

研究ノート

日本産ハッカ (*Mentha arvensis*) の
組織培養による大量増殖

河邊誠一郎*・渡邊明美*・渡瀬佳子*・村上公一**・細見和雄***

近年, 組織培養によって種々の植物が大量に増殖されている。そのような中で, 揮発性成分のような精油成分を含有する植物の増殖に関しては, カルスからの植物体の安定増殖と二次代謝産物の生産は困難であると報告されている¹⁻⁴⁾。

この点に対し, Sakamura ら⁵⁾はショウガの茎頂からの多芽体形成, Hamada ら⁶⁾はカワラヨモギの苗条原基形成により, 安定大量増殖を試みている。

Mentha 属植物に関しては, Rech と Pires による腋芽を出発材料とした栄養繁殖の報告⁷⁾が見られるが, これらはいずれもその増殖効率も低い。この他に, ハッカ培養カルスを出発材料とした効率的で迅速な器官および植物体の大量増殖法は見られない。

本報告では, *Mentha* 属緑色カルスの安定増殖法を確立するとともに, 不定根・不定芽の大量増殖および幼植物体再生の確立について検討した結果を示した。

供試材料として岡山県産の日本ハッカ (*Mentha arvensis* L.) の若葉を用い, 70% エチルアルコールに10秒, 続いて有効塩素1%の次亜塩素酸ナトリウムに5分間浸漬することで消毒を行った。これを無菌水で十分洗浄したのち, 1-ナフタレン酢酸 (NAA), 6-ベンジ

ルアミノプリン (BAP) および3%シュクロースを含む Gamborg B5⁸⁾ (B5) ジェランガム固形, および液体培地中で培養した。

培養培地は pH 5.7 に調整し, 25 °C, 連続蛍光灯照明下 (2500~5000 Lux) で培養した。以下, 結果について述べる。

Mentha 属植物の場合, 外植体から得られたカルスを, 栄養素およびホルモンだけの調整によって単純な培養を行っても, その成長は概して悪く, 不安定である。また, 再分化の確立も困難なうえ, 長期間を要する。そこで, *Mentha* 属植物のより安定で, 迅速な大量培養および増殖条件を検討し, 以下のような培養系を確立した。

即ち, B5 固形培地を用い, NAA 濃度を調整して, 大量の不定細根誘導条件 (NAA : 4 ppm) (Fig. 1-a) を見いだした。

次に, これを液体培地中, NAA : 2 ppm, BAP : 0.5 ppm 存在下, 80 rpm で振盪培養すると, 約1ヶ月後には大量の不定根塊 (Fig. 1-b) を発生させることが出来た。この根を NAA : 0.2 ppm, BAP : 4 ppm を含む液体または固形培地に移すと, 約1ヶ月で緑色カルスが発生 (Fig. 1-c) し, 増殖した。このカルスは低濃度の NAA : 0.1 ppm と高濃度の BAP : 4 ppm ホルモン含有培地にて継代すると, 球状緑色カルスの形態を経て緑色塊状体や不定芽 (Fig. 1-d) へと成長した。同一培地, または NAA フリーの培地で培養を続けるとこれらの培養物は約1ヶ月後には 300 ml フラスコ一杯にまで成長した。

この系は *M. arvensis* や *M. piperita* のような peppermint だけでなく *M. cardica* や *M. spicata* のような spearmint にも有効であった。

前記の方法で調製した不定芽 (新鮮重 1 g) を 4~5 mm 程度に細断し (Fig. 2-a), BAP を 0 から 4 ppm 添加した B5 固形培地で培養した。40 日間の培養で Fig. 2-b~e に示すような様々な形態をした培養物を得た。

Seiichiro KAWABE*, Akemi WATANABE*, Yoshiko WATASE*, Koichi MURAKAMI** and Kazuo HOSOMI***
Mass-propagation of *Mentha arvensis* L. by Tissue Culture.

* 岡山理科大学理学部
(〒700 岡山市理大町1-1)

** 静岡大学農学部
(〒420 静岡市大谷836)

*** 株式会社ロッテ中央研究所
(〒336 浦和市沼影3-1-1)

* Department of Fundamental Natural Science, Okayama University of Science, Ridai-cho, Okayama, 700 Japan

** Department of Horticulture, Shizuoka University, Ooya, Shizuoka, 422 Japan

*** Central Laboratory, Lotte Co. Ltd., Numakage, Urawa, 336 Japan

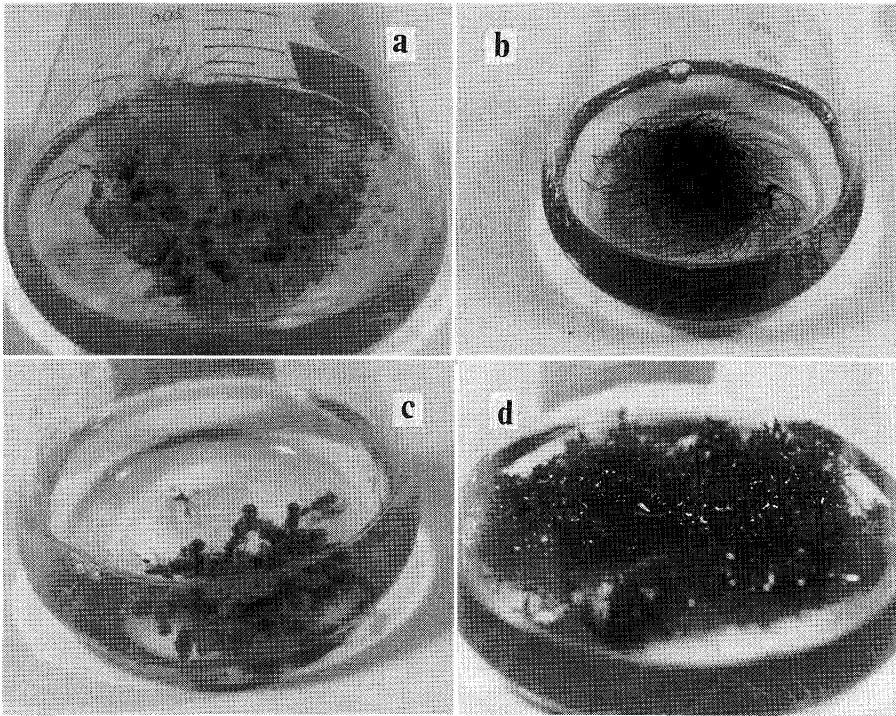


Fig. 1 Mass-propagation of *M. arvensis*.

a : induction of adventitious root and callus,

b : adventitious root culture,

c : induction of green globular callus,

d : induction of adventitious bud.

a and d : static culture, b and c : liquid culture.

成長調節物質を加えない基本培地では、移植した不定芽は完全な植物体に成長した (Fig. 2-b)。これらの植物体は形態上正常であった。

一方、BAP 濃度が高くなるにつれ、植物体の伸長は抑えられ、シュート塊の増殖が認められた。

BAP 濃度 2 ppm 以上で継代培養したものでは、根の発生も抑えられた (Fig. 2-d~e)。しかし、不定芽の本数は逆に著しい増加を示した。これらの不定芽は BAP フリーの培地へ移すと、程なく根を発生させ、全て正常な植物体へと成長した。これまでハッカ植物腋芽増殖において Rech ら⁷⁾は Murashige & Skoog (MS) 培地を用い、カイネチンおよび BAP を添加したとき、シュートおよび不定芽に増殖効果があることを報告している。また Sakamura ら⁸⁾はショウガ茎頂培養による塊茎増殖におよぼす B5 および MS 培地での NAA と BAP ホルモンの効果を述べているが、いずれも植物器官を直接出発材料とするものである。また、植物体の大量増殖の点からは、我々のカルスから不定細根を誘導し、これからカルスを経由して不定芽の大量発生へと導く方法が優れているものと考えられる。この結果を Table 1 にまとめ

た。

不定芽細片 (新鮮重 1 g) の増殖は、本実験条件下で 40 日間培養後には、全ての BAP 濃度区でほぼ等しい 35~38 g を示した。

発生した植物体の平均本数は BAP : 0 ppm では 63 本の幼植物が発生したにすぎなかったが、0.2 ppm で 218 本、4 ppm では実に 397 本の不定芽が得られ、著しい差が現れた。

以上のように B5 固形培地にて誘導した、日本産ハッカの不定根を基に、植物ホルモン NAA, BAP を含む B5 液体培地で振盪培養を行ない、短期間に大量の不定根を発生、増殖させることに成功した。これを、より高濃度の BAP ホルモンを含む B5 固形培地に移植し、高い再生力と安定性を備えた大量の不定芽を迅速に増殖させることにも成功した。

これらの結果より、BAP ホルモンの濃度が *M. arvensis* の植物形態形成の制御に強く関与していることが明らかとなった。

また、この培養系によって、短期間に *M. arvensis* 幼植物を大量増殖させることが可能となった。

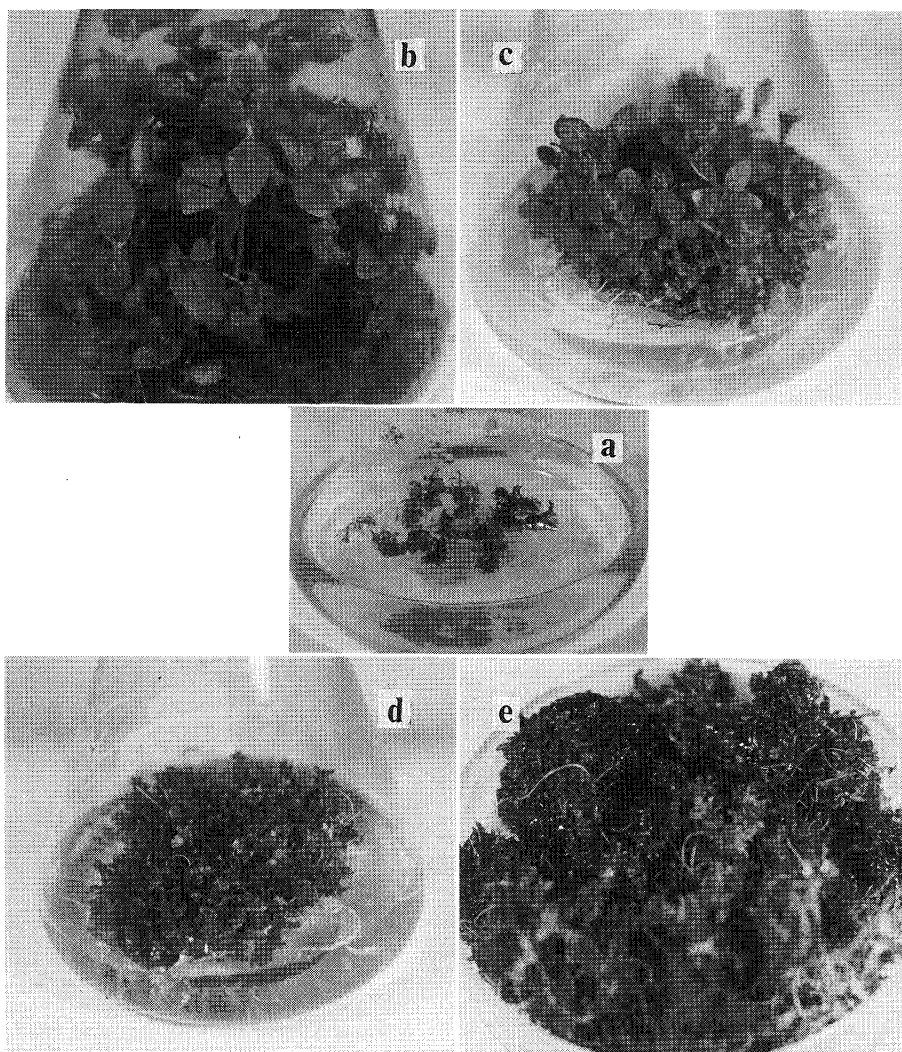


Fig. 2 Mass-propagation from adventitious buds of *M. arvensis*.

a : initial transplants,

b : BAP ; 0 ppm, c : BAP ; 0.2 ppm, d : BAP ; 2 ppm,

e : BAP ; 4 ppm.

Each transplant was cultured for 40 days.

Table 1. Effect of BAP on the growth and morphology of *M. arvensis*.

| BAP (ppm) | Fresh wt. per flask* ¹ (g) | Dry wt. per flask* ¹ (g) | No. of shoots per flask* ¹ | Height of shoot or plantlet* ² (cm) | Root formation |
|-----------|---------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|--|----------------|
| 0 | 35.1±0.5 | 2.91±0.05 | 63±6 | 7~10 | +++ |
| 0.02 | 36.2±0.6 | 2.86±0.03 | 85±11 | 6~8 | ++ |
| 0.2 | 37.2±0.9 | 2.68±0.06 | 218±22 | 2~3 | + |
| 2 | 38.5±1.0 | 2.52±0.09 | 350±18 | 1~2 | ± |
| 4 | 38.0±0.7 | 1.90±0.13 | 397±28 | 1~1.5 | - |

Static culture for 40 days, at 25 °C under fluorescent light (5000 lux).

+++ : vigorous, ++ : moderate, + : slight, ± : trace, - : on formation.

*¹ Values are means±standard errors from at least 3 replicates.

*² Height of shoot and plantlet are shown as the range of approximate value.

ここで呈示したテクニックは、他種ハッカに対しても同様に応用可能であろう。

(1993年1月25日受理)

文 献

- 1) Nabeta, K., Y. Ohnishi, T. Hirose, 1983. *Phytochem.*, **22** : 423-425.
- 2) Witte, L., J. Berlin, V. Wray, W. Schubert, W. Kohl, G. Hofel, J. Hammer, 1983. *Planta Med.*, **49** : 216-221.
- 3) Suga, T., T. Hirata, Y. Yamamoto, 1980. *Agric. Biol. Chem.*, **44** : 1817-1820.
- 4) Nabeta, K., H. Sugisawa, 1982. *Proc. 5th. Intl. Cong. Plant Tissue and Cell Culture*, p. 289-290.
- 5) Sakamura, F., S. Murakami, T. Hirata, T. Suga, K. Taniguchi, R. Tanaka, 1987. *J. Sci. Hiroshima Univ. Ser.*, **A50** : 61-67.
- 6) Hamada, H., T. Hoshino, K. Ohsato, 1991. *Plant Tissue Cult. Lett.*, **8** : 190-192.
- 7) Rech, E. L., M. J. P. Pires, 1986. *Plant Cell Rep.*, **5** : 17-18.
- 8) Gamborg, O. L., R. A. Miller, K. Ojima, 1968. *Exp. Cell Res.*, **50** : 151-158.