

生物工学的手法を用いた無病こんにゃくの計画的増殖法

1. 試験のねらい

生物工学的手法を用いて無病こんにゃくの計画的な増殖を図るための培養条件を検討し、将来、県内こんにゃくのウィルスフリー種球の生産供給体制確立に資するものとする。

2. 試験方法

在来種の生子を殺菌して茎頂培養を行った。無菌的に生育した培養個体の葉の一部を用いてこんにゃくモザイクウィルス（KMV）の検定（ELISA法）を行い、KMVフリーを確認した培養個体を増殖のための元株とした。

増殖のために無菌個体の葉柄、塊茎、根をそれぞれ用いた。

葉柄は5 cm程度に切取ったものを約7 mmの長さに細切し、シャーレの培地に置床した。1か月後葉柄の切断面から形成したカルスを約10 mgの大きさで目的とする数に細切し培養すると約3か月で馴化可能な幼苗となった。この間20日ごとに継代し、シュートが形成してからは発根用の培地に移植した。塊茎は約50～100 mgの大きさに細切しシャーレで培養した。培養の初期に目的の数に分割しその後は2週間ごとに継代しながら塊茎を肥大させ、シュートが形成してからは発根用の培地に移植し、馴化可能な幼苗とした。

根は約5 mmの長さに細切し培養後1か月後に形成したカルスを増殖培地に移し、増殖したカルスを不定胚誘導培地に移行した。移行後約1か月ごろから胚様体が形成し、それらは数日のうちに塊茎になるとシュートを形成しながら発根した。根から形成したカルスの一部は5℃で30日間保存し、増殖をほぼ停止させた後、再び25℃の増殖条件に移行させた。

馴化した1,017個体の中から28個体の葉についてKMVの検定を行った。

3. 試験結果および考察

培養条件を検討した結果、それぞれの培養に最も適した条件を表-1に示した。また、無菌母株の葉柄、塊茎、根を用いた増殖フローを図-1に示した。それぞれの培養系の長所と短所を示したものが表-2である。根から形成した胚様体は不定胚としては不完全であるため今後さらに検討する必要がある。また根から形成したカルスを低温で増殖をほぼ停止させ、3か月後に再び増殖、再分化能を有していることが確かめられた。今後、保存期間の延長を図ると共に凍結法、乾燥法など他の保存方法についても検討する必要がある。大量増殖の手法は増殖の向上を図ると同時に無菌個体の保存法が確立されて増殖の制御が可能となることによってさらに実用に即した増殖技術に発展すると考えられる。

なお、馴化した個体のKMV検定結果は全てウィルスフリーであることが確認された。

4. 成果の要約

こんにゃく在来種の茎頂培養により得られた無菌個体のうちKMVフリーを確認した個体を培養元株としてその葉柄、塊茎、根からの計画的な増殖法を開発した。

（担当者 生物工学部 小林光子）

表-1 培養条件一覧

培養 ()内は図-1の番号	培地組成				培養条件	
	基本培地	2,4-D mg/l	BA mg/l	NAA mg/l	培養容器	明暗の別
茎頂初代培養 (I)	MS	—	0.1	0.01	試験管	暗
茎頂継代培養 (II)	"	—	1.0	0.01	培養びん	"
免根誘導培養 (III)	"	—	—	—	"	明
葉柄初代培養 (IV)	"	—	1.0	0.01	シャーレ	暗
葉柄～カルス培養 (V)	"	—	1.0	0.01	"	"
免根誘導培養 (VI)	"	—	—	—	培養びん	明
塊茎初代培養 (VII)	"	—	1.0	0.01	シャーレ	暗
塊茎肥大培養 (VIII)	"	—	1.0	0.01	培養びん	"
免根誘導培養 (IX)	"	—	—	—	"	明
根初代培養 (X)	"	1.0	0.5	—	シャーレ	暗
根～カルス培養 (XI)	"	1.0	—	—	"	"
不定根誘導培養 (XII)	"	1.0	0.2	—	"	"
塊茎肥大培養 (XIII)	"	—	1.0	0.01	培養びん	"
免根誘導培養 (XIV)	"	—	—	—	"	明

注. 培地はいずれも gellanum 0.2%, シュ糖 3.0%, pH 5.6 に調整した。
明条件は 3.6klx/12hrs/day の照明。培養温度はいずれの場合も 25℃であった。



写真1. 葉柄から形成したカルス

表-2 無菌母株の塊茎、葉柄および根を用いた増殖系の比較
— 1本の無菌母株から1,000個体増殖のモデル—

増殖系	長所	欠点
塊茎	分化までの期間是最も早い。 変異の可能性は少ないと考えられる。 供試量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。 母株は消失。
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。 母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要。 カルスを低温で増殖を停止させ、保存可能 母株は維持できる。	分化までの期間が最も長い。 カルス変異を否定出来ない。 計画的性は劣る。

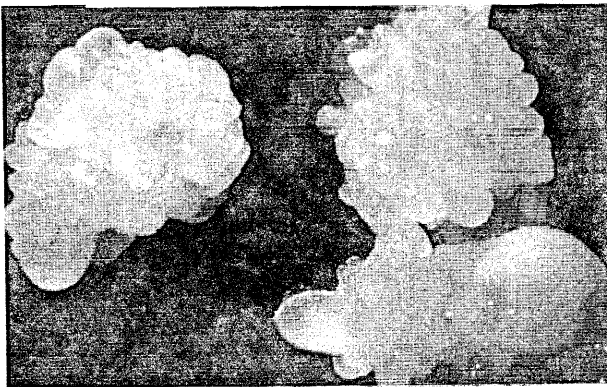


写真2. 根から形成したカルスと胚葉体

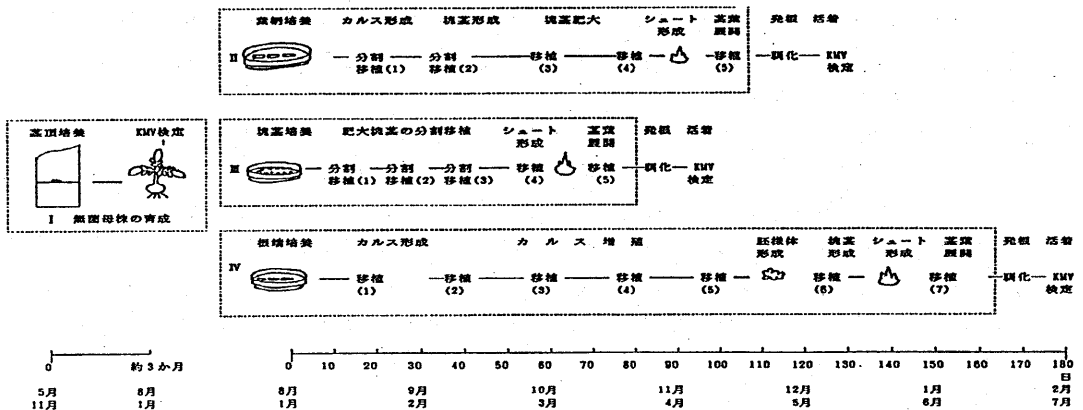


図-1 こんにゃくの増殖フロー

(1本の母株から1,000個体を増殖する場合)