

カラジウムの不定芽原基集塊のホモジナイザー 破碎片からの植物体の再生

朱 玉・矢澤 進・浅平 端

京都大学農学部
(〒606-01 京都市左京区北白川追分町)

(1992年7月14日受付)

(1992年9月18日受理)

カラジウム (*Caladium x hortulanum* Birdsey) の不定芽原基集塊をホモジナイザーで破碎し、この破碎片からの植物体の再生及び効率的な大量増殖法について検討を行った。品種‘キャンディダム・ジュニア’の完全に展開した葉身を外植体とし、葉身切片を BA 1.0 mg/l + NAA 1.0 mg/l を含む修正 MS 固型培地で培養し、不定芽原基集塊を誘導した。不定芽原基集塊を無菌的にホモジナイザーで破碎し、大きさ 0.7 ~ 1.5 mm の破碎片を得た。破碎片を生長調節物質を含まない修正 MS 固型培地で培養すると、約 60 日後に幼植物体が再生した。一つの破碎片に形成される幼植物体は 1~数個体で、順化の際に幼植物体を分離することが容易であった。また、破碎片を BA 1.0 mg/l + NAA 1.0 mg/l を含む修正 MS 液体培地で培養すると、不定芽原基集塊が再形成され、この不定芽原基集塊はホモジナイザー破碎片の材料に再び用いることが可能であった。再生した植物体には葉色の変異は認められなかった。

1. 緒 言

カラジウムは熱帯アメリカを原産とするサトイモ科の観葉植物であり、その増殖は主に塊茎の分球、分割によって行われている。しかし、この方法では増殖率が低く、組織培養による大量増殖が有効であると考えられている。Hartman(1974)はカラジウムの茎頂培養によるウイルスフリー株の作出について¹⁾、Sahavacharin(1982)は葉身切片の培養及び再生した植物体の変異について報告した²⁾。朱ら(1984)は組織培養により葉身、葉柄、肉穂花序及び根からの植物体の再生に成功した³⁾。中沢らは茎頂を⁴⁾、河瀬らは葉柄を⁵⁾培養し、カラジウムの組織培養利用による大量増殖についての可能性を指摘した。

組織培養による有用植物の大量増殖の場合、手による外植体の分割には労力がかかり、その改善が望まれている。そこで、最近、ホモジナイザーを利用した外植体の分割方法が提案されている。例えば、シダ類の胞子培養で得られた前葉体^{6,7)}、レタスの胚軸培養で得られた細胞塊⁸⁾及びセントポーリアの花弁培養で得られた細胞塊⁹⁾をホモジナイザーで破碎し、破碎片を培養することにより、数株ずつに分離した多数の幼植物体を獲得でき

ることが報告されている。

本研究では、カラジウムの葉身の培養で誘導された不定芽原基集塊をホモジナイザーで破碎したものから植物体を再生させるとともに、破碎片から不定芽原基集塊の再増殖を行うことで大量増殖が可能となったので報告する。

2. 材料および方法

実験には、カラジウム *Caladium x hortulanum* Birdsey ‘キャンディダム・ジュニア’を供試した。なお、この品種は現在最も多く栽培されているものの一つであり、葉身は白地に脈が緑色となる。5月の中旬に塊茎を直径 12 cm のプラスチック鉢に植え、約 1か月後に完全に展開した葉身を採取した。葉身は中性洗剤で洗った後、水道の流水で 10 分間水洗した。その後、無菌室内で葉身を 70% エタノールに数秒間浸漬し、有効塩素 0.5% の次亜塩素酸ナトリウム溶液で 10 分間浸漬滅菌した。滅菌水で 3 回洗浄した後、主脈を含む 0.5 × 0.5 cm² の切片とし、葉身の表面を上にして寒天培地上に置床した。

基本培地には主要塩類及び鉄源として Murashige・Skoog(1962)の処方¹⁰⁾、微量要素及び有機物として

Table 1. Effects of solid and liquid media on shoot formation from cell clumps.

| BA (mg/l) | NAA (mg/l) | Media | Culture days | % of shoot formation* ¹ | No. of shoots per cell clump | Length of the longest shoot(cm) |
|--------------|---------------|--------|-----------------|---------------------------------------|---------------------------------|------------------------------------|
| 1.0 | 1.0 | Liquid | 60 days | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| 0.0 | 0.0 | Liquid | 60 days | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| 0.0 | 0.0 | Solid | 60 days | 93.0 | 3.5 | 3.0 |

Multiple shoot primordia were homogenized and cell clumps with sizes of 0.7~4.0 mm were cultured on modified MS medium for 60 days. Four flasks were used for cell clumps culture in each treatment and each value indicates the average of the 4 flasks.

*¹ (Number of inoculated cell clumps forming shoots/total number of inoculated cell clumps) × 100

Ringe・Nitsch(1968)の処方¹¹⁾を用い、ショ糖20 g/lを添加した後、pHを5.6に調整した。100 mlの三角フラスコに培地を40 mlずつ添加し、二重のアルミホイルで口を覆った。その後、1.2気圧、120°C、15分間高压蒸気滅菌した。培養は27±2°C、昼光色蛍光灯で照度約3,000 lux、24時間照明下で行った。固型培地とする場合には、寒天8 g/lを添加した。液体培地の場合は10 rpmで振とう培養した。

葉身切片からの不定芽原基集塊の誘導には、BA 1.0 mg/l+NAA 1.0 mg/lを含む固型培地を用いた。培養開始約2~3か月後に形成された不定芽原基集塊をホモジナイザーで破碎し、以下の実験に供試した。

(1) ホモジナイザー破碎片の大きさと破碎片からの不定芽原基集塊の再生

2.0 gの不定芽原基集塊を約0.5 cm角の大きさに調整し、滅菌水を加え、硬鉄製の6枚刃をもつ高速回転のホモジナイザー(NISSEI EXCEL AUTO HOMOGENIZER、カップの径4.0 cm)で無菌的に破碎した。破碎後、ふるいを通して直径0.1~0.7 mm、0.7~1.5 mm、1.5~4.0 mmの破碎片に分け、BA 1.0 mg/l+NAA 1.0 mg/lを添加した液体培地で培養を行った。

(2) 破碎片からの不定芽原基集塊の再形成とシートの形成

不定芽原基集塊をホモジナイザーで破碎後、ふるいを通して直径0.7~4.0 mmの破碎片を集め、1 フラスコ当たり0.5 gを置床し、培養はTable 1に示した3処理区とした。第1は、BA 1.0 mg/l+NAA 1.0 mg/lを含む液体培地で破碎片を60日間培養した処理区；第2は、生長調節物質無添加の液体培地で破碎片を60日間培養した処理区；第3は、生長調節物質無添加の固型培地で60日間破碎片を培養した処理区とした。固型培地の場合、破碎片を置床後、少量の滅菌水を添加して破碎片を寒天の表面上にほぼ均一に分散させた。なお、1処理区につき4 フラスコを供試した。

つぎに、0.7~1.5 mm及び1.5~4.0 mmの破碎片を

各0.5 gずつ固型培地上に置床し、培養開始後60日目に、3 フラスコについて再生した幼植物体の本数を調査した。

(3) ホモジナイザーの回転数と破碎片の大きさ

一定の大きさの破碎片をより多く得るために、ホモジナイザーの回転数と破碎時間について検討を行った。回転数は1,000, 5,000, 10,000 rpmとし、破碎時間は1,000 rpm及び5,000 rpmについては15秒1回あるいは15秒2回の破碎とした。また、10,000 rpmでは15秒1回のみ破碎を行った。破碎後、作成した破碎片の大きさについて調査した。

(4) 再生した植物体の葉色の変異

不定芽原基集塊の手による分割法で再生した植物体とホモジナイザーによる破碎片の培養より再生した植物体を培養容器から取り出し、ミスト室で順化した。順化後、幼植物体を本葉4~5枚時に、直径12 cmのプラスチック鉢に植え替え、ビニルハウス内で栽培した。夏期の高温期を経過した順化開始約5か月後に、植物体は塊茎で繁殖されたものと同様の草丈となり、葉身の斑が安定して現れた。これらの植物体について、塊茎で繁殖したものとの品種の植物体と比較し、葉色の変異調査を行った。

3. 結 果

Fig. 1にBA 1.0 mg/l+NAA 1.0 mg/lを含む固型培地で培養開始60日後に葉身切片より形成された不定芽原基集塊を示した。

(1) ホモジナイザー破碎片の大きさと破碎片からの不定芽原基集塊の再生

破碎片は培養開始後約7日に淡褐色となり、枯死する個体が多くみられた。培養開始10日目頃から、一部の破碎片に肥大が認められ、14日目には直径5.0 mm以上の黄緑色の細胞塊となった。生存率は破碎片の大きさによって異なり、0.1~0.7 mmの破碎片は枯死するものが多く、0.7 mm以上の破碎片に比べて大きな細胞塊となる率はきわめて低かった(Fig. 2)。生き残った破碎片は培養開始後2か月ぐらいで破碎前の不定芽原基集

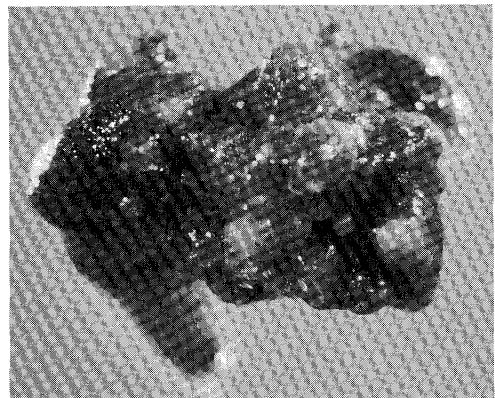


Fig. 1 A multiple shoot primordium formed *in vitro* after 60 days culture of leaf blade on modified MS solid medium supplemented with 1.0 mg/l BA and 1.0 mg/l NAA.

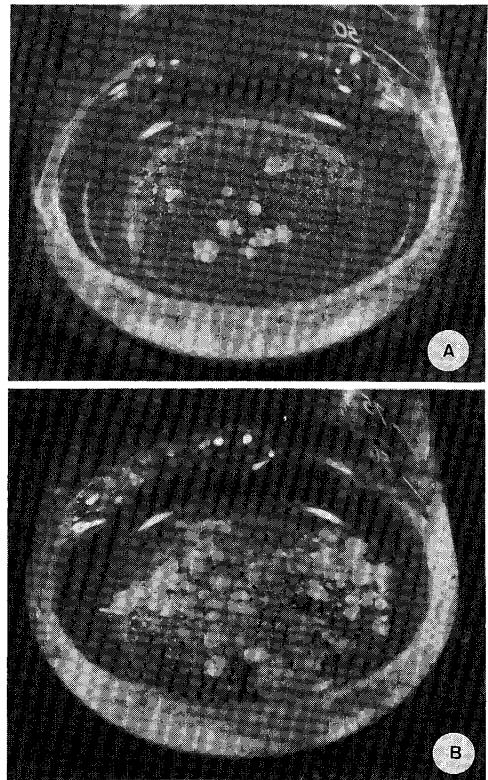


Fig. 2 Multiple shoot primordia formed from cell clumps with different sizes. Cell clumps were cultured in modified MS liquid medium supplemented with 1.0 mg/l BA and 1.0 mg/l NAA for 60 days.
A : Size of cell clumps, 0.1~0.7 mm
B : Size of cell clumps, 0.7~1.5 mm

塊と同じような細胞塊になった。この細胞塊からは不定芽原基集塊と同じ条件でショートが形成された。

(2) 破碎片からの不定芽原基集塊の再形成とショートの形成

液体培地ではショートの形成は認められなかった。BA 1.0 mg/l+NAA 1.0 mg/l を含む液体培地で破碎片を 60 日間培養すると不定芽原基集塊の形成が認められた (Fig. 3-A)。生長調節物質無添加の液体培地では、破碎片からの不定芽原基集塊の形成はほとんど認められなかつた。破碎片を生長調節物質無添加の固型培地で 60 日間培養すると、破碎片から直接ショートの形成が

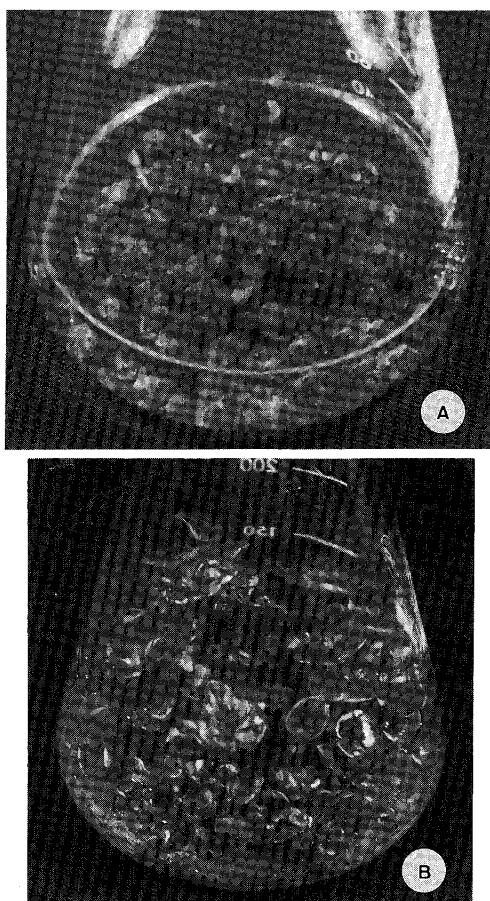


Fig. 3 Formation of multiple shoot primordia or plantlets from cell clumps with sizes of 0.7~4.0 mm. The cell clumps were cultured for 60 days in different media.
A : Modified MS liquid medium supplemented with 1.0 mg/l BA and 1.0 mg/l NAA.
B : Modified MS solid medium without growth regulator.

Table 2. Number of plantlets regenerated from homogenized cell clumps with different sizes.

| Size of cell clumps (mm) | No. of plantlets in each length per flask | | | | Total no. of plantlets per flask |
|--------------------------|---|------------|------------|---------|----------------------------------|
| | 0-1.0 cm | 1.0-2.5 cm | 2.5-4.0 cm | 4.0 cm- | |
| 0.7-1.5 | 12(5.1) | 180(76.9) | 40(17.1) | 2(0.9) | 234 |
| 1.5-4.0 | 15(11.7) | 97(75.8) | 13(10.2) | 3(2.3) | 128 |

Cell clumps with different size were cultured on modified MS solid medium for 60 days. Total weight of cell clumps was 0.5 g in each culture. Figures in parenthesis indicate percentages. Three flasks were used for plantlet formation in each size of cell clumps and each value indicates the average of the 3 flasks.

認められ、93.0%の破碎片からシートが形成された (Table 1, Fig. 3-B).

大きさの異なる破碎片について、再生した幼植物体の数及び幼植物体のシート長別の割合を Table 2 に示した。破碎片の大きさの違いにかかわらず、培養開始後 60 日目では、再生した幼植物体では草丈が 1.0~2.5 cm のものが最も多く得られた。その割合は 0.7~1.5 mm の破碎片では 76.9% であり、1.5~4.0 mm の破碎片では 75.8% であった。また、1.5~4.0 mm の破碎片 0.5 g 当りから平均 128 本の幼植物体が得られ、0.7~1.5 mm の破碎片 0.5 g からは平均 234 本の幼植物体が得られた (Table 2)。

ホモジナイザーで破碎せずに不定芽原基集塊から幼植物体を直接再生させると、多数の幼植物体が集まった塊となり、順化に際し、幼植物体の分離が大へん困難であった (Fig. 4-A)。破碎処理を行うと、一つの破碎片に形成される幼植物体は 1~数個体となり、順化の際に、幼植物体を分離することが容易であった (Fig. 4-B)。

(3) ホモジナイザーの回転数と破碎片の大きさ

(2) の実験結果から、0.5 g 当りでは、0.7~1.5 mm の破碎片からの幼植物体の再生数が 1.5~4.0 mm の破碎片の 2 倍近くとなった。このため、0.7~1.5 mm の破碎片をより多く得るため、ホモジナイザーの回転数と破碎時間について検討を行った。その結果、1,000 rpm では破碎時間にかかわらず 1.5 mm 以上の破碎片の収量が多くかった。5,000 rpm の場合、15 秒間 1 回の破碎処理では 0.7~1.5 mm の破碎片の回収率は 41.5% であり、15 秒間の 2 回処理では、同様な大きさの破碎片の回収率が 64.0% と高くなかった。0.7~1.5 mm の破碎片の収量が最も高かったのは、10,000 rpm 15 秒間 1 回の破碎処理であった (Table 3)。

(4) 再生した植物体の葉色の変異

幼植物体はほぼ 100% が活着した。不定芽原基集塊より直接再生した 109 個体の植物体及び破碎片の培養より再生した 72 個体の植物体とともに、葉色の変異は認めら

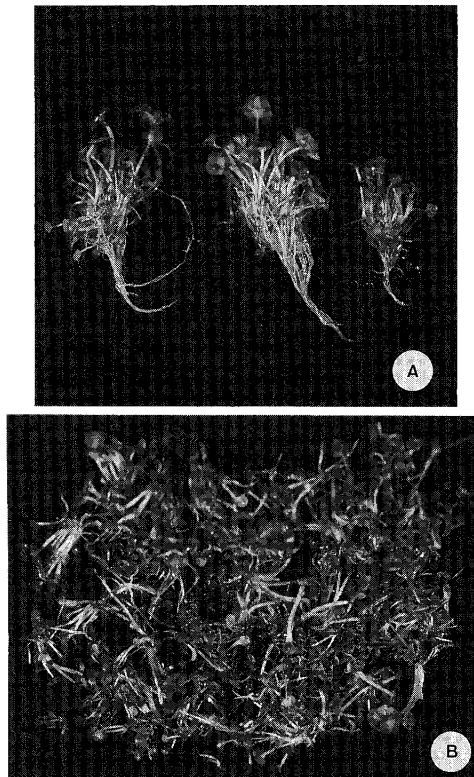


Fig. 4 Plantlet regeneration from segments of multiple shoot primordia prepared by hand (A) and homogenization (B). In (A), multiple shoot primordia were separated by hand. In (B), multiple shoot primordia were treated by homogenizer and cell clumps with sizes of 0.7~4.0 mm were collected. (A) and (B) show the results after culturing for 60 days on modified MS solid medium without growth regulator.

れなかった。

4. 考 察

Fig. 2 に示すように 0.7 mm 以下の破碎片では、破碎

Table 3. Efficiency of rotational speed and time in homogenization to obtain various sizes of cell clumps.

| Rotational speed (rpm) | Time (sec.) | Yield of cell clumps with each size(g) | | |
|------------------------|-------------|--|------------|------------|
| | | -0.7 mm | 0.7-1.5 mm | 1.5-4.0 mm |
| 1,000 | 15 | 0.00(0.0) | 0.33(16.5) | 1.67(83.5) |
| | 15+15 | 0.00(0.0) | 0.29(14.5) | 1.71(85.5) |
| 5,000 | 15 | 0.00(0.0) | 0.83(41.5) | 1.17(58.5) |
| | 15+15 | 0.20(10.0) | 1.28(64.0) | 0.52(26.0) |
| 10,000 | 15 | 0.04(2.0) | 1.75(87.5) | 0.21(10.5) |

In each homogenization 2.0 g of multiple shoot primordia was used. Yield with different size of cell clumps was measured by weight and figures in parenthesis indicate percentages.

片を培養する過程で枯死するものが多く、0.7 mm 以上の破碎片を用いることが必要であると思われた。

Table 1 の結果から BA 1.0 mg/l + NAA 1.0 mg/l を添加した液体培地は不定芽原基集塊の再形成に有効であるが、シートの形成は抑制した。一方、シートの形成及び伸長には生長調節物質無添加の固型培地が最適であった。

破碎片 0.5 g 当りのシートの形成数については、0.7~1.5 mm の破碎片では 1.5~4.0 mm の破碎片に比べシートの数が約 2 倍となった (**Table 2**)。したがって、シートをより多く得るために、0.7~1.5 mm の大きさの破碎片を用いることが最適であると思われた。

ホモジナイザーの回転数と破碎時間についての結果 (**Table 3**) から、固型培地上でシートを形成させる場合には、不定芽原基集塊を 10,000 rpm 15 秒間の破碎処理をするのが適当であると思われた。

これまでの種苗の大量増殖法で、コスト高となる最も大きな要因は増殖時の継代培養及び順化時の培養体の手による分割であり、大量増殖された植物体の価格のうち 70~80% は労働費であるとされている¹²⁾。細胞懸濁培養による体細胞不定胚形成は、大規模な増殖において労力の減少につながる。しかし、体細胞不定胚を形成する植物は現在限られており、しかも、再生した植物体には変異個体の出現が少なくない¹³⁾。

カラジウムでは不定芽原基集塊の破碎片の大きさを 0.7~1.5 mm とすれば、破碎片 2.0 g から約 1,000 個体の幼植物体の再生が可能である。破碎片由来の幼植物体は、不定芽原基集塊から直接再生した個体に比べ、1 個ずつ分離する手間が省け、順化の操作が大へん容易であった。また、破碎片から再生した植物体には葉色の変異が認められなかった。

以上のことから、カラジウム ‘キャンディダム・ジュニア’ のホモジナイザーによる破碎片を利用した大量増

殖のシステム化が可能であると考えられる。その具体的な方法は以下のようである。

品種 ‘キャンディダム・ジュニア’ の展開直後の葉身切片を BA と NAA を含む修正 MS 固型培地で 60 日間培養し、不定芽原基集塊を誘導する。不定芽原基集塊を無菌的にホモジナイザーで破碎し、直径 0.7~1.5 mm の破碎片を回収する。この破碎片を、生長調節物質を含まない固型培地で約 60 日間培養することで幼植物体が得られる。ホモジナイザーによる破碎処理を行う不定芽原基集塊は、BA と NAA を含む液体培地で 0.7~1.5 mm の破碎片を約 60 日間培養することによって得られる。

文 献

- Hartman, R. D., 1974. *Phytopathol.*, **64**: 237-240.
- Sahavacharin, O., 1982. *Proc. 5th Int'l. Cong. Plant Tissue & Cell Culture*, 699-700.
- 朱 至清, 孫 敬三, 陳 維倫, 戸 思聰, 1984. *植物学報 (Acta Botanica Sinica)*, **26**: p. 574-579.
- 中沢慶久, 戸田義宏, 島 拓雄, 1986. *園芸学要旨*, 昭 61 秋 : p. 330-331.
- 河瀬晃四郎, 南 利治, 吉岡麻理, 1990. *園芸雑誌*, **59** (別 1) : p. 528-529.
- Cooke, R. C., 1979. *HortScience*, **14**: 21-22.
- Janssens, J., M. Sepelie, 1989. *Scientia Hort.*, **38**: 161-164.
- 林 万喜子, 真田松吉, 石崎恵一郎, 福岡 寛, 1988. *育雑*, **38** (別 2) : p. 36-37.
- Mølgaard, J. P., N. Roulund, V. Deichmann, L. Irgens-Møller, S. B. Andersen, B. Farestveit, 1991. *Scientia Hort.*, **48**: 285-292.
- Murashige, T., F. Skoog, 1962. *Physiol. Plant.*, **15**: 473-497.
- Ringe, F., J. P. Nitsch, 1968. *Plant Cell Physiol.*, **9**: 639-652.
- Pierik, R. L. M., 1988. *Acta Hort.*, **230**: 63-71.
- Pierik, R. L. M., 1987. In “In Vitro Culture of Higher Plants”, p. 225, Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht.

Summary

Plant Regeneration from Cell Clumps of Multiple Shoot Primordia Fragmented with Homogenizer in Caladium

Yu ZHU, Susumu YAZAWA and Tadashi ASAHIRA

Faculty of Agriculture, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606-01, Japan

Expanding leaves of caladium (*Caladium x hortulanum* Birdsey) cv. 'Candidum junior' were cultured on modified MS medium supplemented with 20 g/l sucrose, 8 g/l agar, 1.0 mg/l BA and 1.0 mg/l NAA. Multiple shoot primordia were obtained after 60 days of culture. The multiple shoot primordia were homogenized aseptically in distilled water for 15 seconds with homogenizer (10,000 rpm). The homogenate was sieved through 4 meshes (0.1, 0.7, 1.5, 4.0 mm pore size) and cell clumps were divided into 3 categories with sizes of 0.1~0.7 mm, 0.7~1.5 mm and 1.5~4.0 mm. Cell clumps with sizes of 0.7~1.5 mm were suitable for plantlet regeneration. Two to three plantlets per cell clump were formed 60 days after the cell clumps were cultured on modified MS solid medium without any growth regulator. However, when the cell clumps were inoculated into modified MS liquid medium supplemented with 1.0 mg/l BA and 1.0 mg/l NAA, multiple shoot primordia were formed from the cell clumps. The multiple shoot primordia could be used as the material for a second homogenization. Leaf color variation was not observed in plantlets regenerated from the cell clumps.