

一般報文

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2報) 不定芽と不定胚による増殖および 培養由来個体の栽培特性

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7月14日受付)

(1994年4月30日受理)

バイカカラマツ (*Anemonella thalictroides* Spach) の小葉および葉柄を外植片として用いて不定塊根を誘導し、この不定塊根から不定芽あるいは不定胚を経由して幼植物体に再生させる系を確立した。緑色八重花 ('Mrs Brake') の場合、不定芽経由では不定塊根増殖後3ヶ月目で葉柄一切片当たりの幼植物体数は533本であった。不定胚経由では不定塊根増殖後6ヶ月目に不定胚数が最大量に達し、葉柄一切片当たり23,565個であった。さらに、不定胚から幼植物体への再分化には水洗後乾燥する前処理が有効であった。本処理により、再分化率は無処理の5%から27%に向上した。順化後開花した株について栽培特性を調査したところ、不定胚由来の株は不定芽由来や塊根分け由来の株に比べて揃いが良かった。本培養系を利用することにより7品種の増殖が可能になった。

1. はじめに

バイカカラマツの組織培養による大量増殖の可能性について前報¹⁾で報告した。前報では小葉、茎および葉柄を外植片としてカルスを誘導し、このカルスからの再分化と順化について述べた。しかしながら、カルス経由の増殖法ではカルスが得られにくいこと、カルスの増殖性が低いこと、カルスからの再分化頻度も低いこと(データ非掲載)など商業ベースでの大量生産を考えた場合不安がある。また、カルス経由の手法では体細胞レベルでの変異の問題も考えなければならず、もし大量生産株の中に特に花型等に関する変異が多々生じればそれらが有望な形質でない限り、商品や新たな育種素材としての価値が薄れてしまう結果となる。

そこで今回は、小葉および葉柄を外植片とした場合にカルス以外に誘導される不定の塊根に着目して大量増殖の可能性を探った。尚、本報では小葉や葉柄からの塊根

の誘導であるので、得られた器官を以後、不定塊根と呼ぶことにする。大量増殖の系として、(1)液体培地で不定塊根から不定芽を誘導後、幼植物体に再生させる系、(2)液体培地で不定塊根から不定胚を誘導後、幼植物体に再生させる系、の検討をそれぞれ行った。増殖個体の変異については、得られた株を順化育成後、栽培特性を調査することによりチェックした。

2. 材料および方法

今回の試験では各試験項目に応じて計7品種の小葉および葉柄を用いた。外植片の殺菌方法については前報¹⁾に準じて行った。殺菌後の置床法等は以下に行った。

(1) 小葉および葉柄からの不定塊根誘導

淡桃色八重花 ('Cameo'), 濃桃色八重花 ('Shoaff's Double'), 白色一重花 ('White Single'), 白色菊咲花 ('White Semi-Double'), 白色八重花 ('White Double'),

緑色一重花(‘Green Hurricane’)および緑色八重花(‘Mrs. Brake’)の小葉および1 cm長の葉柄切片をMS²⁾にショ糖30 g/l, ゲルライト2 g/lとBA, NAA共に1 mg/lずつ加えた培地(pH 5.8)に小葉は葉の表面を上にして、葉柄は横に寝かせた状態で培地に置床した。容器としてガラス製の円柱型棒瓶(径3 cm×高さ9 cm)を用い、10mlずつ分注してからアルミホイルでふたをして用いた。培養は暗所、20℃の条件下で3ヶ月間行った後に、不定塊根の形成の有無について調査した。また、形成された不定塊根のうち、緑色八重花(‘Mrs. Brake’)の葉柄由来の不定塊根を用いて常法に従って切片観察を行った。

(2) 不定塊根増殖率の品種間差

(1)により得られた淡桃色八重花(‘Cameo’), 濃桃色八重花(‘Shoaff’s Double’), 白色一重花(‘White Single’), 白色菊咲花(‘White Semi-Double’), 白色八重花(‘White Double’), 緑色一重花(‘Green Hurricane’)および緑色八重花(‘Mrs. Brake’)の小葉および葉柄由来の不定塊根を半月毎に継代し、2ヶ月後に不定塊根の生重量を測定し、増殖率の比較を行った。結果は置床2ヶ月後の生重量を初期置床量で割った相対生重量の平均値±標準偏差で表示した。培地は(1)で使用した組成からゲルライトを除去した液体培地を用いた。容器は500 ml容量の三角フラスコに液体培地を100 mlずつ分注し、各フラスコに0.1~0.2 gずつに切り分けた不定塊根の切片を置床してアルミホイルでふたをした。供試フラスコは各品種10本ずつとし、培養条件は25℃, 500 lx(L/D=12/12 hr)とした。培養は振盪培養機(TB 300-L, 回転数90 rpm, 振幅7 cm, 高崎科学器械社製, 川口)を用いて行った。

(3) 不定塊根の増殖期間が不定胚のサイズ別形成数および形状に及ぼす影響

緑色八重花(‘Mrs. Brake’)の葉柄由来の不定塊根を用いた。葉柄からの不定塊根の誘導条件は(1)に準じた。培地は(2)に準じた。比較的高密度の置床量の際、不定胚が出来易い傾向にあった(データ非掲載)ので、1フラスコ当たり7~8 gずつ置床した。容器および培養の条件は(2)に準じた。結果は不定塊根を培地に置床後、4, 6および8ヶ月目に誘導された不定胚数を形状とサイズ別に分類し、それらの合計値で表示した。

(4) 不定胚形成数の品種間差

淡桃色八重花(‘Cameo’), 濃桃色八重花(‘Shoaff’s Double’), 白色一重花(‘White Single’), 白色菊咲花(‘White Semi-Double’), 白色八重花(‘White Double’), 緑色一重花(‘Green Hurricane’)および緑色八重花(‘Mrs. Brake’)の葉柄由来の不定塊根を用いた。葉柄からの不定塊根の誘導条件は(1)に準じた。培地および置床量は(3)に準じた。容器および培養の条件は(2)に準じた。結果は増殖後6ヶ月目に誘導された葉柄一切片当たりの不定胚数の合計値で表示した。

(5) 不定胚からの幼植物体再生に及ぼす前処理の影響

緑色八重花(‘Mrs. Brake’)の葉柄から誘導された不定塊根を増殖させ、6ヶ月目にその表皮細胞から遊離してきたと思われる0.5~0.85 mmの球状胚および心臓型胚を用いた。これらを滅菌したシャーレに入れて上蓋を開けた状態で約1時間クリーンベンチ内で通気乾燥させた乾燥処理胚およびこの乾燥処理の前に滅菌水で3回洗浄した胚および前処理を全く行わない回収したままの胚をそれぞれ85~155個供試し、これらをMS²⁾を基本組成とし、これにショ糖30 g/l, ゲルライト0.2 g/lを加えた培地あるいはさらにBA 0.2 mg/l, NAA 0.02

Table 1. Varietal differences in the formation rate of adventitious tuberous roots from leaf and petiole explants.

Cultivar used	Formation rate of adventitious tuberous root(%)	
	Leaf	Petiole
‘Cameo’	50	40
‘Shoaff’s Double’	30	80
‘White Single’	45	65
‘White Semi-Double’	15	40
‘White Double’	60	65
‘Green Hurricane’	50	65
‘Mrs. Brake’	65	65

Twenty explants of leaf or petiole were planted on the medium for adventitious tuberous roots formation. Data was obtained 3 months after planting.

mg/l ずつ加えた培地(共に pH 5.8)に置床した。置床密度は 20~30 個/容器とした。容器はポリカーボネート製のプラントボックス(縦 6 cm×横 6 cm×高さ 10 cm)を用いた。培養条件は 25°C, 3,000 lx (L/D=16/8 hr)とした。尚、葉柄からの不定塊根の誘導条件および不定塊根の増殖条件とそれからの不定胚の誘導条件は(1)および(2)に準じた。結果は置床後 2 ケ月目に誘導された幼植物体の数と再分化率で表示した。

(6) 不定塊根からの不定芽形成および幼植物体再生

淡桃色八重花('Cameo'), 濃桃色八重花('Shoaff's Double'), 白色一重花('White Single'), 白色菊咲花('White Semi-Double'), 白色八重花('White Double'), 緑色一重花('Green Hurricane')および緑色八重花('Mrs. Brake')の葉柄由来の不定塊根を用いた。不定塊根の増殖後 2 ケ月目に誘導された不定芽を伴った不定塊根を不定胚と分離して回収した後、再分化培地に置床して 1 ケ月目に幼植物体を数えた。結果は葉柄一切片当たりの幼植物体数として表示した。葉柄からの不定塊根の誘導条件は(1)に準じた。不定塊根の増殖培地および置床量は(3)に準じた。再分化培地は(5)で用いた 2 種類のうち植物成長調節物質を含まない方の培地を用い、置床量はプラントボックス当たり 9 集塊の不定芽を伴った不定塊根とした。不定塊根の増殖、不定芽を伴った不定塊根からの幼植物体再生共に、容器および培養の条件は(2)に準じた。

(7) 順化個体の栽培特性調査

緑色一重花('Green Hurricane')および緑色八重花('Mrs. Brake')の塊根分け由来の苗、不定芽由来および不定胚由来の苗を市販の山野草土(鹿沼土:軽石土:赤玉土=4:4:2)を用いて温室内で順化育成し、27 ケ月目に開花率、さらに開花株について草丈、輪数/株、花弁数/輪の項目について調査した。調査個体数は、塊根分け由来株の開花率は 100 個体、不定芽由来および不定胚由来の株の開花率は 2,500 個体、その他の項目については全て 50 個体ずつとした。これらの結果は平均値±標準偏差として表示した。

3. 結果および考察

(1) 小葉および葉柄からの不定塊根の誘導

Table 1 に各品種の不定塊根の形成率を示した。供試した全ての品種の各外植片から不定塊根の形成が認められた。外植片として小葉を用いた場合と葉柄を用いた場合の不定塊根の形成率を比較すると、淡桃色八重花('Cameo')では前者の方が、濃桃色八重花('Shoaff's Double'), 白色一重花('White Single'), 白色菊咲花('White Semi-Double')および緑色一重花('Green Hur-

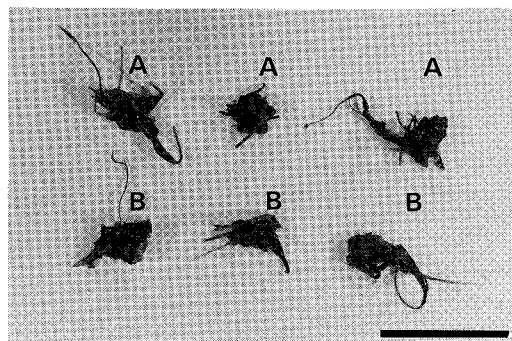


Fig. 1 Adventitious tuberous roots formed on (A) leaf and (B) petiole of 'Mrs. Brake'. Leaf and petiole explants were planted on the MS medium supplemented with 30 g/l sucrose, 1 mg/l BA, 1 mg/l NAA and 8 g/l Agar (pH 5.8). This figure was taken 3 months after planting. The bar shows 3 cm.

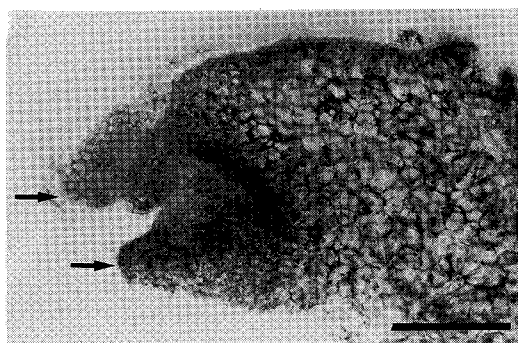


Fig. 2 Sliced segments of adventitious tuberous roots derived from petiole of 'Mrs. Brake'. The arrows show the developing adventitious roots. The bar shows 4 mm.

ricane')では後者の方が、それぞれより高い形成率を示した。また、白色八重花('White Double')および緑色八重花('Mrs. Brake')ではほぼ同等であった。最も高い形成率を示したのは淡桃色八重花('Shoaff's Double')の葉柄(80%)で、最も低い形成率を示したのは、白色菊咲花('White Semi-Double')の小葉(15%)であった。Fig. 1 に緑色八重花('Mrs. Brake')に於ける小葉および葉柄から形成された不定根を含む不定塊根を示した。また、Fig. 2 には葉柄由来の不定塊根の切片を示した。比較的秩序立った細胞群が形成されており、先端から根原基を含む不定根の伸長が観察された。

球根の形態を有する植物体は数多くあり、例えばニンニク⁴⁾、ジャガイモ^{5,6)}、サトイモ⁷⁾等では組織培養による増殖例でそれぞれ小球、塊茎、球茎を形成することが知られているが、これまでに塊根が形成された報告例は

Table 2. Varietal differences in the relative proliferation rate of adventitious tuberous roots derived from leaf or petiole.

Cultivar used	Relative proliferation rate*1/2 months	
	via Leaf	via Petiole
'Cameo'	72±18	18± 2
'Shoaff's Double'	5± 1	16± 7
'White Single'	27± 7	37±13
'White Semi-Double'	35± 1	13± 8
'White Double'	6± 3	10± 5
'Green Hurricane'	48±20	19± 7
'Mrs. Brake'	48±22	71±37

Data show means±SD.
Adventitious tuberous roots(0.1 to 0.2 g/flask) were cultured in the MS liquid medium and subcultured at half month intervals of 3 transfers prior to investigation.
Ten flasks were used for adventitious tuberous roots culture.
*1Fresh weight of proliferated adventitious tuberous roots 2 months after inoculation/Fresh weight of inoculated adventitious tuberous roots derived from leaf or petiole

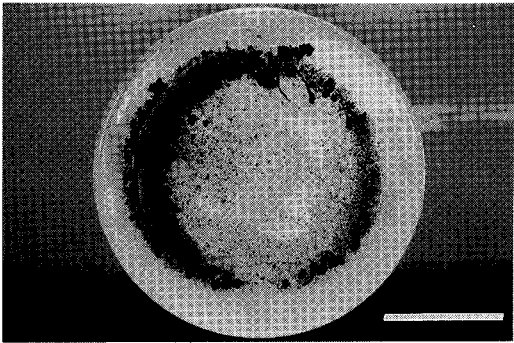


Fig. 3 Proliferation of adventitious tuberous roots in 'Mrs. Brake'. Adventitious tuberous roots were obtained from petiole explants. This figure was taken 1 month after planting with half month intervals of subculture. The bar shows 3.5 cm.

Table 3. Effects of the proliferation period of adventitious tuberous roots derived from petiole on the formation of somatic embryos of 'Mrs. Brake'.

Proliferation period (Months)	Number of somatic embryos/petiole			Total number of somatic embryos/petiole
	0.5 mm≥ Globular	0.5~0.85 mm Globular/Heart	0.85 mm≤ Torpedo	
4	1,026	214	68	1,308
6	18,025	4,664	876	23,565
8	5,711	1,282	341	7,334

Adventitious tuberous roots(7 to 8 g/flask) were cultured in the MS liquid medium and subcultured at half month intervals of 7, 11 and 15 transfers prior to investigation 4, 6 and 8 months after inoculation, respectively. Each value indicates the total number of somatic embryos in 5 flasks.

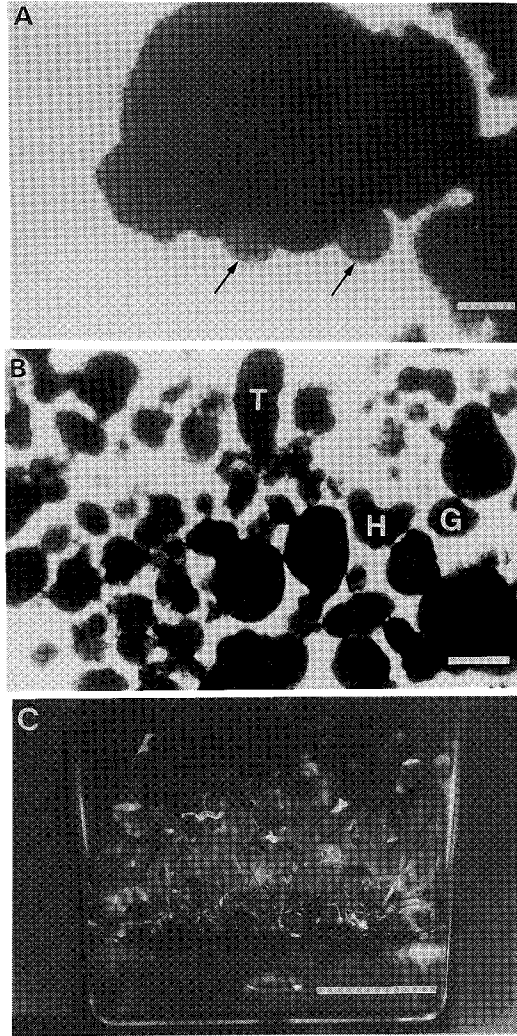


Fig. 4 A: Somatic embryos formed in 'Mrs. Brake'. This figure shows generated somatic embryos from epidermal cells of adventitious tuberous roots 6 months after proliferation of adventitious tuberous roots derived from petiole explants. The arrows show generated embryos. The bar shows 0.2 mm.

B: Various types of somatic embryos formed in 'Mrs. Brake'. This figure shows somatic embryos of globular, heart-shaped and torpedo-shaped stages. Some of them were indicated as the sign of G, H and T, respectively. The bar shows 0.5 mm.

C: Plantlets regenerated from somatic embryos in 'Mrs. Brake' treated with desiccation after washing with distilled water. Somatic embryos derived from the epidermal cells of adventitious tuberous roots from petiole explants were used for this treatment. Vigorous regeneration of plantlets was observed. This figure was taken 1 month after planting. The bar shows 3 cm.

なく、本報が最初であろう。塊根は、根の変態の一つで、異常肥大成長により塊状となり、主に貯蔵器官として澱粉などを貯えるものである⁹⁾。塊根を有する植物として、パイカカラマツの他にダリア、ダイコンなどが挙げられる。

(2) 不定塊根増殖率の品種間差

Table 2 に示したように、淡桃色八重花('Cameo')の

小葉由来の不定塊根で 72 ± 18 倍/2 ヶ月と最高の増殖率を示した。一方、濃桃色八重花('Shoaff's Double')や白色八重花('White Double')の小葉由来の不定塊根でそれぞれ、 5 ± 1 倍/2 ヶ月、 6 ± 3 倍/2 ヶ月と低い増殖率を示した。緑色八重花('Mrs. Brake')では不定塊根の由来に関わらず、比較的高い増殖率を示した(小葉由来: 48 ± 22 倍/2 ヶ月、葉柄由来: 71 ± 37 倍/2 ヶ月)。このように

不定塊根の増殖率には外植片間差および品種間差が認められた。緑色八重花(‘Mrs. Brake’)に於ける液体培地中の不定塊根の1ヶ月目の増殖状態を Fig. 3 に示した。不定塊根は、肥大成長後分球し、比較的小粒化した状態で成育と増殖を繰り返した。

(3) 不定塊根の増殖期間が不定胚のサイズ別形成数および形状に及ぼす影響

不定塊根増殖後6ヶ月目に葉柄一切片当たりの不定胚形成数は最高値を示し、その前後(4, 8ヶ月目)では少なかった(Table 3)。不定胚のサイズや形状では、どの増殖期間でも0.5 mm以下の球状胚が多く、サイズが大きくなり、且つ、胚の形状が発達するのに連れて不

Table 4. Varietal differences in the productivity of somatic embryos.

Cultivar used	Number of somatic embryos/petiole* ¹
‘Cameo’	102
‘Shoaff’s Double’	987
‘White Single’	1, 025
‘White Semi-Double’	0
‘White Double’	507
‘Green Hurricane’	17, 536
‘Mrs. Brake’	23, 565

Adventitious tuberous roots(7 to 8 g/flask) were cultured in the MS liquid medium and subcultured at half month intervals of 11 transfers prior to investigation 6 months after inoculation.

*¹The number of somatic embryos was counted 6 months after proliferation of the adventitious tuberous roots.

定胚形成数は少なくなった。不定胚は増殖している不定塊根の表皮から順次遊離してくる形で誘導された(Fig. 4-A)。誘導された一次不定胚はさらに二次、三次と孫不定胚を生む形で増殖した。遊離された不定胚の一群を Fig. 4-B に示した。球状型、心臓型、魚雷型各ステージの不定胚が、観察された。このようなカルスを経ない形での不定胚誘導はニンジン^{9,10}でも観察されており、特に観賞価値が問われる花卉植物に於いて、より変異の少ない増殖法としての適応性が大きいと思われる。

(4) 不定胚形成数の品種間差

緑色八重花(‘Mrs. Brake’)で最高不定胚形成数(23, 565個/葉柄)を示し、同色異型花である緑色一重花(‘Green Hurricane’)でも17, 536個/葉柄と他品種に比べて高い不定胚形成数を示した(Table 4)。その他の品種では不定胚形成数はかなり少なく、白色菊咲花(‘White Semi-Double’)では不定塊根からの不定胚形成は全く認められなかった。

ニンジン分果からの不定胚形成能には品種間で0~74%のばらつきがあり¹⁰、それは遺伝的要因によるものと考察されている。本実験で供試した品種が全て同じ場所に生息しており、且つ、実験材料として供試するまでの間同じ温室内で管理していたことを考え合わせると、今回の結果も本来各品種が併せ持っていた遺伝的要因によるものと考えられる。

(5) 不定胚からの再分化に及ぼす前処理の影響

水洗後乾燥処理することにより、MSの再分化培地で無処理区の5%に比べて27%と再分化率が向上した(Table 5)。培地に置床後1ヶ月目の様子を Fig. 4-C に

Table 5. Effects of pretreatment on plantlet regeneration from somatic embryos of ‘Mrs. Brake’.

Regeneration medium	Number of plantlets formed / Number of somatic embryos planted(%)		
	Desiccation* ¹	Desiccation after washing with water* ²	No treatment
MS	25/124(20)	28/102(27)	8/155(5)
MS+PGR* ³	5/ 85(6)	9/ 95(9)	4/142(3)

Data was obtained 2 months after planting on the regeneration medium. Mostly globular and a partly heart-shaped somatic embryos(0.5~0.85 mm in diameter) were used. About 20~30 of somatic embryos, pretreated or did not, were planted on each culture dish.

*¹Desiccation was done in a laminar flow cabinet. Somatic embryos were placed on a Petri dish with no lids for 1 hr. Water content of the somatic embryos was reduced from 88 to 61% by this treatment.

*²Somatic embryos were washed 3 times with sterilized water in a sterilized beaker.

*³0.2 mg/l BA+0.02 mg/l NAA

Table 6. Varietal differences in plantlet regeneration via adventitious shoots derived from adventitious tuberous roots.

Cultivar used	Number of plantlets regenerated/petiole* ¹
'Cameo'	90
'Shoaff's Double'	160
'White Single'	278
'White Semi-Double'	65
'White Double'	75
'Green Hurricane'	164
'Mrs. Brake'	533

Adventitious tuberous roots (7 to 8 g/flask) were cultured in the MS liquid medium and subcultured at half month intervals of 3 transfers prior to planting on the MS solid medium 2 months after inoculation.

*¹The number of plantlets regenerated was counted 1 month after planting on the MS solid medium.

示した。水洗後乾燥処理した不定胚由来の幼植物体は一斉に発芽伸長し、揃いが良かった。本処理により、不定塊根増殖後7ヶ月目の幼植物体数は、理論上 $4,664 \times 0.27 = 1,259$ 本/葉柄であった (Table 3, 5 より算出)。従って不定胚を水洗後乾燥処理する方法を本実験で用いた以外の径が 0.5 mm 以下の球状型胚や 0.85 mm 以上の魚雷型胚にも適用することにより再分化率が向上し、延いてはこれが不定胚由来の幼植物体数の増加につながるものと期待される。

一方、乾燥処理単独でも無処理区に比べて再分化率は向上したが、水洗後の乾燥処理には及ばなかった。また、各処理区とも植物成長調節物質を含まない培地の方が、それを含む培地よりも高い再分化率を示した。

坂元ら¹¹⁾は不定胚の乾燥処理が再分化率向上に寄与すると述べているが、今回の結果も乾燥処理やその前の水洗処理によって再分化率を大幅に向上出来ることを示している (Table 5)。不定胚乾燥過程に於ける植物成長調節物質や糖類などの各種成分の内生レベル変動等がその後の再分化に大きく関与しているものと思われ、今後この分野での研究の進展を願いたい。

(6) 不定塊根からの不定芽形成および幼植物体再生

Table 6 に各品種に於ける不定塊根から不定芽経由で得られた幼植物体の数を示した。緑色八重花 ('Mrs. Brake') で 533 本/葉柄と最高の再分化率を示した。一方、白色菊咲花 ('White Semi-Double') や白色八重花 ('White Double') では低く、それぞれ 65, 75 本/葉柄の

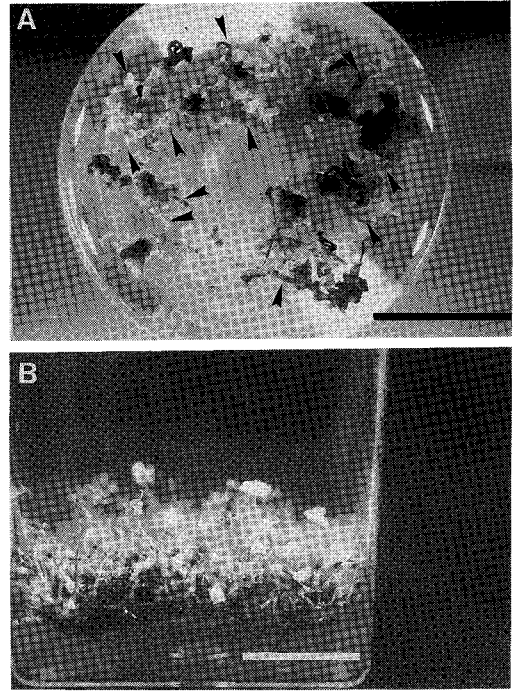


Fig. 5 A: Adventitious shoot formation from adventitious tuberous roots in 'Mrs. Brake'. This figure was taken 2 months after proliferation of adventitious tuberous roots derived from petiole explants with half month intervals of subculture. The arrows show generated adventitious shoots from adventitious tuberous roots during their propagation. The bar shows 3 cm.

B: Plantlets regenerated from adventitious shoots of 'Mrs. Brake'. Vigorous regeneration of plantlets was observed. This figure was taken 1 month after planting on the regeneration medium. The bar shows 3 cm.

再分化率であった。このように不定塊根から不定芽経由で得られた幼植物体数には品種間差が認められたが、不定胚が得られ難かった、あるいは全く得られなかった淡桃色八重花 ('Cameo'), 白色菊咲花 ('White Semi-Double') および白色八重花 ('White Double') では、不定芽経由の幼植物体も得られ難い傾向が認められた。不定芽経由の増殖系では、不定胚経由のそれに比べて不定塊根の増殖期間が2~6ヶ月間短いため、より早期に幼植物体得られる点でメリットがあるものの、葉柄一切片当たりの幼植物体数で比較すると、緑色八重花 ('Mrs. Brake') では、前者が533本に対して後者は1,259本 (理論上) とより多い結果になっている。従って両培養系

Table 7. Cultivation characteristics of culture-derived plants of 'Green Hurricane' and 'Mrs. Brake'.

Cultivar used	Origin of plant	Flowering (%)	Plant height (cm)	No. of flowers/plant	No. of petals/flower
'Green Hurricane'	Division	97	14.8±3.2	5.2±0.8	9.5±0.8
	AS* ¹	88	14.3±2.6	5.0±0.5	9.1±1.0
	SE* ²	87	13.2±1.6	4.5±0.5	8.3±0.4
'Mrs. Brake'	Division	99	9.4±1.6	4.3±1.2	Not investigated
	AS* ¹	89	9.6±1.8	4.2±1.0	Not investigated
	SE* ²	92	8.2±0.3	3.9±0.2	Not investigated

Data show means±SD.

Data was obtained 27 months after planting in soil.

*¹Adventitious shoots, *²Somatic embryos.

Flowering of division plants and culture-derived plants(AS and SE)were examined for 100 and 2,500 plants, respectively. Plant height, no. of flowers/plant and no. of petals/flower were examined for 50 plants.

の培養価格等も考慮に入れながら、どちらの系を選択するのか、あるいはその両方を利用するのが得策であるのかを判断する必要があるものと思われる。不定塊根は肥大分球を繰り返しながら増殖したが、増殖後1ヶ月目以降そこから不定芽を伸長させるものがいくつか見受けられた。このような形態のものは一度不定芽を分化すると分球増殖せず、主に不定芽の伸長と形成のみが観察された(Fig. 5-A)。これらの不定芽を伴った不定塊根を増殖後2ヶ月目に回収し再分化培地に置換したところ、1ヶ月目には幼植物体へと再分化した。不定芽由来と不定胚由来の幼植物体間には、顕著な外観差は認められなかった(Fig. 5-B)。

(7) 順化個体の栽培特性調査

開花率、草丈、輪数/株、花弁数/輪は大体に於いて塊根分け由来株の方が培養(不定芽、不定胚)由来株に比べて高かった(Table 7)。一方、開花率以外の調査項目では株間のばらつきは大体に於いて培養由来株の方が小さく、特に不定胚由来株でその傾向が顕著であった。培養由来株の調査項目に於ける数値の低さは差程問題になるものではなく、むしろ揃いが良い点は均質な苗を大量に、且つ、同時に生産するうえで重要なことであり、外観上目立った変異もなかったことも考え併せると、本報により報告した不定芽や不定胚による増殖法が実際の場面で使えるものと判断された。

植物種や培養法は異なるものの、ウドでも不定胚由来株は実生由来株に比べて揃いが良いことが報告されており¹²⁾、我々の結果とほぼ一致している。バイカカラマツは温室レベルでは塊根分けによって増殖維持しているが、今後さらに2年目、3年目の培養由来株に於いても今回と同様な結果が得られるかどうかも含めて栽培特性調査

を続けていくことが重要であると思われる。

謝 辞

本研究を通して順化のサポートを行って頂いた麒麟ビール株式会社植物開発研究所の森 鏡子さんと塚原延枝さん並びに培養、順化および栽培特性調査のサポートを行って頂いた小久保優子さんに厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) 貴志文昭, 鏡 勇吉, 小山征男, 1994. 植物組織培養, 11: 96-102.
- 2) Murashige, T., F. Skoog, 1962. Physiol. Plant., 15: 473-497.
- 3) Tanimoto, S., N. Ishioka, 1991. Bull. Fac. Agr. Saga Univ., 70: 61-66.
- 4) 藤目幸祐, 工藤りか, 奥田延幸, 1993. 植物組織培養, 10: 9-16.
- 5) 秋田 求, 高山真策, 1988. 園芸学会春季大会講演要旨集, 228-229.
- 6) 秋田 求, 高山真策, 1988. 園芸学会秋季大会講演要旨集, 266-267.
- 7) 高山真策, 石尾慎史, 秋田 求, 大澤勝次, 1989. 園芸学会春季大会講演要旨集, 234-235.
- 8) 山田常雄, 前川文夫, 江上不二夫, 八杉竜一, 小関治男, 古谷雅樹, 日高敏隆編, 1977. 生物学辞典, p. 149, 岩波書店, 東京.
- 9) Kamada, H., K. Ishikawa, H. Saga, H. Harada, 1993. Plant Tissue Cult. Lett., 10: 38-44.
- 10) 古川 一, 重松典宏, 1991. 植物組織培養, 8: 94-97.
- 11) 坂元雄二, 大西 昇, 林万喜子, 岡本彰宏, 増子富彦, 真田松吉, 1991. 植物の化学調節, 26(2): 205-211.
- 12) 池田 洋, 中里 博, 小泉文晴, 田中伸子, 山田文典, 栗原則雄, 1991. 園芸学会秋季大会講演要旨集, 240-241.

Summary

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

2. Micropropagation through Adventitious Shoot and Somatic Embryo, and Cultivation Characteristics of Culture-derived Plants

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*

The leaf and petiole of *Anemonella thalictroides* Spach were used as explants for the induction of adventitious tuberous root (ATR). Obtained ATR was proliferated and used as the material of adventitious shoot (AS) and somatic embryo (SE) induction. In 'Mrs. Brake', the number of plantlets produced 3 months after the proliferation of ATR was 533/petiole. On the other hand, the number of SE produced reached to maximum (23,565/petiole) 6 months after the proliferation of ATR. Desiccation pretreatment of SE after washing with water was useful for the regeneration to plantlets. Regeneration frequency was increased from 5 to 27% by this treatment. SE-derived plants were superior in cultivational character variance to the AS and division-derived plants. By using the proliferation method of AS and SE via ATR, we were able to proliferate 7 varieties.