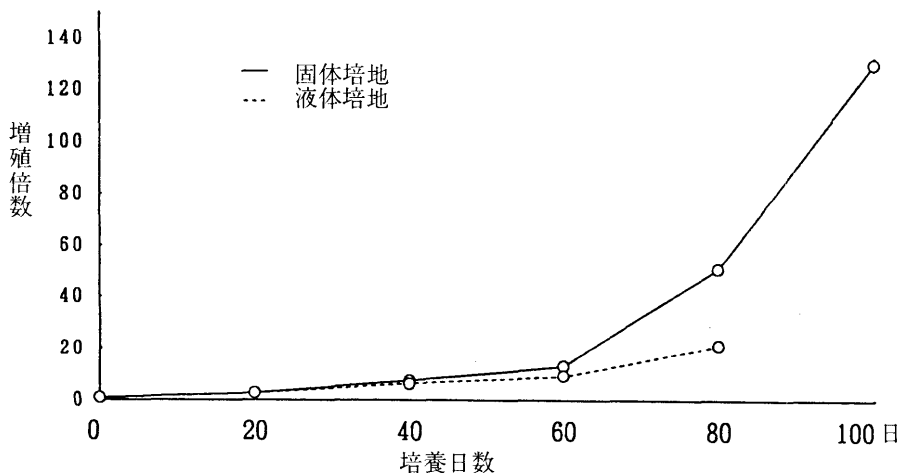
1) 供試材料

塊茎分割によって増殖した1,017個体

2) 馴化方法

メトロミックス-350とパーミキュライトを4:1に混合したものを培土とし育苗箱に5 cm程度の深さに詰めた。

培養びんから取り出した材料は水道水で付着している培地を洗い流し、育苗箱に約5 cm間隔で定植し、ガラス室で養成した。灌水は馴化後2週間は5分間、2回/日、その後は5分間、



第5図 元株の根を用いた増殖

注. 増殖倍数は元株の根から形成したカルスの重量を1とした時の増殖個体の総重量比

1 回／日の条件でスプリンクラー方式の自動灌水装置で行った。

3) 馴化株のKMVフリー検定

馴化後約 5 か月を経て、生育した個体の葉を任意に28個体抽出し、その葉を用いて ELISA 法でKMVの検定を行った。

4) 掘り上げた球茎と生子の調査および保存方法

11月に掘り上げた球茎と生子は1週間風乾した後、個数、重量を調査した。なお、球茎に付いている子球は無理に離さず1個体として個数、重量を計測した。

馴化5か月後の株について、各育苗箱から2本ずつ計24個体の葉をサンプリングし、ELISA法による検定を行った結果、KMVは全検体から検出されなかった(第8表参照)。

6か月後に掘り取った塊茎は812個で、馴化株の80.3%であった。掘り取って1週間後の塊茎の平均重は7.3gであった。

VII 総合考察

1. 組織培養を用いた無病コンニャクの大量増殖法として、生子の茎頂培養により得られたKMVフリー元株の塊茎、葉柄、根を用いた増殖

第7表 培養個体の馴化後生育調査

月日	馴化時		2週間後	2か月後	6か月後		
	個体数	発根率%	活着率%	活着率%	掘り上げ日	個体数	平均重量 g
5. 8 ～ 5. 15	1,017	96.4	92.5	86.2	11. 1 ～ 11.22	817	7.3

注. 発根率及び活着率はそれぞれ馴化時の個体数に対する比率である。

調査の済んだ球茎と生子は翌春まで恒温恒湿器(温度 $9 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $70 \pm 5\%$)で保存した。

2. 試験結果

馴化個体 1,017 株の生存率は馴化2週間後で92.5%、2か月後で86.2%であった(第7表、写真6参照)。

第8表 馴化個体の KMV 検定

供試数	KMV	
	—	+
28	28	0

注1. KMV検定はELISA法による。

2. 供試個体は育苗箱の馴化株を2個体ずつ無作為抽出。

法について検討した。

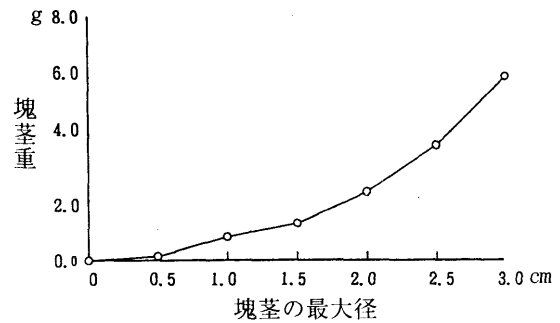
2. 培養条件のうち茎頂の初代培養、継代培養、発根誘導培養については昭和62、63年度に検討した結果に基づいたものである。本報告の中で用いた各培地の植調物質の組成と濃度、明暗培養の別、培養容器等について第9表に示した。

3. 増殖の基となる無菌元株は生子の茎頂培養によって得られた個体のうち KMV フリーを確認した個体を用いた。第1表に示したように供試材料として用いた生子50株のうち KMV フリー株は4個体で、92%は KMV が+もしくは±であった。これらの結果から増殖は元株となる個体が確実にウイルスフリー株であることを確認してから増殖を開始する必要がある。生子からKMVが検出されなかった4個体の茎頂由来個体は全

組織培養法を用いたKMVフリーコンニャクの計画的増殖法

てKMV-であったが、KMV+もしくは土の生子の茎頂由来個体で生育した46個体のうちいわゆるKMVがフリー化できたのは3個体のみであった。単に増殖個体の獲得が目的であればこれらのKMVフリー株を同一ロットとして供試してもよいが、遺伝的に均一なものを獲得したい場合は1個体から増殖する必要がある。

4. 増殖元株の塊茎を用いた増殖法はカルスといった脱分化状態を経ずに塊茎組織のまま分割、肥大させる最も直接的な方法である。この方法では第1図、第6図に示したように初期に2週間毎の分割、移植を3回程度行うことによって1本の元株から1,000個体を越える塊茎組織になった。元株塊茎の分割時の大きさは50mg～100mg前後が最も効率的であった。‘分割’による増殖は初期のうちにできるだけ目的の数に分割して生育させ、増殖の後半、筍状のシュートが形成してから数の不足が生じた場合に分割によって調整を行った。これは第7図に示した



第7図 塊茎の最大径と重量との関係

ように塊茎が肥大してくると重量、体積ともに増加し、メスで分割する作業は時間と雑菌による汚染の危険性が増大してくるためである。また、移植は塊茎が目的の数に達するまでは2週間ごとに行った。2週間を過ぎると塊茎表面の一部が水浸状に変化し始め、3週間を過ぎると表面の組織の一部は黒変化してきた。塊茎内部まで水浸状の組織が広がると回復は不可能であるため、適切な時期に塊茎の移植を行うことが

第9表 培養条件一覧

培養	培 地 組 成				培養条件	
	基本培地	2,4-Dmg/ℓ	BAmg/ℓ	NAAmg/ℓ	培養容器	明暗の別
茎頂初代培養	MS	—	0.1	0.01	試験管	暗
茎頂継代培養	〃	—	1.0	0.01	培養びん	〃
発根誘導培養	〃	—	—	—	〃	明
葉柄初代培養	〃	—	1.0	0.01	シャーレ	暗
カルス培養	〃	—	1.0	0.01	〃	〃
発根誘導培養	〃	—	—	—	培養びん	明
塊茎初代培養	〃	—	1.0	0.01	シャーレ	暗
塊茎肥大培養	〃	—	1.0	0.01	培養びん	〃
発根誘導培養	〃	—	—	—	〃	明
根初代培養	〃	1.0	0.5	—	シャーレ	暗
カルス培養	〃	1.0	—	—	〃	〃
不定胚誘導培養	〃	1.0	0.2	—	〃	〃
不定胚増殖培養	〃	—	—	—	〃	〃
植物体誘導培養	〃	—	1.0	0.01	培養びん	〃
発根培養	〃	—	—	—	〃	明

注1. 培地はいずれもgellangum0.2%, ショ糖3.0%, pH5.6に調製

2. 明条件は3,600lx/12hrs/dayの照明, 培養温度はいずれの場合も25℃

第10表 無菌元株の塊茎、葉柄および根を用いた増殖系の比較
— 1本の元株から1,000個体増殖のモデル—

増殖系	長 所	欠 点
塊 茎	馴化までの期間は最も早い。 変異の可能性は少ないと考えられる。 供試重と分割回数から計画的増殖が可能。	分割の作業あり。 雑菌汚染に注意が必要。 元株は消失。
葉 柄	少量のカルス（10mg）から増殖できるため計画的増殖が可能。	カルス変異を否定出来ない。 元株は消失の可能性大。
根	胚様体の形成が可能。 メスで分割する操作が不必要。 カルスを低温（5℃）で保存可能。 元株は維持できる。	馴化までの期間が最も長い。 カルス変異を否定出来ない。 計画性は劣る。

シュートの形成時期を早めるために重要なことである。

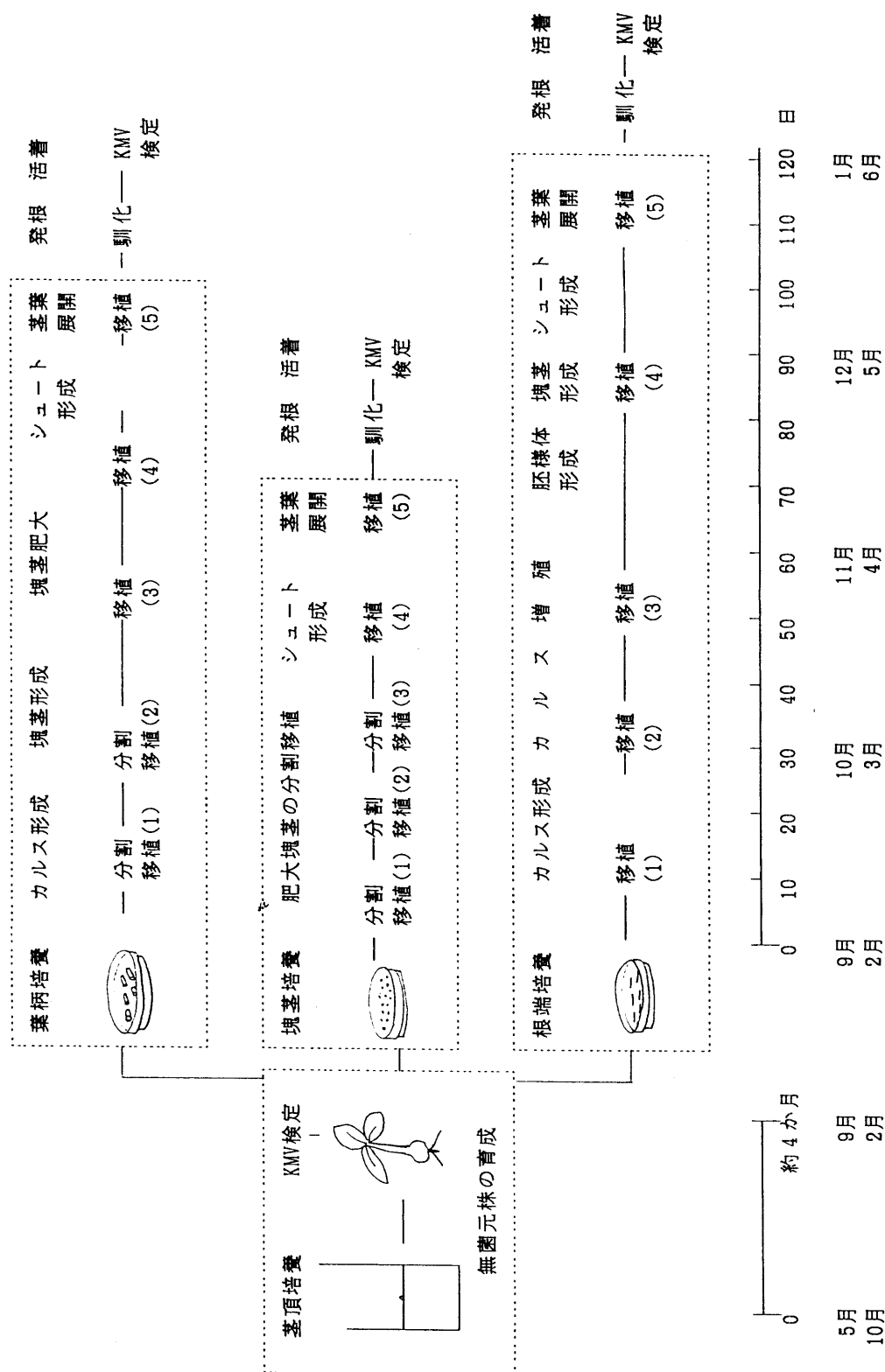
5. 無菌元株の葉柄を用いた増殖法は、葉柄の切断面からカルスを形成させ、カルスを約10mgの大きさに分割して塊茎に生育させるものである。塊茎の分割に比べて、カルス形成という一段階を経なければならないが、均質で柔らかいカルスを微細粒に分割することは操作上もやりやすく、また分割したカルスは1か月を過ぎると急速に生長し、内部は塊茎組織となった。以降は塊茎分割の場合と同様に生育に応じて移植までの間隔が遅くならないように注意する必要がある。

6. 元株の根を用いた場合も同様にカルスを形成させるが、葉柄からのカルスがいわゆる friable であるのに対し、根から形成したカルスは白く embryogenic callus といえるものであった。固体培地と液体培地でカルスの増殖率を比較すると、液体培地でのカルスの生育は継代

を重ねるごとに悪くなったが、固体培地上のカルスは継代を重ねても均質で embryogenic な状態を維持していた。

7. 植物の増殖を図る場合、増殖法の開発と共に一定の状態を増殖を停止させておけることが必要とされる。本試験の場合増殖の基となる無菌元株の保存が最も望ましいが個体としての生育を抑えることは限度がある。そこで根由来の embryogenic callus を用いて低温保存試験を行った。その結果3か月は分化能を失わずにほぼ増殖を停止したカルスの状態で維持できることを示している。今後、さらに保存期間の延長を図ると共に乾燥法、凍結法など他の保存方法についても検討する必要がある。

8. 根由来のカルスから形成した胚様の組織は直接塊茎となり、出芽、発根することから胚に似た性質を持つといえるが、完全に独立した個体となるもばかりではなく人為的に分ける作業を必要とした。



第6図 コンニャクの増殖フロー（1本の元株から1,000個体を増殖する場合）

9. 無菌元株の塊茎、葉柄、根の各部位を用いた増殖法についてまとめたものが第6図および第10表である。必要とする個体数を目的の時期に獲得するための計画的な増殖体系にほぼ近づけた増殖法が塊茎と葉柄を用いた増殖系である。今回は1個体を元株として1,000個体を増殖させることをモデルとして組み立てたもので、実用的な増殖体系のための算出基礎となると考えられる。

VII 摘 要

コンニャク生子の茎頂培養によって、KMVフリーを確認した無菌元株の葉柄、塊茎、根を用いて大量増殖の手法を明らかにした。

1. 供試材料として用いた生子のKMV汚染率は92%であった。茎頂培養により、KMV-を確認した個体を増殖の元株とした。

2. 元株の塊茎を分割して増殖する方法は最も早く馴化個体を得ることができる。また初期に目的の個体数に分割することによって計画的な増殖が可能である。

3. 元株の葉柄からカルスを形成させ、カルスを約10mgの大きさで目的の個体数に分割し、以降は肥大生育した塊茎からシュート形成、発根させることによって計画的な増殖が可能であ

る。

4. 元株の根からカルスを誘導し、embryogenic callus から胚様体を形成させた。これらの胚様体は体細胞胚としての独立性は不完全で、計画的な増殖体系にはまだ検討の余地がある。

5. embryogenic callusを5℃で3か月間は増殖を停止させ、再び個体分化をさせることができた。今後、増殖の制御が加味されてさらに効率の良い増殖法の開発に発展すると考えられる。

なお、この研究を進めるにあたって、ご指導、ご協力をいただいた当試験場作物部、倉井主任研究員および病理昆虫部、中山主任に厚く感謝の意を表します。

引用文献

1. Murashige, T. and F. Skoog (1962)
Physiol. Plant 15:473-497
2. 下山 淳ら (1990) 日植病学報 56(1):
100-101
3. 下山 淳ら (1990) 日植病学会要:213
4. 下山 淳ら (1989) 関東東山病害虫研究会報No36
5. 下山 淳 (1986) 日作紀 55(3):381-382

Studies on Systematic Propagation of KMV-free *Amorphophallus*
konjac K. Koch by Biotechnological Methods
Mitsuko KOBAYASHI and Sadao YONAI

Summary

The method of mass propagation of konnyaku has been established using petioles, corms and roots of cultured mother plants.

1. The contamination rate of konnyaku mosaic virus (henceforth KMV) in the material corms was 92%. The plantlets confirmed to be KMV-free were selected as mother plants for propagation.

2. The division of corms was the most rapid method for propagation. The planned propagation is possible by cutting corms into expected number of pieces at the beginning of the culture. It took three months from the division of a corm to habituation of 1,000 plantlets.

3. The planned propagation is also possible by the division of callus which was derived from petioles of mother plants. Callus fragments were prepared to weigh about 10mg. It took four months from the culture of petioles to habituation of 1,000 plantlets.

4. By culturing roots of mother plants, embryogenic callus was induced in a month. These embryogenic calluses developed into embryogenic tissue which did not develop into the perfect embryo. There is, therefore, much room for further improvement in this propagation system.

5. We had made an attempt to keep embryogenic callus at 5 °C for three months to retain propagation. These calluses had ability of regeneration. If the regulation of propagation in tissue culture has been accomplished, effective propagation system will be established.

〔 Bull. Tochigi Agr. Exp.
Stn. No. 38 : 147 ~ 160 (1991) 〕

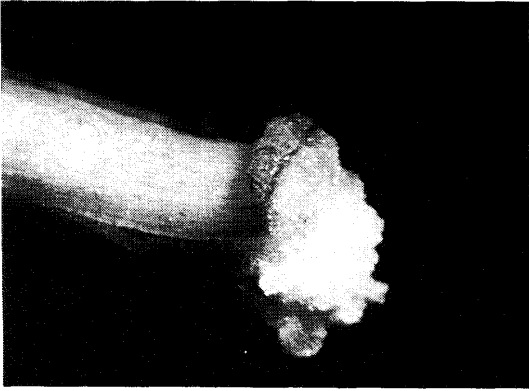


写真1 葉柄から形成したカルス

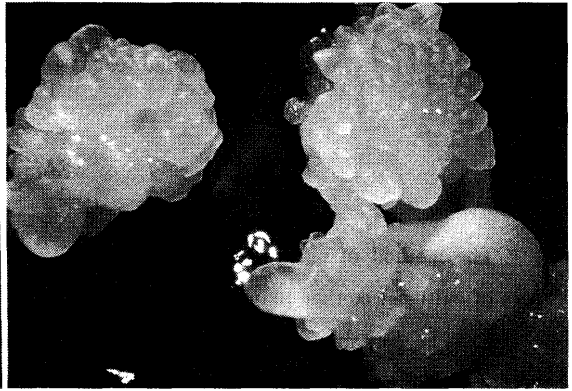


写真4 カルスから形成した胚様の組織

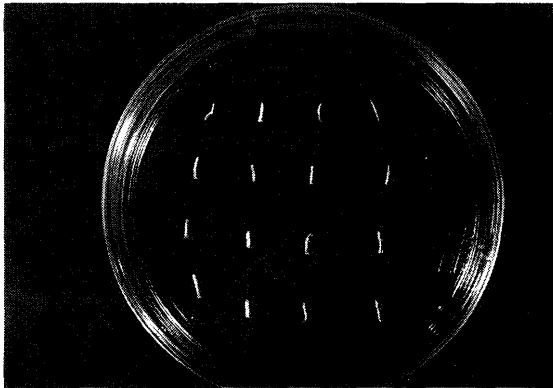


写真2 根の切片培養

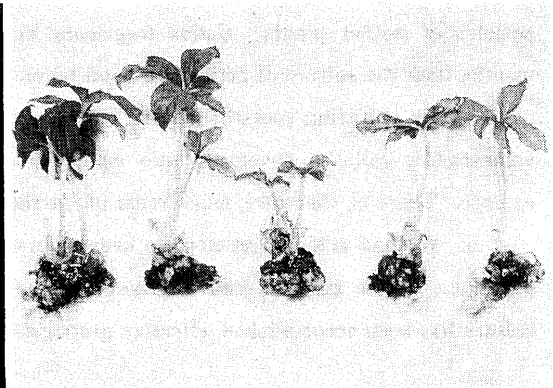


写真5 胚様の組織から分化した植物体

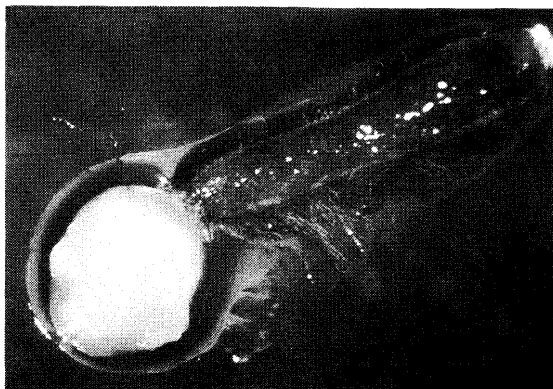


写真3 根端から形成したカルス



写真6 馴化個体