

ワサビ幼植物の試験管内における短期保存

春木 和久*・山田 員人*

Short Storage of Japanese Horseradish (*Wasabia japonica* MATSUMURA)
Plantlet in a Test Tube.

Kazuhisa HARUKI and Kazuto YAMADA

近年、多くの作物で組織培養を用いた増殖法が開発され、従来増殖が困難であるとされていた作物でも実用化されている^{5,6,7)}。ワサビ (*Wasabia japonica* MATSUMURA)においても、試験管内での分割増殖による大量増殖法が実用化されており^{1,2,8)}、島根県では四見町に設置された増殖施設で苗の増殖、配布が行われている。ところが、ワサビ苗の需要は、本圃への植え付け時期である春と秋に限られているため、施設の稼働率が低く、これが生産された苗の単価を上昇させる要因の一つとなっている。

増殖時のコストを低減するためには、施設の稼働率を向上させ、最小限の設備でできるだけ多くの苗を生産することが必要である。特に、苗の定植が困難である夏の高温期と冬の積雪期に生産された苗を一時的に保存し、出荷時期を調整することができれば、増殖施設の効率的な運営が可能になると考えられる。そこで、定植期以外の時期の出荷を回避するための短期保存法を検討した。保存用の設備としては、導入の容易さを考慮して、10~-10°Cの設定が可能な保存庫を利用することを前提として実験を行った。

なお、この試験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実用化技術研究開発促進事業」によって行ったものであり、関係機関に感謝の意を表す。

I. 実験方法

1. ホルモンフリー及びBA添加培地における保存温度と苗の保存中の生育

ワサビ‘大神2号’(旧系統名‘No.8702’, ‘島根3号’)と在来系統が自然交雑した個体群の中から優良個体を選抜し、クローン増殖したもの)の培養苗を用いて実験を行い、6-ベンジルアミノプリン (BA) 0.1mg/l, しょ糖20g/lを添加したワサビ用改変MS培地⁸⁾で増殖したシュートを分割し、保存用培地に移植した。シュートは、約5mm以上の葉柄を持つ葉を3枚付けて用いた。保存用培地はホルモンフリーあるいはBA0.1mg/lを添加したワサビ用改変MS培地とし、直径18mmの試験管に培地を6ml入れてゲランガム0.2%で固化して用いた。試験管の蓋はポリエチレン製の家庭用ラップフィルムを滅菌して用いた。保存温度は-10, 0, 5, 10°Cとし、暗黒条件で、それぞれ50本ずつ保存した。保存開始時及び1, 3, 6か月後にシュート数、葉数、草丈を調査した。葉数は葉柄が約5mm以上に伸長したものを対象に調査した。草丈は、試験管内にある状態で、茎頂の位置からその個体のいちばん高い位置までの長さを測定した。

2. 分割増殖時における保存と保存終了後の生育

ワサビ苗の需要に応じてその生産量を調節するひとつの方法として、増殖段階で生産量を調節する方法を確立するために、BAを添加した増殖用培地での保存

法を検討し、保存終了後の生育状況を調査した。

前述と同様な培養苗を用い、BA0.1mg/lを添加したワサビ用改変MS培地を保存用培地として用いた。保存温度は-3.0、-1.5、0°Cとし、暗黒条件で50本ずつ3か月間保存した。更に、保存終了後には同種の培地に移植し、20°C・3000lx・12時間日長条件で培養した。調査は、保存開始時、保存2か月後、保存終了時及び移植1か月後に上記と同様にして行った。

3. 発根処理時における保存と保存終了後の生育

発根処理段階で生産量を調節するために、発根培地での保存法を検討した。

前述と同様な培養苗を用い、保存用培地としてホルモンプリーのワサビ用改変MS培地を用いた。保存は0°Cで3か月間行い、保存終了後に20°C・3000lx・12時間日長条件に移した。また、対照として、低温保存しない培養苗を保存苗の保存終了後と同一条件で培養する区を設けた。調査は、1か月毎にシュート数、葉数、草丈、発根の有無について上記と同様にして行った。

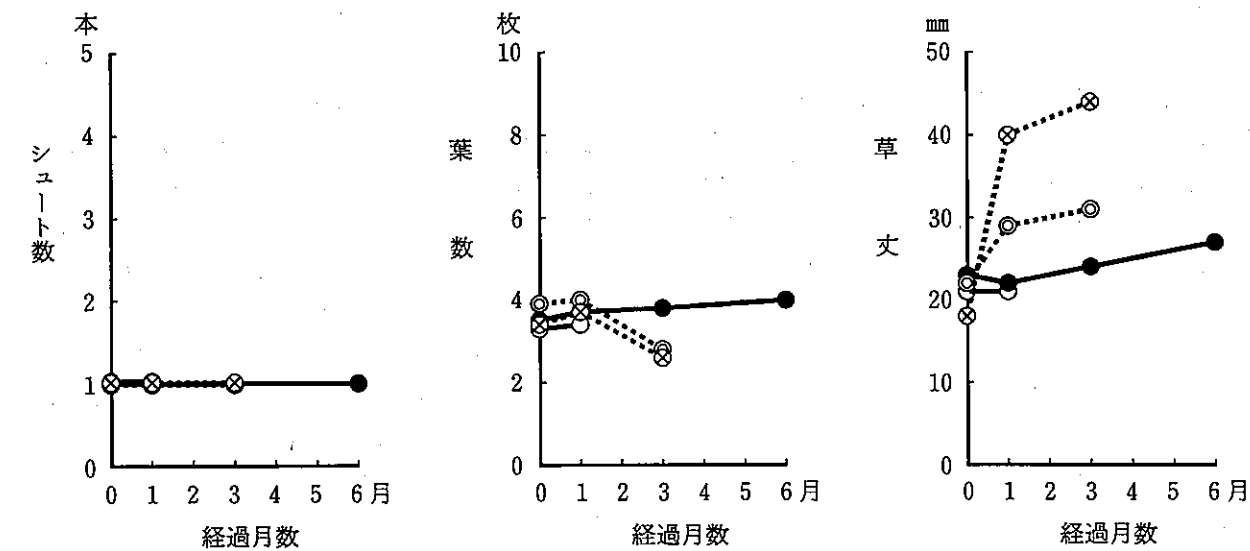
II. 実験結果

1. ホルモンプリー及びBA添加培地における保存温度と苗の保存中の生育

ホルモンプリー培地での保存温度と試験管内の幼植物の生育状況を第1図に示した。シュート数について

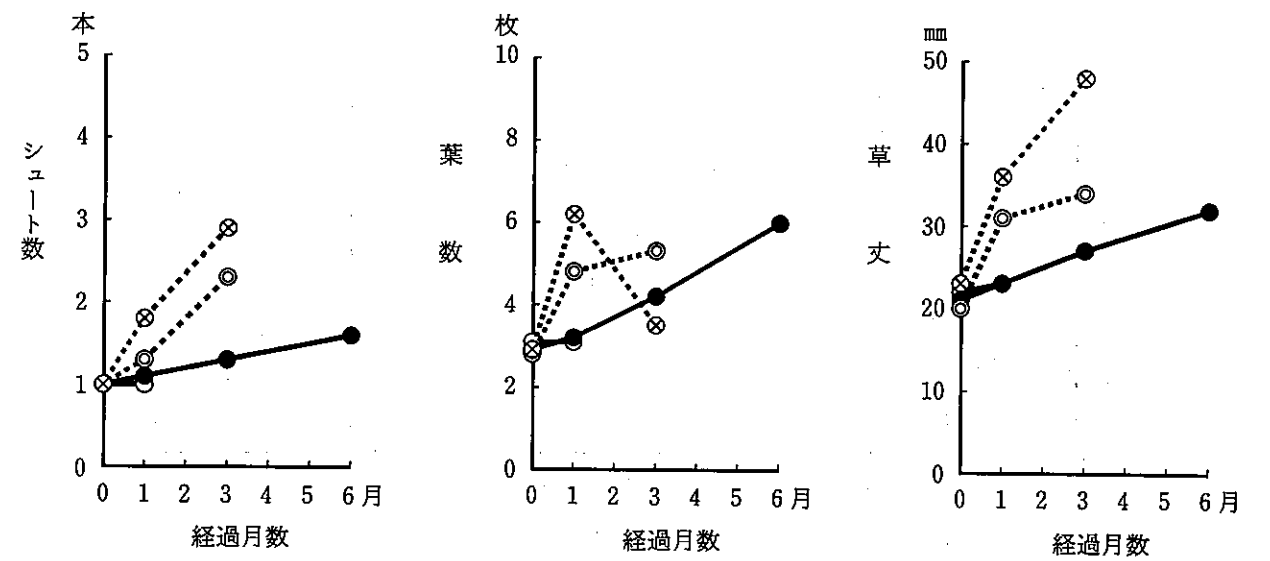
は、保存中いずれの区においても全く変化がみられなかった。-10°Cで保存した場合には、保存1か月後までは外観上の変化はみられず、葉数、草丈ともほとんど変わらなかった。しかし、3か月後の調査では、植物体全体が凍結しており、保存庫外へ取り出して解凍したところ、植物体全体が水浸状になった。更に数日間放置したところ組織が黄変し、枯死していることが明らかとなった。0°Cで保存したものは、保存終了時まで生存しており、葉数、草丈ともほとんど変わらなかった。5°C及び10°Cで保存した場合には、保存1か月後まではほとんど変化はなかったが、3か月後には、植物体全体が黄変し、葉数が減少した。また、草丈は、他の温度で保存したものに比べて高かった。これらの温度では、これ以上の保存は困難と考えられたので、この時点で調査を打ち切った。

BA添加培地を用いた場合の結果を第2図に示した。BA添加培地においてもホルモンプリー培地を用いた場合と同様に、-10°C区では3か月後に枯死が確認された。また、5°C区では葉は増加したものの黄変し、10°C区では葉数の減少、葉の黄変、草丈の伸長がみられた。特に、10°C区では、1か月から3か月の間に、葉数が著しく減少し、更に約半数の葉が黄変したので、両区ともこの時点で調査を打ち切った。これに対して、0°C区では、葉色にはほとんど変化がなく、シュート数、葉数は、保存中に、ホルモンプリー培地で保存し



第1図 ホルモンプリー培地における保存温度と生育

○—○ -10°C ●—● 0°C
◎—◎ 5°C ⊗—⊗ 10°C



第2図 BA添加培地における保存温度と生育

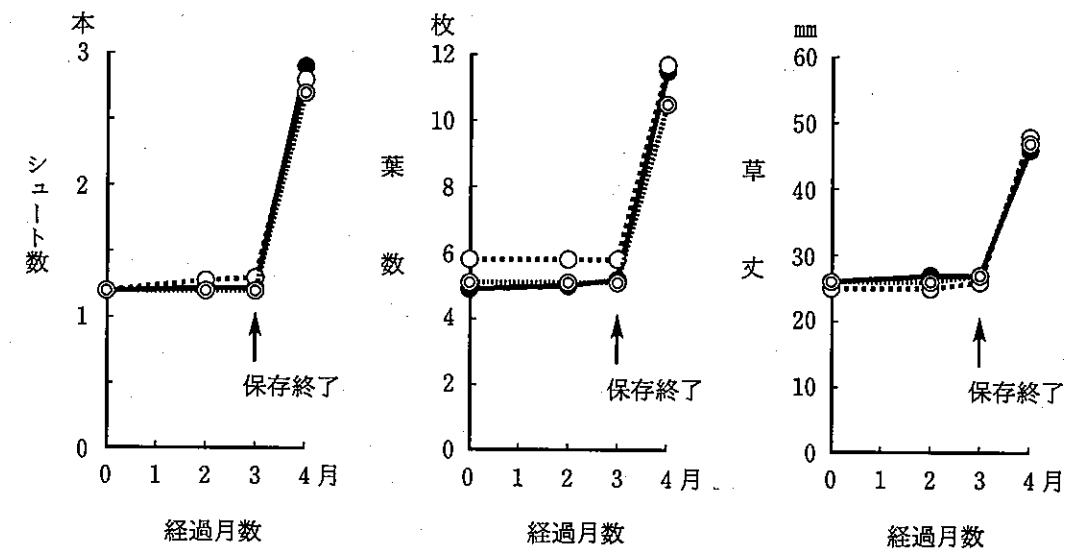
○—○ -10°C ◎—◎ 5°C
●—● 0°C ⊗—⊗ 10°C

た場合より増加し、草丈は伸長する程度が大きい傾向が認められた。特に、シュート数、葉数は、6か月の保存期間中にそれぞれ約1.5、2倍に増加した。

2. 分割増殖時における保存と保存終了後の生育

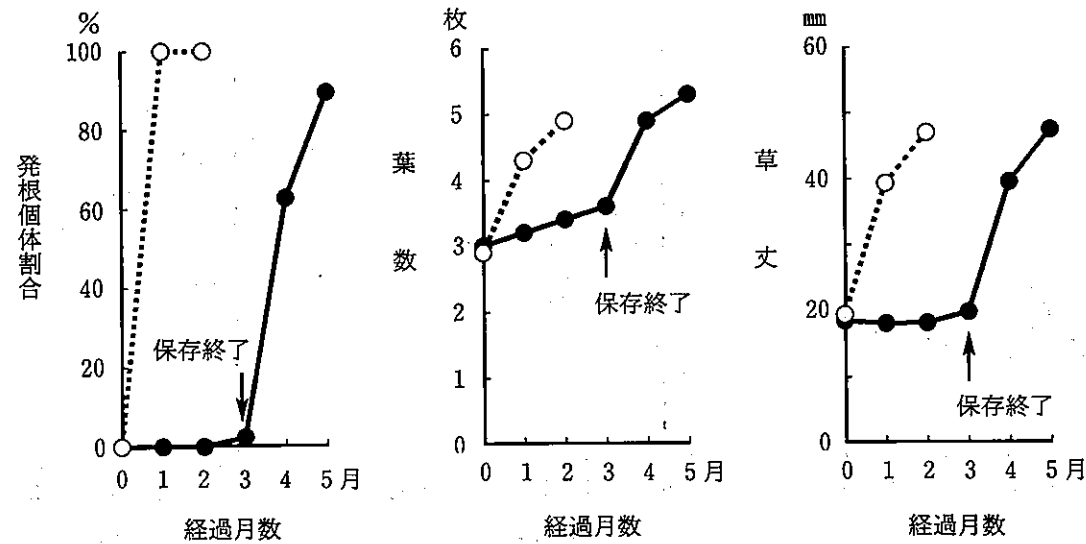
保存中と、保存終了後に移植して20°Cで再び培養した場合の生育状況を第3図に示した。

0、-1.5、-3.0°C保存区はいずれも3か月間の保存中にシュート数、葉数、草丈の変化はほとんどみられなかった。保存終了後に新しい培地に移植し、20°C照明条件に移したところ、1か月間で急激な生育を示し、シュート数、葉数が著しく増加するとともに、草丈の伸長も大きかった。なお、-1.5、-3.0°Cに設定



第3図 BA添加培地での低温保存と生育

●—● 0°C ○—○ -1.5°C ◎—◎ -3.0°C
保存終了前は各温度で保存、その後は20°Cで培養



第4図 ホルモンフリー培地での低温保存と生育

●—● 保存区 (保存は0°C・終了後は20°Cで培養)
○-----○ 無保存区 (20°Cで培養)

した保存庫では、1日に1~2回霜取りのために庫内の温度が一時的に上昇する場合があります、この影響については今回の実験では明らかにならなかった。

3. 発根処理時における保存と保存終了後の生育

発根処理に用いるホルモンフリー培地を用いて保存した場合の保存中及び保存終了後の生育状況を第4図に示した。

0°Cでの保存を行わずに20°Cで培養したものは、直ちに発根が始まり、1か月後にはすべての個体で発根がみられた。また、葉数、草丈とも培養期間の経過とともに増加し、2か月後には葉数約5.0枚、草丈約50mmとなった。

0°Cで保存したものは、3か月間の保存期間中には発根個体はほとんどなく、葉数、草丈もほとんど変化はなかった。しかし、保存終了後、20°Cで培養を始めたところ、直ちに発根が始まり、発根率は1か月後には約60%、2か月後には約90%に達した。また、葉数の増加と草丈の伸長が認められ、葉数は1か月後に無保存区の2か月後と同程度の値となり、草丈も無保存区と同様に伸長した。2か月後には、葉数は無保存区を上回り、草丈はほぼ同程度となった。

III. 考 察

ワサビは日本原産の多年生草本であり、葉を付けたまま越冬する。積雪地帯でも雪の下で越冬することから、0°C前後の低温での保存に耐えられることが予想される。今回の実験から、0~10°Cで3か月程度は生存可能であることを認め、特に、0°Cでは6か月程度まで、ほとんど生育しない状態で保存が可能であることが明らかとなった。これに対して、5°Cあるいは10°Cで保存した場合の草丈の伸長は、暗黒条件におかれたことによって徒長したためであり、葉数の減少は古い葉が脱落したことによるものである。

保存用培地としてホルモンフリー培地とBA添加培地を用いた場合、保存中のシュートの生育に違いがみられる。BA添加培地では、0°Cでもシュート、葉数が増加し、5°Cにおいてもホルモンフリー区でみられるような葉の枯死はみられず、葉数が増加した。これは、サイトカイニンとしての作用を持つBAによる腋芽発生促進作用⁸⁾と老化抑制作用⁴⁾によるものと考えられる。

以上の結果から、培養苗の一時的な保存については、BA添加培地を用い、0~3°Cで行うのが適切であると考えられる。この場合、保存中にほとんど生育が

みられないものの、その個体を、新しい培地に移植して生育適温に移すことにより生育が急速に回復することから、保存中に増殖能力はほとんどそなわれないことが明らかとなった。したがって、分割増殖の段階で、適宜3~6か月程度の保存を行うことにより、培養苗の生産調整が可能になるものと考えられる。

発根培地に植え付けた苗についても、保存終了後の発根、伸長の能力が損なわれていないことを認めたことから、発根培地に移植した苗を保存することにより、順化の段階で苗の生産量の調節が可能となる。しかし、保存終了後の発根率は無保存区に比べて劣っており、これは、低温保存による悪影響、あるいは培地交換をしなかったための培地成分の変化が原因として考えられるので、今後更に検討が必要である。

ワサビの定植適期は秋又は春であり、多くの場合10~12月に定植され、苗の需要もこの時期に多くなる。しかし、試験管内分割法により生産される苗は、年間を通じて一定量ずつ生産することがコストの面で有利である。今回開発することのできた短期保存法を利用すれば、育苗困難な6~8月あるいは12~2月の出荷を回避することが可能となる。

苗生産について一例を示すと第5図のようになる。すなわち、4~6月に分割した個体は、ホルモンフリーの培地に移植して保存庫に保存しておき、7月に分割したものととも7月に培養室で発根させ、8~9月に順化、9~10月に出荷の手順となる。また、発根処理時に培養室が手狭になった場合には、分割増殖用の苗を保存庫で一時的に保存しておくことができる。これにより、育苗管理の難しい夏の高温期に育苗をせざるを得ない6~8月の出荷を回避できる。また、山間部で積雪のために育苗が困難になる12~2月についても同様にして回避することが可能となる。この方法は、特別な操作は必要とせず、従来どおりの方法^{1,2,8)}で増殖した個体をそのまま保存庫に入れればよく、手軽で

あるという利点がある。しかし、試験管に入ったまま保存庫に入れることから、大量に保存する場合には大型の保存庫が必要である。また、発根処理、順化を多数同時に行うため、一時期に培養施設、順化施設の利用が集中する欠点もある。

水野³⁾は組織培養により増殖された苗について、農家はできるだけ小さい、発根していない、増殖培地上の苗を鉢上げできる技術力をもつ必要があると述べている。ワサビの苗生産においても更にコストを低減するためには、増殖培地あるいは発根培地から直接冷蔵保存を行い、保存終了後に直接育苗床へ植え付ける方法を検討する必要がある。

IV. 摘 要

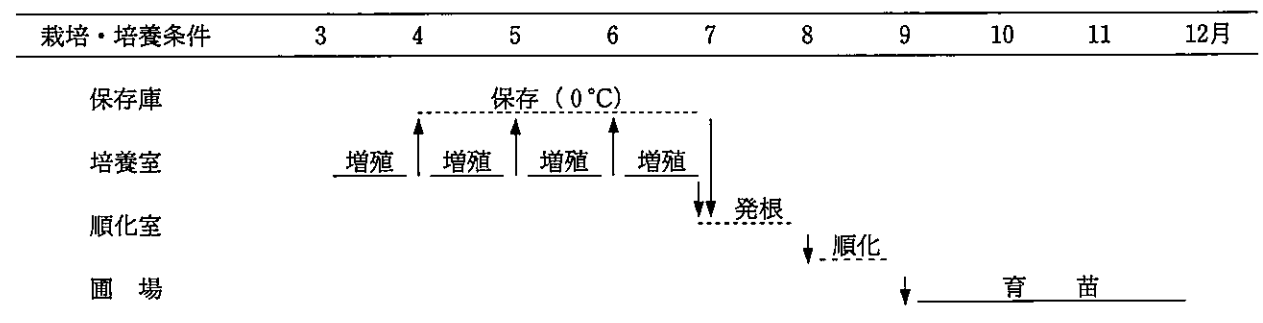
組織培養を用いたワサビの増殖において、定植困難な時期を回避するために、冷蔵庫を利用した短期保存法を検討した。

1) ホルモンフリーあるいはBA0.1mg/l添加培地を用いて0°Cで保存した場合には、ほとんど生育せず、6か月間保存することが可能であった。

2) BA0.1mg/l添加培地を用い0°Cで3か月間保存した後、20°C明条件に移したところ、正常に生育したことから、保存中に増殖能力が損なわれないと考えられた。

3) ホルモンフリー培地を用い0°Cで3か月間保存した後、20°C明条件で培養したところ、発根が始まり、約2か月で順化可能な状態になった。

4) 今回の実験をもとにして、夏季あるいは冬季の定植困難な時期を避けた育苗法を組み立てることができた。



第5図 短期保存を利用したワサビの苗生産

V. 参考文献

- 1) 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.
- 2) 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; 653-653.
- 3) 水野直美 (1992) : 植物大量増殖における分化発育の制御と種苗生産技術の開発. SHITA REPORT No. 4 植物種苗の工場生産と利用. 日本植物工場学会. p.79-85.
- 4) 石倉晋 (1986) : 植物ホルモン. 東京大学出版会, p.77-69.
- 5) 西村繁夫 (1990) : 培養苗生産システム. 組織培養の植物科学・産業技術への利用. 日本植物組織培養学会第2回植物組織培養コロキウム; 14-17.
- 6) 大山勝夫 (1990) : 細胞育種の現状と展望. 組織培養の植物科学・産業技術への利用. 日本植物組織培養学会第2回植物組織培養コロキウム; 6-9.
- 7) 高山真策 (1990) : 植物大量培養から植物工場へ. 植物工場2 (1); 1-8.
- 8) 山田員人・春木和久 (1992) : ワサビの茎頂培養による大量増殖法. 島根農試研報26; 85-95.

Summary

The short storage of Japanese horseradish (*Wasabia japonica* MATSUMURA) plantlet in a test tube was studied for the planting at available time.

- 1) The plantlets of Japanese horseradish scarcely grew on the medium with hormon free or BA 0.1mg/l at 0 °C and could be stored for six months at the same condition.
- 2) The proliferation potential of the plantlet can be kept in high level for the short storage, because the plantlet on the medium with 0.1mg/l BA grew normally at 20 °C after three months storage at 0 °C.
- 3) The plantlet developed roots and was in acclimatization in the incubation at 20 °C after three month storage on the hormon free medium at 0 °C.
- 4) The method of short storage of Japanese horseradish plantlet and the efficient utilization of cultural equipments were confirmed. As a result, nursery plants production can be run at available seasons.