

研究ノート

カイケイジオウ (*Rehmannia glutinosa* var. *hueichngensis*)

葉外植片カルスからの根茎形成と個体再生

索 建政*・豊田秀吉**・細井好之**・大内成志**

アカヤジオウ(赤矢地黄)やカイケイジオウ(懷慶地黄)の根は古くから生薬として漢方医薬に利用されているが、最近ではウイルス感染により収量や品質の低下が問題となっている¹⁾。このような問題点を解決するため、アカヤジオウでは、すでに組織培養技術が応用され、莖頂培養によるクローン増殖²⁾や葉外植片から誘導したカルスからの個体再生³⁾に成功している。他方、カイケイジオウでは今までのところそのような報告がなされておらず、細胞工学的手法を応用してウイルスフリー株や高品質系統を作出するためには、まず、その組織培養系を確立することが必須である。このような観点から、本論ではカイケイジオウ葉由来カルスの組織培養系を検討し、根茎形成および個体再生に適した培養条件を明らかにした。以下にそれらの結果を報告する。

本研究では、カイケイジオウ (*Rehmannia glutinosa* var. *hueichngensis*) の根茎(長さ 25~30 cm)を長さ 3 cm に切断し、土壤に定植して、ガラス温室内で約 1 ヶ月間栽培した。新葉が 4~5 枚展開した時点で上位 2 枚の葉を採取し、常法に従って表面滅菌した後、2 cm 平方に切断して葉外植片を作製した。葉外植片の培養には、2,4-D と BAP (6-benzylaminopurin) もしくは NAA と BAP を添加した Murashige-Skoog⁴⁾ (MS) 培地 (pH 5.7, 寒天濃度 0.8%) を用い、温度を 26°C, 照明を 4,000 lux の全日長条件とした。なお、継代培養が必要な場合

には、カルス組織、不定根、shoot などを培養開始 1 ヶ月後に切り出し、それぞれ最初に使用した培地と同一ホルモン組成の培地に移植した。

今回の実験では、まず、0.01, 0.05, 0.1, 0.5 および 1.0 $\mu\text{g/ml}$ の 2,4-D と 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 および 4.0 $\mu\text{g/ml}$ の BAP をそれぞれ組み合わせた合計 40 種類の実験区を設け、カイケイジオウの葉外植片を培養した。その結果、ほぼすべての実験区で、培養 6~10 日後にカルスが誘導され、2,4-D 濃度を 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 以下とした実験区では、カルス組織からすみやかに不定根が形成された。しかしながら、これらの不定根はいずれも細く、その伸長も不十分であった。また、2,4-D と BAP の濃度をそれぞれ 0.05 と 2.5 $\mu\text{g/ml}$ もしくは 0.01 と 3.0 $\mu\text{g/ml}$ とした実験区では、培養 2 週間後に shoot 分化が観察されたが、それ以後の shoot の成長は抑制され、最終的に再分化個体を得ることができなかった。以上の結果から、2,4-D はカイケイジオウの培養、特に再分化 shoot の成長や不定根伸長に不相当と考え、2,4-D を NAA に置き換えた MS 培地で葉外植片を培養した。すなわち、上記濃度の BAP に 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3 および 0.5 $\mu\text{g/ml}$ の NAA を組み合わせた合計 48 種類の実験区で葉外植片を培養したところ、用いたすべての実験区で培養開始 7~10 日後に全ての葉外植片からカルスが誘導され、さらに 3~4 日後にカルス組織から不定根が形成された (Fig. 1-A)。一般に、NAA と BAP を添加した実験区では、いずれの場合も、カルス組織から伸長が良好で太い不定根が誘導されたが、NAA と BAP の濃度をそれぞれ 0.25 と 1.0 $\mu\text{g/ml}$ もしくは 0.2 と 2.0 $\mu\text{g/ml}$ とした実験区では、Fig. 1-B に示すように、培養 1 週間後に不定根の先端部に根茎が形成された。しかしながら、前者の実験区では、発根後 1 週間が経過した時点で、いったん形成された根茎部が再度カルス化し、カルス組織から shoot が形成された (Fig. 1-C)。これに対して、後者の実験区では、培養開始 6~10 日後に多数の根茎(誘導された不

Suo Jian ZHENG*, Hideyoshi TOYODA**, Yoshiyuki Hosoi** and Seiji OUCHI**

Root Formation and Plant Regeneration of Callus Tissues Derived from Leaf Explants of *Rehmannia glutinosa* var. *hueichngensis*.

*北京衛生局臨床薬学研究所
(〒100035 中国北京新街口)

**近畿大学農学部植物病理学研究室
(〒631 奈良市中町 3327-204)

*The Institute of Clinical Pharmacology, Beijing Municipal Health Bureau, Beijing 100035, China

**Faculty of Agriculture, Kinki University, Nakamachi 3327-204, Nara, 631 Japan

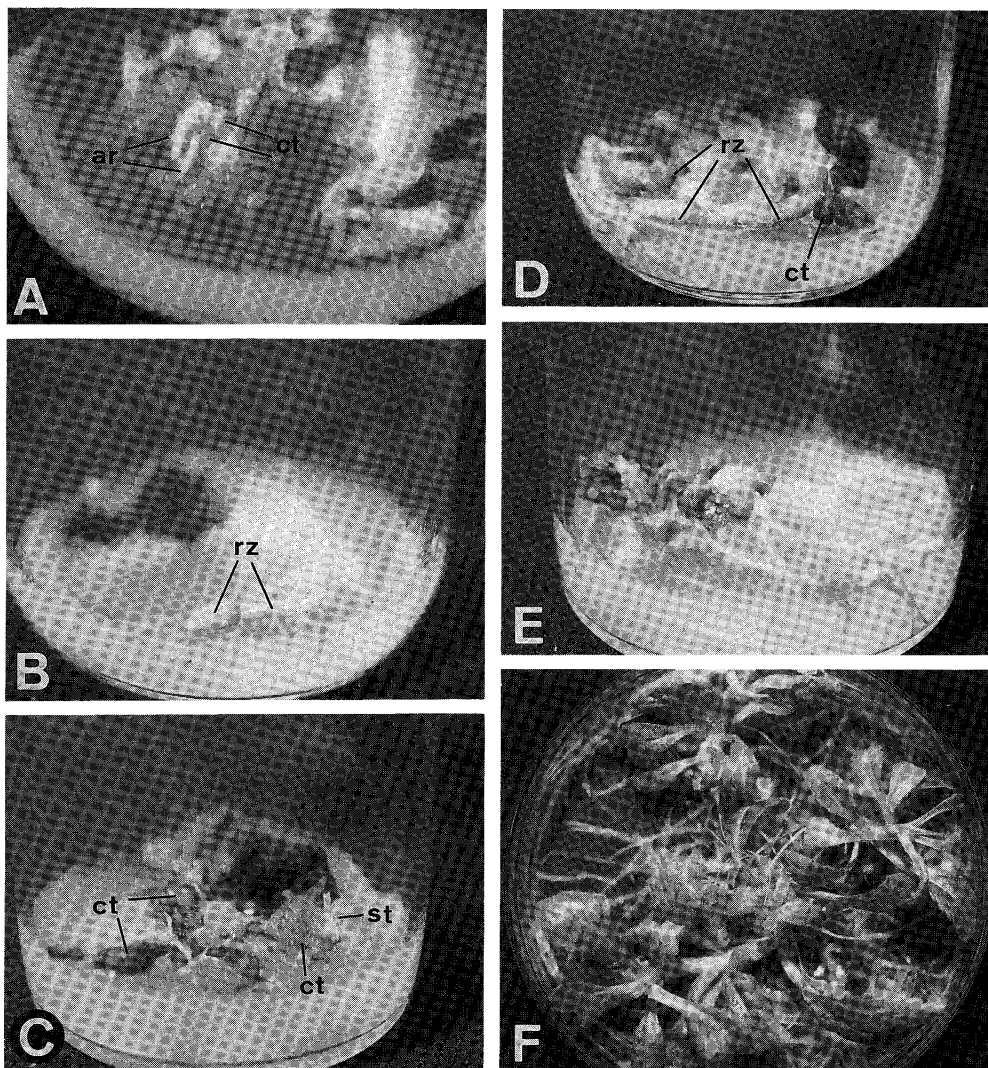


Fig. 1 Rhizome formation and plant regeneration from leaf-derived callus tissues of *R. glutinosa* var. *hueichngensis*.

A : Formation of adventitious roots(ar)from callus tissue(ct)induced on MS medium containing 0. 25 $\mu\text{g/ml}$ NAA and 2. 0 $\mu\text{g/ml}$ BAP, after 6 days of incubation. B : Formaion of typical rhizome (rz)at the tip of adventitious root on MS medium containg 0. 25 $\mu\text{g/ml}$ NAA and 1. 0 $\mu\text{g/ml}$ BAP, after 10 days of incubation. C : Secondary induction of callus tissues(ct)from adventitious roots and rhizomes and formation of shoot(st)from secondarily induced callus tissues on MS medium containing 0. 25 $\mu\text{g/ml}$ NAA and 1. 0 $\mu\text{g/ml}$ BAP, after 12 days of incubation. D : Hypertrophic growth of rhizome(rz)produced from callus tissue(ct)on MS medium containing 0. 2 $\mu\text{g/ml}$ NAA and 2. 0 $\mu\text{g/ml}$ BAP, after 21 days of incubation. E and F : Plant regeneration from callus tissues on MS medium containing 0. 15 $\mu\text{g/ml}$ NAA and 2. 5 $\mu\text{g/ml}$ BAP, after 15 days and 30 days of incubation, respectively.

定根の50~60%)が形成され、その後1ヶ月培養を継続しても、根茎が誘導時の2~3倍(3~5cm)に肥大成長したのみで(Fig. 1-D), shootの分化は観察されなかった。一方、0.15 $\mu\text{g/ml}$ のNAAと2.5 $\mu\text{g/ml}$ のBAPを添加した実験区では、培養15~20日後に、置床した90%以上のカルス組織からshootが形成され、さらに

数日後には不定根が形成された(Fig. 1-E)。この実験区では、単一のカルス塊(長径1.5~2cm)から3~5本の再分化個体が安定して得られ、以後の培養においても順調に生育した(Fig. 1-F)。以上の結果、カイケイジオウの根茎形成と個体再生には、それぞれ0.2 $\mu\text{g/ml}$ のNAAと2.0 $\mu\text{g/ml}$ のBAPおよび0.15 $\mu\text{g/ml}$ の

NAA と $2.5 \mu\text{g/ml}$ の BAP を添加した MS 培地を最適条件とした。

地黄の組織培養においては、すでにアカヤジオウを用いた Matsumoto ら³⁾の報告があるが、この場合には茎頂培養した再生個体の葉を培養に使用し、2,4-D を単独で用いたときに、カルスから再分化個体をもっとも効率よく得られるとしている。しかしながら、筆者らが行った予備試験の結果では、2,4-D を単独に添加しても、カイケイジオウではカルスが誘導されるのみであった。また、本実験の結果からも明らかなように、2,4-D と BAP を組合わせた場合には shoot の形成が認められたものの、2,4-D に対する反応性が異なり、再分化した shoot の成長に 2,4-D がむしろ抑制的に作用した。このようなことから、本研究では NAA と BAP に注目し、個体再生の最適条件を決定したが、最適条件区で誘導したカルスは、その後同一培地で数カ月継代しても安定した個体再生能を保持しており、多数の再生個体を得ることができた。このように安定した個体再生系が確立されたことは、体細胞変異選抜法などを利用した優良個体の選抜育成が行えることを意味するもので⁵⁾、カイケイジオウ

においても細胞工学的研究の基礎的条件が完備されたものと考えてよい。また、今回の実験では、NAA と BAP の濃度を変更することで、カルス組織から根茎を形成させ、さらにそれらの根茎を肥大成長させることが可能であった。このような根茎が通常の根茎と同一の諸性質を保持しているかどうかについてはなお検討を要するが、本研究で明らかにした培養条件を使用すれば、カイケイジオウにおける根茎分化や薬用有効成分の生合成に関する生理・生化学的研究が可能となり、加えて *in vitro* におけるカイケイジオウの増殖も可能になるものと期待された。

(1992 年 10 月 28 日受理)

文 献

- 1) 正山征洋, 1991. 植物細胞工学, 3: 157-164.
- 2) Shoyama, Y., M. Nagano, I. Nishioka, 1983. *Planta Med.*, 48: 124-128.
- 3) Matsumoto, M., Y. Shoyama, I. Nishioka, N. Irino, 1989. *Phytochemistry*, 28: 2331-2332.
- 4) Murasige, T., F. Skoog, 1962. *Physiol. Plant.*, 5: 473-497.
- 5) 豊田秀吉, 1990. 化学と生物, 28: 12-19.