

# クワにおける組織培養技術の用途開発に関する研究

## 第1報 クワ萎縮病株の分離芽培養

工藤 哲朗

(山形県蚕業試験場)

### Studies on the Application of Tissue Culture in Mulberry

#### 1. In vitro cultivation of mulberry buds detached from dwarf disease branch

Tetsuro KUDO

(Yamagata Sericultural Experiment Station)

#### 1 はじめに

クワの組織培養技術については、器官形成に関する芽の分離培養法はほぼ確立され<sup>1)</sup>、育種、繁殖、系統保存、生理解明及び病理等の研究に用いられている。

筆者は、培養幼植物体レベルにおける、各種研究素材としての活用方法を検討しているが、今回は、クワ萎縮病罹病株の腋芽を分離培養し、病徴発現した発根個体を得るための、初代及び発根の培地条件を調査したので報告する。

#### 2 試験方法

##### (1) 試験-1 罹病株の緑色腋芽の初代培養

1) 供試材料： 品種剣持の夏切後に発生した明らかな縮葉症状を呈した重症株で、20~30cmの新梢を採取し(1985年9月18日)、先端5~10cmの範囲内の緑色腋芽を用いた。

2) 滅菌、調整方法： 1~2芽付茎に切断し、70%アルコールに数秒間浸漬後、Tween20を数滴添加した次亜塩素酸ナトリウム溶液(有効塩素1%)に15~18分間浸漬して滅菌処理を行い、滅菌水で3回洗浄、1芽1節(10~13mm茎付き)に調整し外植体とし、培地に横置きに置床した。

3) 培地条件： Murashige-Skoog (MS) を基本培地に、ベンジルアデニン (BA) 1 mg / l 加用培地、ナフタリン酢酸 (NAA) 0.1 mg / l 加用培地、BA 1 mg / l

+NAA 0.1 mg / l 加用培地の3試験区を設定した。なお、蔗糖3%、寒天0.8%を加え、pH 5.6に調整し、管瓶(φ25mm × L120mm)に10mlずつ分注し、1気圧15分間滅菌処理した。

4) 培養条件： 27 ± 2 °C, 12L / 12D, 約2,000Lux

##### (2) 試験-2 継代増殖培養シュートの発根培養

1) 供試材料： 試験-1のBA+NAA加用培地で得られた病徴発現シュートの腋芽を、MS+BA 1 mg / l 培地で約1か月半ごとに3回継代培養後のシュートを用いた。

2) 調査方法： 培養株からシュートを切り取り、滅菌水で洗浄後、長さ20mm、展開葉3枚に調整し移植体とした。

3) 培地条件： 基本培地ではMS及び½MSとし、その単独、及びNAAを0.1又は0.01 mg / l を加用し、6試験区を設定した。なお、果糖1%、寒天0.6%、pH5.6とし、管瓶に10mlずつ分注後に滅菌処理した。

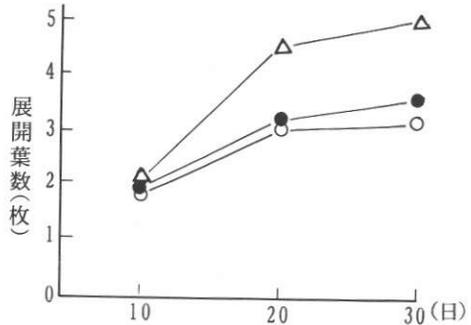
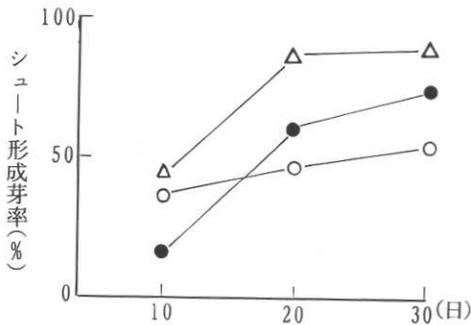
4) 培養条件： 試験-1に同じ。

#### 3 結果及び考察

##### (1) 試験-1

培養日数の経過とともに、培地条件による発育程度に差が見られた。その中で、シュート形成芽率が高く、展開葉数が多かったのは、BA+NAA加用培地であった。

培養30日目における、各区のシュート形成個体の特徴は、



○: MS+BA ●: MS+NAA △: MS+BA+NAA

図1 培地条件によるシュート形成及び展開葉数の推移

BA加用培地では茎部のカルスが多く、シュートはやや短か目で、展開葉の中に葉身葉脈の肥厚、小形の細長い葉等の病徴とは別の異常葉<sup>1)</sup>を持つ個体も見られた。NAA加用培地では、茎部のカルスはほとんどなく、シュートが良く伸び、発根した個体が多く見られた。BA+NAA加用培地では、茎部のカルス多く、シュートはやや太目で、複数のシュートが形成された個体もあった。

病徴の発現状況は、各区とも培養20日目では判然としなかったが、30日目には、シュートの上位葉に明らかな縮葉

症状を呈するものが発生した。特に、BA+NAA加用培地で識別可能な個体が多く、逆にNAA加用培地で少なかった。このような病徴発現の差は、病徴が判然としない培養当初においても、茎葉の組織内に明らかな病原 (Mycoplasma-Like Organism) の存在が電顕で確認されている<sup>3)</sup>ことや、従来から圃場レベルで観察されているマスキング現象<sup>2)</sup>とを考え合わせると、何らかの形で、植物生長調整物質が関与しているものとも考えられる。

表1 初代培養における発育と病徴発現 (培養 30日)

培地条件 (mg/l)	発育程度*					Aの			Aの病徴発現程度**			
	A	B	C	その他	A/15 (%)	展開葉数(枚)	発根個体数	カルス形成量	-	+	++	+~++/A (%)
BA 1.0	8	3	3	1	53.3	3.1	0	多	3	3	2	62.5
NAA 0.1	11	2	0	2	73.3	3.5	7	少	9	1	1	18.2
BA 1.0+NAA 0.1	13	0	0	2	86.7	5.0	0	多	3	5	5	76.9

注. \* A:シュートが伸長した個体, B:葉の展開だけの個体, C:ほとんど発育しない個体  
 \*\* -:不発現及び判然としないもの, +~++:病徴発現の軽重 ……縮葉症状による肉眼判定  
 供試数:各区15

(2) 試験-2

培養シュートからの発根は容易で、供試数90のうち72で発根した。その中で、発根数多く根長が長かったのは、基本培地の成分濃度が所定の場合はNAA 0.01 mg/l 加用培地で、1/2濃度の場合はその単独、並びにNAA 0.1及び0.01 mg/l 加用培地においてであった。また、シュート長及び展開葉についても、同様の傾向であった。

培養30日目において、発根個体72のうち、明らかに病徴

識別可能なものは46で、その平均発根数7.2本、平均根長120mmであった。なかには、発根極性の乱れた個体も見られた。MS+NAA 0.01 mg/l, 1/2 MS, 1/2 MS+NAA 0.1 mg/l, 1/2 MS+NAA 0.01 mg/lのどの培地においても、目的とする個体育成が可能であるが、特に、基本培地は1/2濃度とし、NAAの添加量は0.1 mg/lが適するものと考えられた。

表2 継代増殖培養シュートからの発根を促す培地条件と病徴発現 (培養 30日)

培地条件 (mg/l)	発根 個体数	発根数 (本)	根長 * (mm)	発根極性の 乱れた 個体数	発根個体の		発根個体の病徴発現程度**			
					シュート長 (mm)	展開葉数 (枚)	-	+	++	+~++ (%)
MS	2	1.0	22	0	21	4.0	1	1	-	50.0
+NAA 0.1	15	7.1	77	0	27	5.9	10	5	-	33.3
+NAA 0.01	12	5.8	125	2	41	9.7	4	4	4	66.7
1/2 MS	13	6.6	126	2	39	9.0	3	3	7	76.9
+NAA 0.1	15	7.9	121	5	53	9.9	2	4	9	86.7
+NAA 0.01	15	6.8	120	0	36	8.7	6	6	3	60.0

注. \*:根長は、シュート基部から発生した直根の総長  
 \*\*: -:判然としない, +~++:病徴発現の軽重 ……縮葉症状による肉眼判定  
 供試数:各区15

4 ま と め

クワ萎縮病罹病株の緑色腋芽の培養を試み、病徴発現した発根個体を得るための、培地条件を調査した。

(1)初代培養において、明らかな病徴発現個体が多かったのは、MS+BA 1mg/l + NAA 0.1 mg/l 培地であった。

(2)継代培養シュートからの発根は容易であったが、なかでも、1/2 MS+NAA 0.1 mg/l 培地が適するものと思われた。

なお、病徴発現と植物生長調整物質との関係については、

今後、更に検討を要するものと考えられる。

引用文献

- 1) 岡 成美. 1985.クワにおける芽の分離培養と器管形成に関する研究. 蚕試報 29: 747-852.
- 2) 岡部光波. 1958.桑の萎縮病に関する研究. 第2報 発生地の構造並びにVectorの性質と現段階における防除方法について. 群馬蚕試要報 39: 27-53.
- 3) 大山勝夫, 川北 弘. 1975.クワ萎縮病新梢の茎頂培養について. 日蚕雑 44: 413-414.