

組織培養によるバイカカラマツの大量増殖に関する研究 (第1報)小葉、莖切片と葉柄からのカルス形成条件および 莖切片由来カルスからの植物体再生

貴志文昭*・鏡 勇吉**・小山征男***

*キリンビール株式会社基盤技術研究所・**同 植物開発研究所

(〒329-14 栃木県塩谷郡喜連川町大字早乙女字申塚 3377)

***有限会社 中央植物園

(〒370-35 群馬県群馬郡群馬町引間 345-3)

(1993年5月13日受付)

(1994年4月1日受理)

バイカカラマツ(*Anemonella thalictroides* Spach)の小葉、莖切片および葉柄を外植片として用い、効率的にカルスを得る条件について検討した。その結果、小葉を外植片とした場合、そのまま分割せずにその表を上にして20°C、暗所の条件下で培養するのが最も効率的であった。しかし、カルス形成率は25%と低率であった。一方、莖切片を外植片とした場合、10~15 cmの高さの植物体から径が1.5 mm未満の太さのものを0.5あるいは1 cmの長さでカットし、横に寝かせて置床し、20°C、暗所の条件下で培養するのが最も効率的であった。この時カルス形成率は100%であった。種々の外植片から得られたカルスのうち莖切片由来のカルスの一部を用いて再分化を検討したところ、幼植物体を得られた。得られた幼植物体を市販の山野草土を用いて温室内で順化することで活着することが確かめられた。

1. はじめに

組織培養技術による選抜優良個体の大量生産は各種花卉植物でも商業ベースで実用化されている¹⁾。その一手段として、小葉、莖切片、葉柄等を外植片としてカルスを誘導し、カルスを増殖させた後、不定芽、不定胚等により再分化を図ることはよく知られている。

バイカカラマツはキンポウゲ科に属する一属一種の植物で、北米の明るく開けた草地や丘陵地帯を原産とし、草丈が10~20 cm程度の可憐な観賞用の山野草である。同じキンポウゲ科の植物では、ミスミソウ^{2,3)}やタガラシ⁴⁻⁶⁾などで組織培養による大量増殖の報告例があるものの、バイカカラマツについては全くない。一般的に、バイカカラマツの繁殖方法は、一重咲き種および菊咲き種では種子および塊根分けにより、八重咲き種では採種不可能なため塊根分けによるが、それぞれ一年間に数十株程度および三~四株程度にしか増えず、いずれも短期

間に大量の苗を得るためには組織培養による大量増殖技術の開発が不可欠である。

そこで、バイカカラマツの組織培養による大量増殖に関する基礎的な知見を得るため、まず、白色一重咲き種の小葉、莖切片および葉柄を外植片として用い、効率的にカルスを得るための外植片の調整法や光量、温度等諸条件の検討を行い、さらに、得られた莖切片由来カルスからの植物体再生および順化に成功したので報告する。

2. 材料および方法

(1) 材料の選択

種子繁殖が容易で、比較的均質な材料が同時に、且つ大量に供給出来る点から、白色一重咲き種の開花株を材料に選んだ。

(2) 小葉および葉片からのカルス形成

開花期に白色一重咲き種の株から小葉を採取し、70%エタノール水溶液で30秒、続いて0.05%の界面活性

剤ツイーン 80 を含む次亜塩素酸ナトリウム水溶液(有効塩素濃度 0.5%)で 1 分間浸漬滅菌した後、MS⁷⁾を基本組成とし、これにショ糖 3%、固化剤としてゲルライト 0.2% を加え、さらに植物成長調節物質として BA と NAA を共に 1 mg/l ずつ加えた培地(pH 5.8)に小葉および葉片を置床した。カルス形成の条件として、光量、温度、置床法および小葉から葉片への分割法の 4 項目について検討した。光量の試験では、小葉の表を上にして培地に置床し、20°C の条件下で培養した。光量は 0, 500, 1, 000 および 3, 000 ルックスの 4 段階とし、光周期は明所/暗所が 12/12 hr とした。温度試験の条件は 0 ルックス(暗所)で行った以外は光量のそれに準じた。置床法の試験は、小葉の表を上あるいは下にして培地に置床し、20°C、暗所の条件下で培養した。小葉から葉片への分割法の試験は、温度試験条件の 20°C 下に準じて行った。分割は、主脈に直角の方向で均等に 2, 4 分割および主脈に沿って均等に 2, 4 分割の計 4 種類で行った。

容器として径 9×高さ 2 cm のプラスチック製のシャーレを用い、培地を 20 ml ずつ分注して用いた。1 シャーレあたり 2 枚分の小葉を植え付けた。

(3) 茎切片からのカルス形成

材料の採取、滅菌法および培地組成は、(2)に準じて行った。カルス形成の条件として、太さ、齢、長さ、光量、温度および置床法の 6 項目について検討した。太さの試験は、中齢(植物体長 10~15 cm)の径が 1.5 mm 以上と未満のもので行った。外植片は 1 cm に調整し、培地上に横に寝かせた状態で置床し、20°C、暗所の条件下で培養した。齢の試験は、太さが 1.5 mm 以上の若齢(植物体長 5~10 cm)と老齢(植物体長 15~20 cm)のもので行った。その他の条件は、太さの試験に準じて行った。長さの試験は、太さが 1.5 mm 以上と未満のものを半々で用い、中齢で 0.5, 1.0, 2.0 および 5.0 cm の長さに調整したものをサンプルとした。その他の条件は、太さの試験に準じて行った。光量の試験は、0, 500, 1, 000 および 3, 000 ルックスの 4 段階とし、光周期は明所/暗所が 12/12 hr とした。培養は、太さが 1.5 mm 未満の中齢で 1 cm の長さに調整したものをを用いて暗所の条件下で行った。温度の試験は、20 および 25°C で行い、長さが 1.0 cm のものをを用いた。その他の条件は、長さの試験に準じて行った。置床法の試験は、茎切片をそのまま横に寝かせたものと培地表面に対して垂直になるよう茎切片の半分が培地に埋まるように挿したものとで、20°C の条件下で行った。その他の条件は、温度の試験に準じて行った。

容器は、(2)の試験と同じものを用いた。1 シャーレ

あたり、2 ケの茎切片を植え付けた。また、(2)、(3)共に、置床 5 ヶ月後にカルス形成の有無および形成率について調査を行った。尚、形成率は形成されたカルス集塊の数や量に関係なく、置床した外植片に少しでもカルスが形成されていれば、形成と見なして集計した。

(4) 茎の部位別(上位、下位)および葉柄からのカルス形成

本条件の検討は草丈 15~20 cm の開花期後期の茎および葉柄を用いた。茎切片の材料として径が 1.5 mm 未満の細いものを用い、茎切片および葉柄の切片長を共に 0.5 cm に調整した後、培地上に寝かせて置床し、暗所、20°C の条件下で培養した。

滅菌法および培地組成は(2)に、容器および置床密度は(3)に、データ処理は(2)および(3)に、それぞれ準じて行った。

(5) 茎切片由来カルスの再分化

茎切片由来カルスの一部を MS にショ糖 3%、寒天 0.8% を加えた培地(pH 5.8)に置床することにより植物体再分化を図った。一棒瓶あたり一集塊のカルスを植え付けた。容器としてガラス製の棒瓶(径 5.5×高さ 15 cm)に培地を 50 ml ずつ分注して用いた。培養条件は、光量 5,000 ルックス、光周期は明期/暗期が 12/12 hr および温度は 20±2°C とした。全部で 25 ケのカルス集塊を置床し、再分化処理後 1 ヶ月目に植物体再生の有無について調査した。

(6) 植物体の順化育成

(5)で得られた植物体は市販の山野草土(鹿沼土：軽石土：赤玉土=4：4：2)を用いて温室内で順化した。容器として 3 号の黒色ビニールポットを用い、1 ポットあたり 5~8 株の割合で植え付けた。順化 2 ヶ月後に活着の有無について調査した。

3. 結果および考察

(1) 小葉からのカルス形成

カルス形成は、主脈基部上に認められた。得られたカルスはコンパクトで黄白色であった。特に、非分割の小葉の表を上にして固体培地に置床し、暗所、20°C の条件下で培養するのが最も効率的であった(Table 1)が、形成率は 25% と低率であったうえ、形成度合も小葉の一部がカルス化したのみであった(Fig. 1 左)。また、小葉の表を下にして置床した場合は全くカルス形成が認められなかった。光照射の条件下では、1,000 ルックスの時に外植片の極く一部がカルス化したのみであったことから、光の照射はカルス形成には阻害的であると思われる。

また、小葉の分割は切り口からの褐色を促進し、不適

Table 1. Effects of various conditions on callus formation from leaf explants.

Items tested	Conditions tested	Defined conditions				No. of explants planted	Callus formation rate(%)
		Leaf* ¹ age	Temp. (°C)	Light	Planting* ² method		
* ³ Light intensity (lx)	0	M	20		Face	20	25
	500	M	20		Face	8	0
	1000	M	20		Face	6	17
	3000	M	20		Face	16	0
Temperature (°C)	20	M		Dark	Face	16	25
	25	M		Dark	Face	16	0
* ² Planting method	Face	O	20	Dark		14	14
	Reverse	O	20	Dark		18	0
* ⁴ Cutting method	H4	M	20	Dark	Face	72	0
	H2	M	20	Dark	Face	32	0
	V4	M	20	Dark	Face	48	0
	V2	M	20	Dark	Face	36	6

*¹Leaf age; M: Middle leaf(10~15 cm high plant), O: Old leaf(15~20 cm high plant).
*²Planting method; Face: The face of leaf was on the medium., Reverse: The reverse side from the face was on the medium.
*³Light intensity; Photoperiod: Light/Dark=12/12 hr.
*⁴Cutting method; Leaf was divided into four(H4)or two(H2)pieces for the right angle toward main vein., Leaf was divided into four(V4)or two(V2)pieces for the same angle toward main vein.

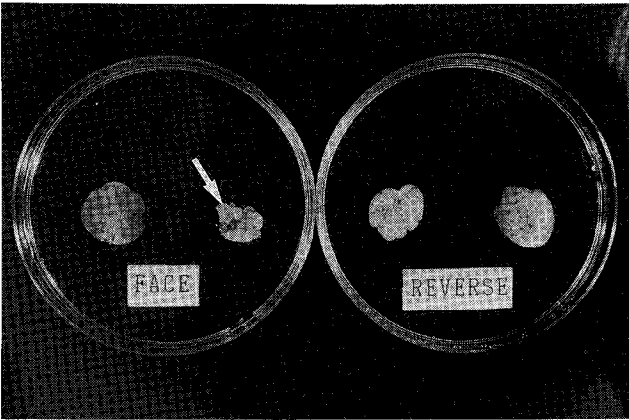


Fig. 1 Callus formation from leaf explants.
FACE; The face of leaf was planted on the medium. REVERSE; The reverse side from the face was planted on the medium.
In a case of the former planting method, callus formation was recognized(The arrow shows the generated callus clusters). On the other hand, in a case of the later planting method, callus formation was not recognized.

当であった(Table 1)。小葉は非常に柔らかいために穏やかな滅菌条件下でも傷み易いうえ、分割して置床すれば切口部分からの褐変が見られ、ひどい場合にはそのまま枯死する現象がしばしば見られた。しかし、今回設定した滅菌条件をより穏やかなものとする培養後にバクテリア等による微生物汚染が多々見られたことから(データ非掲載)、本滅菌法が小葉を外植片とした場合の限

界であると思われた。
外植片切口の褐変はポリフェノールオキシダーゼなどによるものと思われ、これを防止する手段としてポリビニルピロリドンや抗酸化剤であるクエン酸などが使われている³⁾。従って、培養切片の褐変を防止し、延いてはカルス形成率を高めるために、培地にこのような物質を添加することが必要であると思われた。

Table 2. Effects of various conditions on the callus formation in stem culture.

Items tested	Conditions tested	Defined conditions						No. of explants planted	Callus formation rate(%)
		Thickness (mm)	Stem* ¹ age	Temp. (°C)	Light	Length (cm)	Planting* ² method		
Thickness of stems(mm)	1.5≤		M	20	Dark	1	hori.	18	83
	1.5>		M	20	Dark	1	hori.	20	95
* ¹ Stem age	Y	1.5≤		20	Dark	1	hori.	20	75
	O	1.5≤		20	Dark	1	hori.	20	75
Length of explants (cm)	0.5	Half/Half* ³	M	20	Dark		hori.	20	90
	1.0	Half/Half	M	20	Dark		hori.	20	90
	2.0	Half/Half	M	20	Dark		hori.	18	83
	5.0	Half/Half	M	20	Dark		hori.	18	33
* ⁴ Light intensity(lx)	0	1.5>	M	20		1	hori.	20	100
	500	1.5>	M	20		1	hori.	18	83
	1000	1.5>	M	20		1	hori.	16	75
	3000	1.5>	M	20		1	hori.	18	94
Temperature(°C)	20	Half/Half	M		Dark	1	hori.	18	94
	25	Half/Half	M		Dark	1	hori.	20	90
* ² Planting method	vert.	Half/Half	M	20	Dark	1		12	83
	hori.	Half/Half	M	20	Dark	1		9	89

*¹Stem age; Y: Young stem(5~10 cm high plant), M: Middle stem(10~15 cm high plant), Old: Old stem(15~20 cm high plant).

*²Planting method; vert.: planted vertically(Half-length of explants were put into the medium vertically.), hori.: planted horizontally(Explants were put horizontally on the medium.).

*³Half/Half; A half of the explants were more than 1.5 mm in thickness and a half of them were less than 1.5 mm.

*⁴Light intensity; Photoperiod: Light/Dark=12/12 hr.

置床法の試験で小葉の表を上にして置床した場合のカルス形成率が14%と、同一の培養条件である光量試験の0ルクス区および温度試験の20°C区のその25%に比べて低いのは、本試験に使った材料が植物体の先端部分のものが多かった結果、やや展開し切った成熟期をやや過ぎたものであったためであると思われた。

(2) 茎切片からのカルス形成

カルス形成は、茎切片の片側あるいは両側の切片上や旺盛なものでは茎切片全体に認められた。全ての試験区で小葉を外植片とした時よりもかなり高いカルス形成率を示した。茎切片の太さが1.5 mm未満の方が、1.5 mm以上に比べてややカルス形成率が高かった。しかし、太さが同じ1.5 mm以上のものは、若齢と老齢でカルス形成率に差がなかった。この齢の試験では、供試材料数が不足したことから、同時に中齢区を設けることが出来なかったため直接的には判断出来ないものの、中齢のものを用いた以外は同じ培養条件の試験区である太さ、長さ:1 cm区、光量:0ルクス区、温度:20と25°C区および置床法:横植え区の各区のそれに比べて、いずれもより低率であったことから、茎切片は植物体が中齢

のものから採取するのが望ましいと思われた。茎切片長が0.5あるいは1.0 cmの時、カルス形成率は90%と最も高く、5.0 cmになると、2.0 cm以下の時に比べてカルス形成率は著しく低下した(Table 2)。

光量による茎切片からのカルス形成の様子について、Fig. 2に示した。光量が増すのにつれて形成されるカルスはやや褐変気味であり、0~1,000ルクスではカルス形成率は、徐々に低下する傾向にあったが、茎切片は小葉や葉片を外植片とした時に比べて光量が増すのにつれて極端にカルス形成率が落ちることはなかった。また、3,000ルクスでは、カルス形成率が500や1,000ルクスの時に比べて高かったことから、茎切片を外植片とした時の光量は、カルス形成にあまり大きな影響は与えないものと思われた。茎切片は小葉や葉片に比べて硬く、滅菌や光照射によってもそれほどダメージを受けることがなかったためであると思われた。

温度では20°Cが25°Cよりも、置床法では茎切片をそのまま横に寝かせた方が培地地面に対して垂直になるよう茎切片の半分が培地に埋まるように挿したものに比べて、それぞれカルス形成率が高かった。しかし、後者の



Fig. 2 Callus formation from stem explants under various light intensities. upper left; dark (0 lx), upper right; 500 lx, lower left; 3,000 lx, lower right; 1,000 lx. Light illumination inhibited the callus formation. Most vigorous callus formation was observed under dark condition.

Table 3. Effects of explant source on the callus formation.

Explants used	Defined conditions						No. of explants planted	Callus formation rate(%)
	Thickness of stems(mm)	Age* ¹	Temp. (°C)	Light	Length (cm)	Planting* ² method		
Petiole		O	20	Dark	0.5	hori.	140	70
Upper stem	1.5>	O	20	Dark	0.5	hori.	71	94
Lower stem	1.5>	O	20	Dark	0.5	hori.	62	90

*¹Age; O: Old petiole or stem(15~20 cm high plant).

*²Planting method; planted horizontally(Explants were put horizontally on the medium.)

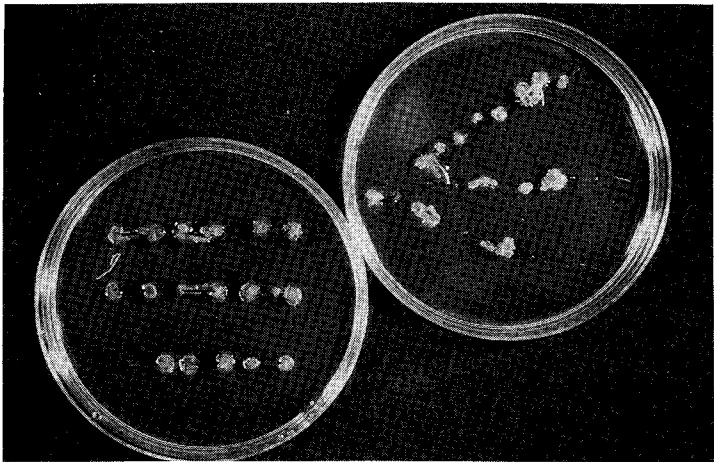


Fig. 3 Callus formation from stem and petiole explants. right; petiole. Sections were aligned with basal ends to the left. left; stem. Sections were aligned with basal ends to the lower left. Vigorous callus formation was observed in stem as compared with petiole explants. Callus formation was more vigorous in upper stem and lower petiole than in lower stem and upper petiole, respectively.

置床法では培地中に埋まった切片側に形成されたカルスがやや水浸状を呈しており、その後の再分化には不適当であると思われた。

光量: 0 ルックス区とほぼ同じ培養条件である長さ: 1.0 cm 区, 温度: 20°C 区, 置床法: 横植え区でのカルス形成率が100%を下回り, それぞれ 90, 94 および 89% であったのは, 材料としてやや不適当と思われる径 1.5 mm 以上のものが半分混じっていたためであると思われた。

以上の結果から, 植物体が中齢で径が 1.5 mm 未満の茎切片を 0.5 cm に調整した後, 横に寝かせて固体培地に置床し, 暗所, 20°C の条件下で培養するのが最も効率的であると思われた。これを確かめるために, 再度本条件で茎切片を 20 個供試して培養したところ, カルス形成率は 100% であった。

(3) 茎の部位別(上位, 下位)および葉柄からのカルス形成

茎切片は葉柄に比べてカルス形成率は高く, 特に, 茎の上位部分で 94% と茎の下位部分や葉柄に比べて高いカルス形成率を示した (Table 3)。茎切片および葉柄からのカルス形成について Fig. 3 に示した。また, 葉柄の上位部分は下位部分に比べてカルス形成率は, やや低かった(形成率に関するデータ非掲載)。

茎切片からのカルス形成率が, 94 あるいは 90% と (2) の 100% をやや下回ったのは, 材料が開花期後期に採取したものであり, 培養に対するレスポンスがやや劣ったためであると思われた。

本試験のように, 各種外植片からのカルス形成の諸条件について同時に, 且つ詳細に検討した例は殆ど見あたらない。Liu ら⁹⁾は, サツマイモの茎由来カルスが葉柄由来や葉身由来のそれに比べて苗条の分化率が高いことを報告しており, 我々の結果とほぼ一致している。従って, カルス形成に最も有効と思われる外植片としての茎を出来ればインビトロの状態でいかに大量に確保出来るかが, 商業ベースでの大量生産を考えるうえでのポイントであろうと思われた。

(4) 茎切片由来カルスからの植物体再生および順化育成

カルス置床後 1 ヶ月して, 92% の高頻度 (23/25) でカルスから幼植物体が再生した (Fig. 4)。再分化は, まず芽が出た後暫くしてから発根する形態で起こったことから, 不定芽経路によるものと思われた。一カルス集塊あたり一乃至数本の割合で再分化した。再生植物体はさらに 1 ヶ月間, 同じ培地上で培養することにより, 草丈 10 cm ほどの順化出来る大きさになった。これを市販の

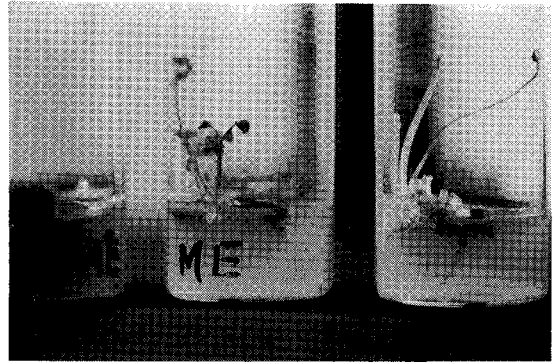


Fig. 4 Plantlet regeneration from stem-derived callus.

This figure shows the plantlets 1 month after planting.



Fig. 5 Acclimated plantlets originated from stem-derived callus.

This figure shows the plantlets 2 months after acclimation.

山野草土を用いて温室内で順化したところ, 2 ヶ月後に活着したことが確かめられた (Fig. 5)。

以上の結果から, 本植物のカルス経路による大量増殖の可能性が示唆された。

謝 辞

本研究を通じて技術的サポートを頂いたキリンビール株式会社植物開発研究所の小久保優子さんに厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) 国重正昭, 1992. バイオサイエンスとインダストリー, 50(7): 27-30.
- 2) 村山 齊, 三位正洋, 1981. 園学要旨, 昭 56 春: 320-321.
- 3) 露木美英, 清水慈史, 中島哲夫, 1989. 玉川大学農学部研究報告, 29: 111-123.
- 4) Konar, R. N., K. Nataraja, 1965. Phytochem., 15: 132-137.

- 5) Nataraja, K., R. Konar, 1970. Acta. Bot. Neerl., **19**: 707-716.
- 6) Konar, R. N., E. Thomas, H. E. Street, 1972. J. Cell Sci., **11**: 77-93.
- 7) Murashige, T., F. Skoog, 1962. Physiol. Plant., **15**: 473-497.
- 8) Hu, C. Y., P. L. Wang, 1983. In "Handbook of Plant Cell Culture Vol. 1" (eds. by Evans, D. A., W. R. Sharp, P. V. Ammirato, Y. Yamada), p. 177-227, Macmillan Publishing Co., New York.
- 9) Liu, Q. C., T. Kokubo, M. Sato, 1990. Japan J. Breed., **40**: 321-327.

Summary

Studies on the Micropropagation of *Anemonella thalictroides* Spach by Tissue Culture

1. Conditions of Callus Formation from Leaf, Stem and Petiole Explants, and Plant Regeneration from Stem-derived Callus

Fumiaki KISHI*, Yuukichi KAGAMI** and Masao KOYAMA***

*Central Laboratories for Key Technology,

**Plant Laboratory, Kirin Brewery Co., Ltd., Kitsuregawa, Tochigi 329-14, Japan

***Chuo Alpine Plant Nursery Co., Gunma, Gunma 370-35, Japan

Efficient method for the callus induction from leaf, stem and petiole explants in *Anemonella thalictroides* Spach was studied. In leaf explants, the most efficient condition for the callus induction was when the face of the whole leaf was placed on the medium and cultured in the dark at 20°C. However, the callus formation rate was only 25%. On the other hand, with stem as explants, the most efficient condition for callus induction was that of 0.5 or 1.0 cm long segments with less than 1.5 mm thickness of stem from a 10~15 cm high plant was put horizontally on the medium and cultured in the dark at 20°C. The callus formation rate was 100%. By using a part of stem-derived callus as material for regeneration, some plants were obtained. These plants were successfully acclimated in a greenhouse using a medium on sale for wild plants.