

## 一般報文

# オタネニンジンカルの幼苗分化に関する 統計学的解析の応用<sup>\*1</sup>

古谷 力・大場利治<sup>\*2</sup>・織田裕比古<sup>\*2</sup>・宮本芳則<sup>\*2</sup>・東辻基明<sup>\*3</sup>・牛山敬一<sup>\*2</sup>

北里大学薬学部

(〒108 東京都港区白金 5-9-1)

<sup>\*2</sup> 日東電工(株)生物化学研究所

(〒567 大阪府茨木市下穂積 1-1-2)

<sup>\*3</sup> 日東電工(株)生産技術研究所

(〒441-31 愛知県豊橋市中原町字平山 18)

(1989年3月17日受付)

(1989年6月19日受理)

オタネニンジン (*Panax ginseng* C. A. Meyer) カルスからの幼苗への再分化のうち、とくにシュートからの発根条件について統計的手法を用いて考察を行った。Murashige and Skoog (MS) 基本培地中の主要無機塩類のうち、発根要因を直交配列実験計画法を用いて選び出した後、主要2要因と発根率の関係をBox-Wilson法を用いて、2次多項近似式でシミュレートした。その結果、MS基本培地から、 $\text{NH}_4\text{NO}_3$ を除き、 $\text{MgSO}_4$ 濃度を185 mg/lとしたホルモンフリーの培地が完全に発根した植物体を得るのに最適であると推定された。この培地で得られた幼植物体は、現在鉢上げし、栽培を試みている。

## 1. 緒 言

オタネニンジン (*Panax ginseng* C. A. Meyer) の根は、古来から薬用人参として漢方薬、健康食品などに広く用いられており、その薬理学的効果も最近明らかにされている。しかし薬用人参の栽培には数年の年月を要し、多くの労力が必要である上、天候、産地、採取時期などにより、その薬効成分に差異のあることが指摘されている。このような問題点を解決する方法の一つとして、組織培養による薬用人参の生産の可能性が示され<sup>1-3)</sup>、さらに工業的スケールでの大量生産<sup>3,4)</sup>も現在進行中である。

従来の選抜育種法と比較して、植物組織培養を用いる方法は、細胞レベルで扱うことができるので変異細胞を選抜する機会が増えること、さらに、プロトプラスト培養からの再生系の確立ができれば細胞融合や外来遺伝子導入といった直接的な品種改良などが期待できる。しかし、オタネニンジンカルスからの器官形成の報告<sup>5)</sup>はさ

れているが、カルスから効率よく植物体を得るにいたっていない。

今回、著者らは、統計的手法として直交配列実験法およびBox-Wilson法の中心複合計画法を用いて、シュートから発根にいたる過程での主要無機塩類の検討<sup>6)</sup>を行ったので報告する。

## 2. 実験方法

### (1) カルス株の選抜および継代

本実験では、古谷ら<sup>7)</sup>によって誘導された2,4-D要求カルス株をMurashige and Skoog (MS) 基本培地にkinetin 1 mg/lを加えた培地で、2,500~4,000 lux, 16時間/日の照明下で培養選抜して得られた2,4-D非要求のK1カルスを用いた。

このK1カルスは、MS基本培地にindole-3-butyric acid (IBA) 2.0 mg/l, kinetin 0.1 mg/lを加えた培地で、暗所、25℃にて継代培養した。

### (2) シュート分化誘導の方法

暗所で継代培養したK1カルスを、MS基本培地にIBAを含まずkinetin 0~2.0 mg/lの範囲で含む培地に移植し、約3,000 luxの連続照明下、25℃にて培養

<sup>\*1</sup> 本報を“Studies on Plant Tissue Cultures”第65報とする。第64報: Ushiyama, M., S. Kumagai and T. Furuya, 1989. Phytochemistry, in press.

した。

(3) シュートからの発根の検討

① IBA 濃度の検討

シュートを、IBA 0, 1.0, 2.0, 4.0 mg/l および kinetin 1.0 mg/l を含む MS 基本培地に移植し、約 3,000 lux の 12 時間/日の照明下、25℃ にて培養した。

② L8 直交配列実験法<sup>8)</sup>

MS 基本培地中の多くの成分の中から発根に関与する成分を選び出すため、田口の L8 直交配列表<sup>8)</sup>に従って実験を行った。

検討すべき要因数が多い実験の場合、その組み合わせが非常に多くなるのに対して、直交配列表による実験では、少ない実験回数からそれぞれの要因の影響を推定できる。たとえば、L8 直交配列表を用い、4つの要因、それぞれを2水準とした場合、8回の実験で4つの要因の水準間の比較ができる。

今回の L8 直交配列実験では、MS 基本培地中の NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 濃度、KNO<sub>3</sub> 濃度、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 濃度、MgSO<sub>4</sub> 濃度の4要因について、Table 1 の8条件で行った。4要因の水準の設定にあたっては、予備実験において MS 基本培地の 1/2, 1/5, 1/10 の濃度の培養で、1/2 MS の試験区において MS 基本培地よりも発根を促進するような傾向が見られたため、MS 基本培地よりも低い濃度に重点をおいた。

各条件は、それぞれ 18 個のシュート塊で実施した。

用いたシュート塊は kinetin 0.2 mg/l を含む MS 基本培地で培養して得られるシュート塊で、本数 2~3 本のものを用いた。

培地中には、植物ホルモンは含まず、25℃、12 時間/日の照明下、4 週間培養を2回にわたり行い、8 週目のシュート塊を評価に用いた。発根率は、18 個のシュート塊中、発根して根の長さが 3 mm 以上になったものの数の割合で示した。

③ Box-Wilson 法<sup>9)</sup> による検討方法

Box-Wilson 法は、統計学者 Box と化学者 Wilson によって最初に発表された統計手法<sup>9)</sup>であり、最適条件探求のための実験計画法として利用されている。この実験方法を用いると、少ない実験回数で目的とする回帰式(2 要因の場合は、2 次多項近似式となる)が得られ、結果は等高線を用いた応答面として描くことができる。この結果、要因間の相互関係がよくわかり、実用的な要因の水準範囲がよくわかる、等高線の間隔で各要因の変化による目的特性の安定性がわかるなどの利点がある。

以下の実験では、MS 基本培地から NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> を除いた培地を基本とし、主要 2 要因 (KNO<sub>3</sub> 濃度と MgSO<sub>4</sub>

濃度)を Table 2 に示したように割り付け、1 条件につき 18 個のシュート塊で実施した。培養条件および使用材料は L8 直交配列実験の時と同様とし、各条件の発根率を求め、解析を行った。データの解析<sup>9)</sup> および等高線図の作成にはコンピューターを使用した。

3. 結果および考察

(1) シュートの分化誘導と初期発根

K1 カルスからのシュートの形成については 0.2 mg/l の低濃度の kinetin 存在下で形成率 75% と好結果が得られた (Fig. 1)。

K1 カルスから得られたシュートの発根条件を IBA と kinetin の組み合わせで検討したところ、いずれの検討区でも発根率 50% 前後で根の誘導が見られた。しかし、根の長さは 3 mm 以下で、その成育は見られなかった。さらに、培養終期には基部のカルス部分の増殖が激しくなり、シュートの成育、維持の障害となった。

以上の結果から、ホルモンフリーの条件下で主要無機塩類の組成を変えることにより、発根の誘導、成育をさせるため、L8 直交配列に基づく実験を行った。

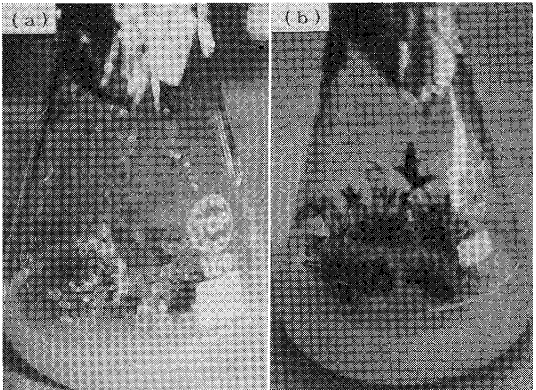


Fig. 1. Primordia (a) induced from the callus and shoots (b) derived from the primordia.

Table 1. Effects of chemicals on root formation.

No.	Concentration (mg/l)				Root formation (%)
	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	KNO <sub>3</sub>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	MgSO <sub>4</sub>	
1	1650	1900	250	370	0
2	1650	1900	85	125	28
3	1650	125	250	125	33
4	1650	125	85	370	6
5	0	1900	250	125	33
6	0	1900	85	370	28
7	0	125	250	370	6
8	0	125	85	125	0

## (2) L8直交配列実験

L8 直交配列の 8 条件における実験結果を, **Table 1** に示した.

つぎに, **Table 1** のデータについて分散分析を行った (**Table 2**).

分散分析には  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  と  $\text{KNO}_3$  濃度の交互作用 (No. 3 列) および  $\text{KNO}_3$  と  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  濃度の交互作用 (No. 6 列) を取り入れて解析した.

これらの解析結果から, 本実験法における影響の大きい要因としては,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  と  $\text{KNO}_3$  濃度の交互作用,  $\text{KNO}_3$  と  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  濃度の交互作用,  $\text{KNO}_3$  濃度および  $\text{MgSO}_4$  濃度であることが推察された.

交互作用の実態を見ると,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  と  $\text{KNO}_3$  濃度

の交互作用については,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  を含まない場合が,  $\text{KNO}_3$  濃度の影響が大きく 1,900 mg/l の条件のほうがよかった. また,  $\text{KNO}_3$  と  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  濃度の交互作用については,  $\text{KNO}_3$  濃度が 1,900 mg/l の条件で,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  濃度は 250 mg/l より 85 mg/l のほうがよかったが, いずれも高いレベルの発根率を示し, 差は大きくなかった.

データの信頼性は「error」項を見ると, 6.5% であり, データのバラツキや他の要因の影響があっても小さく, 今回実験に選んだ要因の影響を見る上では十分信頼できるものであると考えられた.

以上の解析より,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  濃度が 0 での  $\text{KNO}_3$  濃

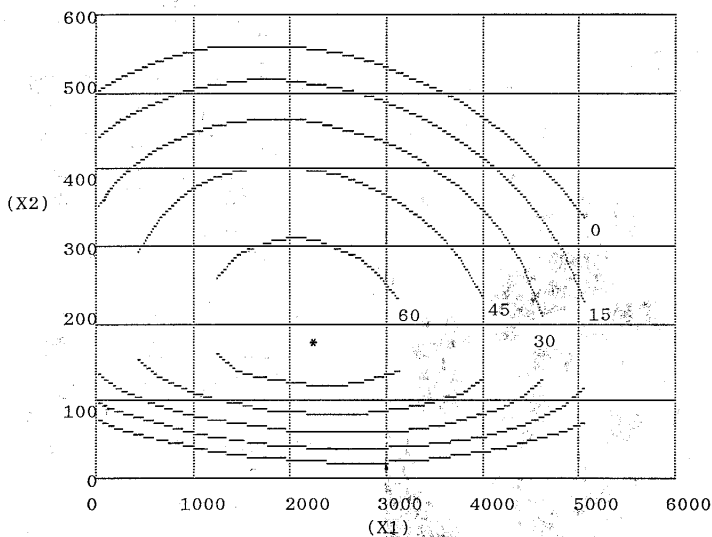
**Table 3.** Effects of  $\text{KNO}_3$  and  $\text{MgSO}_4$  on root formation.

No.	Concentration (mg/l)		Root formation (%)
	$\text{KNO}_3$	$\text{MgSO}_4$	
1	640	79	6
2	3420	79	39
3	640	327	28
4	3420	327	44
5	4000	150	44
6	100	150	56
7	2000	400	56
8	2000	50	28
9	2000	150	61
10	2000	150	78
11	2000	150	61
12	2000	150	61

**Table 2.** Analysis of variance on root formation.

No.	Factor	s. s.	d. f.	m. s.	Fo	Ratio (%)
1	$\text{NH}_4\text{NO}_3$	0	1	0	0	0
2	$\text{KNO}_3$	242	1	242	13.44	14.24
4	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	12.50	1	12.50	0.69	0
7	$\text{MgSO}_4$	364.50	1	364.50	20.24	22.02
3	$\text{NH}_4\text{NO}_3 \times \text{KNO}_3$	544.50	1	544.50	30.24	33.46
6	$\text{KNO}_3 \times \text{KH}_2\text{PO}_4$	392.00	1	392.00	21.77	23.77
5	error	18.01	1	18.01		6.51
Total		1573.5	7			100.00

s. s.=sum of square, d. f.=degree of freedom, m. s.=mean square, Fo=ratio of mean square.



**Fig. 2.** Effects of  $\text{KNO}_3$  and  $\text{MgSO}_4$  on root formation. Numbers in the figure are the rates of root formation.

度、および、 $\text{MgSO}_4$  濃度の発根率に対する影響の大きいことから、この2要因 ( $\text{KNO}_3$  濃度と  $\text{MgSO}_4$  濃度) を選びだし、Box-Wilson 法による検討を行った。この時、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  濃度については、250 mg/l と 85 mg/l のほぼ中間である 170 mg/l (MS 基本培地の  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  濃度と同じ) とした。

### (3) Box-Wilson 法

2 要因 Box-Wilson 法の 12 条件における実験結果を、Table 3 に示した。

統計解析は、発根率について等高線図を計算、作成した。この解析では、極大値は、 $\text{KNO}_3$  濃度 (X 1) が 2,180 mg/l、 $\text{MgSO}_4$  濃度 (X 2) が 194 mg/l で、発根率 (Y) が 67% で、実験範囲のほぼ中心にあり、寄与率 ( $R^2$ ) は 69% であった (Fig. 2)。

また、Fig. 2 の等高線からみると、なだらかな丘のような山であることから、60% 以上の発根率を適正とみると、 $\text{KNO}_3$  が 1,000~3,000 mg/l、 $\text{MgSO}_4$  が 150~300 mg/l とかなり広い適正幅があると推定できた。

以上の結果から、シュートからの発根については、 $\text{KNO}_3$  濃度はほぼ MS 基本培地どおりでよく、 $\text{MgSO}_4$  濃度は MS 基本培地の約 1/2 の濃度が適当と考えられた。

一連の統計解析の結果、カルスからの幼苗の分化誘導、育成に使用する最適培地組成は、カルスからのシュート誘導には従来から用いられている MS 基本培地でホルモンコントロールで誘導してよいが、発根についてはホルモンフリー系で、MS 基本培地から  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  を除き、 $\text{MgSO}_4$  が MS 基本培地の 1/2 の処方の方がよいと推察された。

そこで、MS 基本培地から  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  を除き  $\text{MgSO}_4$  が 185 mg/l のホルモンフリーの条件にて、72 個のシュート塊を培養したところ 61% が発根伸長を示した。



Fig. 3. Transplantation of plants formed *in vitro* to vermiculite in biotron.

また、この処方により、発根誘導中にシュート基部からのカルスの増殖をおさえることができた。

現在、本条件にて発根した幼苗は、鉢上げし (Fig. 3) 栽培の検討を進めている。

植物組織培養における実験では、その対象が植物細胞という高等な生物であるため、評価データの取り方によっては、その実験データにバラツキがでることが多くある。また、未知の要因によって、結果が大きく影響を受けていることも考えられる。こういった状況において、目的とした要因 (今回の場合は無機塩の濃度) の最適化を行うには、定量的に評価できる実験計画法は非常に有効な手段である。

今回の発根の最適化に用いた統計的手法は植物切片からのカルスの誘導<sup>1)</sup>、カルスからのシュート (オウレン<sup>10)</sup>、ケシ<sup>11)</sup>、ワサビ<sup>12)</sup>) や不定胚の誘導 (オウレン<sup>10)</sup>、ワサビ<sup>12)</sup>)、さらにプロトプラスト培養の最適化など組織培養研究のさまざまなステージで用いることが可能であると考えられる。

さらに、統計学的解析を用い少ない実験回数で推察することのメリットは非常に大きいものがある。とくに、植物組織培養研究のようにタイムスケールの大きい実験を行うにあたり、非常に高い効率アップにつながることを期待される。

## 文 献

- 1) 古谷 力, 1988. 薬学雑誌, **108**: 675-696.
- 2) 古谷 力, 1988. 化学工業, **39**: 845-850.
- 3) Furuya, T., 1988. In "Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants" (ed. by Constabel, F., I. K. Vasil), p. 213-234, Academic Press, San Diego.
- 4) 牛山敬一, 1988. 遺伝別冊, No. 1: 112-116.
- 5) Furuya, T., T. Yoshikawa, K. Ushiyama, H. Oda, 1986. Experientia, **42**: 193-194.
- 6) 大場利治, 織田裕比古, 宮本芳則, 牛山敬一, 1987. 第 10 回植物組織培養シンポジウム講演要旨集, p. 223.
- 7) Furuya, T., T. Yoshikawa, Y. Orihara, H. Oda, 1983. Planta Med., **48**: 83-87.
- 8) 上條賢一, 1983. パソコンによる実験計画法入門, p. 1-49, 工学図書, 東京.
- 9) 石川 馨, 藤森利美, 久米 均, 1967. 化学者および化学技術者のための実験計画法 (下), p. 385-416, 東京化学同人, 東京.
- 10) Syono, K., T. Furuya, 1972. Experientia, **28**: 236.
- 11) Yoshikawa, T., T. Furuya, 1983. Experientia, **39**: 1031-1033.
- 12) 古谷 力, 折原 裕, 高木さつき, 吉田淑子, 1988. 植物組織培養, **5**: 82-86.

## Summary

### Application of Statistic Method to Plantlet Regeneration in *Panax ginseng* Callus Culture

Tsutomu FURUYA, Toshiharu OHBA,\* Hirohiko ODA,\* Yoshinori MIYAMOTO,\*  
Motoaki HIGASHITSUJI\*\* and Keiichi USHIYAMA\*

*School of Pharmaceutical Sciences, Kitasato University,  
5-9-1, Shirokane, Minato-ku, Tokyo 108, Japan*

*\* Biochemical Research Laboratory, Nitto Denko Corporation,  
1-1-2, Shimohozumi, Ibaraki, Osaka 567, Japan*

*\*\* Production Engineering Research Department, Nitto Denko Corporation,  
Hirayama 18, Nakahara, Toyohashi, Aichi 441-31, Japan*

Shoots were induced from the calli of *Panax ginseng* C. A. Meyer on a Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with kinetin (0.2 mg/l).

On the basis of the results of L8 orthogonal array experiments,  $\text{KNO}_3$  and  $\text{MgSO}_4$  concentrations were chosen as significant factors in root formation. The effects of  $\text{KNO}_3$  and  $\text{MgSO}_4$  were then simulated by the Box-Wilson method.

This study also demonstrates for the first time that a modified MS medium containing 185 mg/l  $\text{MgSO}_4$  and no  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  or plant growth regulators is optimal for root formation from shoots.

Plantlets grown under the above conditions are now growing well in green house.