

称号及び氏名	博士（緑地環境科学）	Hoang Ngoc Nhung
学位授与の日付	平成29年9月25日	
論文名	Development of a stable and low-cost system for wasabi nursery plants production with photoautotrophic micropropagation (光独立栄養培養を用いた安定で低コストのワサビ苗生産方法の開発)	
論文審査委員	主査 北宅 善昭 副査 堀野 治彦 副査 藤原 宣夫 副査 渋谷 俊夫	

論文要旨

Wasabi (*Wasabia japonica* Matsumura) is a perennial herb belonging to the Brassicaceae family and native to Japan. Its enlarged stem (rhizome) has a hot and pungent flavor. Grated wasabi paste is often used in traditional Japanese foods such as sushi, sashimi, and soba noodles. In Japan, wasabi has not only been considered a food delicacy but also a powerful herbal medicine. Wasabi plants contain the bioactive components such as 6-(methylsulfinyl)hexyl isothiocyanate that shows several biological functions including anti-inflammatory, antimicrobial, antiplatelet, and anticancer. With the increase of wasabi-based food products in the international market and the potential of the use of wasabi in the pharmaceutical industry, it is inevitable that demand will increase. Micropropagation is necessary to create a large number of high-quality wasabi nursery plants with uniform size.

In Asia, wasabi has been propagated through tissue culture for several decades to avoid diseases at the production stage. Most research on wasabi is related to the use of plant growth regulators in both shoot and root development periods. Losses of up to 30%–40% of cultures were due to contamination of microbes. A major challenge of wasabi tissue culture is, therefore, to reduce bacterial contamination. Photoautotrophic micropropagation (PA) with sugar-free medium has many advantages over conventional photomixotrophic micropropagation (PM) with

sugar-containing medium in producing healthy nursery plants. Moreover, the acclimatization stage is often eliminated when plantlets are grown under optimal photoautotrophic conditions.

In this study, development of an alternative method was presented with the combination of PA and an acclimatization step to reduce cost and time for wasabi nursery plants production. The thesis is composed of seven chapters and the contents of each chapter are as follows.

In chapter 1, a general introduction including the overview of *Wasabia japonica*, concepts and background of photoautotrophic micropropagation, and the objective of the study are provided.

In chapter 2, growth and morphology of wasabi plantlets under the influence of the micro-environment in shoot and root zones during PA and PM were investigated comparatively. After 28 days of culture, dry weight, relative growth rate, leaf area, and leaf chlorophyll contents of plantlets in PA were greater than those in PM. The number of leaves did not differ significantly between PA and PM conditions. PA promoted root growth and development with a greater number of roots, root length, root diameter, root fresh weight, root dry weight, and root xylem vessel system. Dissolved oxygen (DO) concentration in PA culture medium sharply decreased after 7 days of culture and then recovered due to cracking of the gellous medium, which positively affected the plantlet growth. In PM culture medium, no significant fluctuation of DO concentration was apparent. The net photosynthetic rates of plantlets in PA were much higher than those in PM and increased with culture time. In contrast, the net photosynthetic rates of wasabi plantlets in PM kept a low and constant value during the culture period. With the presence of gas permeable membranes attached to the vessel lids, the detected vapor pressure deficit was higher in PA than in PM conditions. Higher stomatal density and larger stomatal aperture on the abaxial and adaxial surfaces of the leaves in PM promoted leaf water loss following *ex vitro* conditions. Thus, PA is applicable for producing healthy wasabi transplants.

In chapter 3, wasabi plantlets were grown under photoautotrophic micropropagation conditions using nine temperature regimes by combining day temperatures of 10°C–26°C with night temperatures of 10°C–26°C. After 28 days of culture, optimum temperatures for wasabi growth in PA condition were 18/14 °C, 18/18 °C, and 22/18 °C.

In chapter 4, the growth of wasabi plantlets was investigated using four levels of Enshi nutrient solution (25%, 50%, 100%, and 150%) using an *in vitro* hydroponic culture system for photoautotrophic micropropagation. After 28 days of culture, most of the growth parameters such as fresh weight (FW) and dry weight (DW), shoot/root ratio, and leaf area ratio were highest in wasabi plantlets grown in 50% or 100% nutrient solution. These results indicate that the use of 50% Enshi nutrient solution is suitable for the growth of wasabi plantlets in an *in vitro* hydroponic system.

In chapter 5, the impact of supporting materials on growth and rooting of wasabi in PA micropropagation to eliminate an acclimatization step in the transfer of plant material from *in vitro* to *ex vitro* stage was investigated. In order to reduce the cost of time and energy in the acclimatization stage for *in vitro* wasabi plant production, *in vitro* growth in the PA condition using mainly two kinds of supporting materials, agar and vermiculite, and their *ex vitro* growth on

vermiculite were compared. The study revealed that in all aspects, the plantlets in agar and vermiculite were no significant difference in growth performance, although DO concentration was lower in agar than in vermiculite. In *in vitro* condition, both agar and vermiculite promoted root growth and development. After transplanting to the *ex vitro* condition without the acclimatization stage, plantlets in all treatments survived and grew with no significant differences.

In chapter 6, wasabi plantlets were grown under ambient or enriched CO₂ concentrations and 3 combinations of culture periods *in vitro/ex vitro* stages (14/106, 21/99, or 28/92 days). The growth and morphophysiology of wasabi plants in *in vitro* stage, as well as the subsequent growth in *ex vitro* stage in a greenhouse, were investigated. A low-cost culture vessel for wasabi PA micropropagation was proposed using a plastic bag with the paper membranes. It was clearly demonstrated that wasabi plantlets showed improved growth coupled with an improved photosynthetic performance when cultured under an increased CO₂ condition. The shoot/root ratios of plantlets were lower in enrichment CO₂ condition than in ambient CO₂ condition at all culture periods. The acclimatization step was completely omitted and nursery plants were directly transplanted to the stressful greenhouse condition without acclimatization. The relative growth rate of plants decreased with time over the culture period in *in vitro* stage but that increased in *ex vitro* stage in the greenhouse. This study highlights that a PA system with CO₂ enrichment may be potentially useful for the large-scale and low-cost commercial production of wasabi plants.

In chapter 7, the results of the study in meeting the objectives of the research are summarized and assessed. Recommendations for future work to enhance the effectiveness of using the PA micropropagation for establishing wasabi nursery plants production with a lower cost than the conventional PM micropropagation are presented.

審査結果の要旨

近年、農業、特に施設型植物生産で用いる高品質の植物苗の需要が、世界的に増加傾向にある。組織培養による繁殖、すなわちマイクロプロパゲーション技術は、種子繁殖、あるいは挿し木や株分けなど従来の栄養体繁殖に比べて、同一な遺伝形質のクローン苗を大量生産できるため、その商業的利用が世界的に普及してきている。しかしマイクロプロパゲーションによる培養苗生産のコストは、一般的な種子・栄養体由来の苗生産に比べて高いので、広範な利用はまだ限られている。マイクロプロパゲーションのコストが高いのは、高い人件費、増殖過程における低い成長速度、および順化過程における低い生存率がおもな原因である。

本研究で対象としたワサビは、アブラナ科に属する日本産の多年草であり、その独特の辛味から、伝統的日本食には欠かせない食材である。またワサビは、抗菌、抗炎症などの作用を持つイソチオシアネート類などの生理活性物質を含有する。国際市場での食品や薬剤としてのワサビの利

用範囲が広がるに伴い、その需要は増加しており、従来の種子・栄養体繁殖に替えて、高品質ワサビ苗を低コストで大量生産するためのマイクロプロパゲーション技術の必要性が増している。またワサビ生産時の病害を避けるために、組織培養による無病苗の生産が重要である。従来のワサビ組織培養は、通気性の低い小型培養器および糖・植物成長調整剤・無機養分含有培地を用いて弱光下で無菌的に培養する光混合栄養培養が用いられてきたが、増殖培養時における低成長速度、生理障害、雑菌やバクテリアによる汚染や、順化段階における低生存率などが原因となり、計画的生産が行えず、また培養に長期間を要し、労力やエネルギーコストの軽減が困難である。本研究では、上記の課題を解決するため、従来の光混合栄養培養 (PM) に替えて、糖・植物成長調整剤を含まない無機養分培地を用いた光合成独立栄養 (PA) によるマイクロプロパゲーション技術をワサビ苗の生産に適用し、新たなワサビ苗生産技術を提案した。おもな研究内容を以下に概説する。

1. PA 区、PM 区での成長を比較した。28 日間の培養後、PA 区のワサビ植物体の乾物重および葉緑素含量は、PM 区のそれらの約 1.2 倍となった。特に PA 区の根の長さおよび乾物重は、PM 区の 2 倍となった。PA 区の成長促進は、植物体あたりの純光合成速度の増加に起因していた。また培養器外に出した後、PA 区の植物体では、葉の水損失速度が PM 区の約 1/2 であり、水損失抑制機能を持っていた。その機能は低い気孔密度に起因しており、PA 区の植物は PM 区に比べて、培養器外に出した後の生存率が高くなることを示唆した。以上のように PA 条件の優位性が実証されたため、以降の実験は PA 条件で行った。

2. 明期・暗期それぞれ 10~26°C の範囲の気温を組み合わせた 9 通りの温度処理区を設けた。培養 28 日後の成長・形態は、明/暗期 18/14°C、18/18°C および 22/18°C で同等であった。一般に季節に関わらず一定に設定されている培養室内気温を、季節に応じて変えることにより、空調コストを軽減できる。

3. 従来組織培養で用いられてきた比較的高濃度の無機栄養成分を含む Murashige-Skoog 培地に替えて、一般の養液栽培で用いられる園試処方養液 (標準濃度の 25~150%) を含む培地を用いて培養した。その結果、培養 28 日後の成長は、50、100% 区で最大となった。50% 濃度の園試処方養液を用いた PA 培養では、従来の PM 培養法に比べて、肥料コストを大きく軽減できる。

4. 最適な支持培地の特性について検討するため、従来の組織培養で主に用いられている寒天培地と、保水性・通気性に優れたパーミキュライトを用いて培養した。培養 28 日後の寒天区およびパーミキュライト区の成長は同等であった。パーミキュライト培地内の溶存酸素濃度 (DO) は、培養期間を通して $9 \mu\text{g L}^{-1}$ であったが、寒天培地内の DO は、培養開始後 7 日目に $2 \mu\text{g L}^{-1}$ まで低下し、その後、寒天培地の含水率低下に伴い生じた亀裂により、 $7 \mu\text{g L}^{-1}$ に回復した。寒天は通気性が悪いので、一般の組織培養において根の成長促進には適さないといった報告が多いが、湛水条件でも生育可能なワサビを供試した本研究では、培地の DO 低下は生育を抑制しなかった。なお培養器外に出して 28 日間養液栽培した結果も、各区の成長は同等であった。安価な寒天培地は、コスト低減に有利であると同時に、培地を培養器内に固定できるため、培養体を含む培養器の輸送が容易である。

5. 低コストPAマイクロプロパゲーションの実証試験を行った。ポリプロピレン製の袋に通気のための紙フィルターを取り付けた安価な培養器(換気回数 4.2 h^{-1})を用いてワサビを培養した。培養器周辺の CO_2 濃度は $400\sim 500 \mu\text{mol mol}^{-1}$ (標準 CO_2 区)または $1000 \mu\text{mol mol}^{-1}$ (富化 CO_2 区)とした。培養植物は培養器から出した後、引き続き解放温室内で養液栽培した。培養/養液栽培期間として、3通りの組み合わせ(14/106、21/99または28/92日、合計120日)を設けた。120日後の富化 CO_2 区の植物体乾物重は、標準 CO_2 区の1.5倍となった。また培養/養液栽培期間については、21/99日と28/92日の最終の成長が同等であったため、培養期間の短い21/99日の組み合わせが、低コスト化に有利であると結論した。

以上、本研究では、今後需要が増大すると予想されるワサビ培養苗の生産において、PAマイクロプロパゲーションの有利性を環境調節学的、植物生理生態学的に実証し、さらに低コスト化に繋がる技術を提言した。これら一連の研究成果は、生物環境調節学、緑地環境科学、さらには農学の発展に大きく貢献すると考えられる。よって、本論文の審査ならびに最終試験の結果とあわせて、博士(緑地環境科学)の学位を授与することを適当と認める。