植物組織培養法によるチャボリュウノヒゲの 大量増殖に関する研究

養 父 志 乃 夫* 石 川 格* 大 曾 根 兼 一**
田 中 繁 男** 荻 野 徹*** 河 村 止***

Studies on the Micropropagation of *Ophiopogon japonicus* Ker.f. *nanus* hort.

Shinobu YABU Itaru ISHIKAWA Kenichi OHSONE
Shigeo TANAKA Toru OGINO Todomu KAWAMURA

摘要：チャボリュウノヒゲの大量増殖手法を確立するため、生長調節物質の濃度と種類を違えたMS培地で茎頂分裂組織を培養した。その結果、無菌再生個体が得られ組織培養による本種の増殖の可能性を確認した。 α -ナフタレン酢酸は高濃度の時にカルスを、低濃度の時に根を誘導し、その違いに関係なくシュートの成長を促進すること、6-ベンジルアミノプリンは、シュートを誘導し、 α -ナフタレン酢酸の効果を抑制することがほぼ明らかになった。

はじめに

チャボリュウノヒゲ *Ophiopogon japonicus* Ker.f. *nanus* hort.は、耐寒、耐陰、耐潮性など、環境に対する幅広い適応性を有するため、公園や街路の緑地帯、人工地盤上や冠水地などの特殊条件におけるグランドカバー用植物として大量に使用され、安定的な量産が求められている。

一方、本種は、結実する種子に形質分離がみられるため、種子から均一な苗を得ることが困難である。また、種子の収量が、1株当たり7個から10個前後であるため、きわめて増殖効率が悪い。このような理由から、緑化材料としての本種の生産は、これまで、株分けに依存してきた。しかし、この方法でも、圃場の効率的な利用や生産労力を抑えることが難しく、コスト軽減は限界に達している。

そこで、チャボリュウノヒゲの計画的な生産と生産コストの軽減をはかり、しかも、今後の需要に応えた高品質、高規格植物の生産体系を確立するため、植物組織培養法による本種の増殖を検討し、無菌再生植物と大量増殖に有力な分化組織を得たのでここに報告する。

1. 実験の方法

(1) 供試材料の調整

供試する茎頂分裂組織は、三重県鈴鹿市産のチャボリュウノヒゲのものとした。まず、この組織を得るに際し、親株を1芽ごとに株分けし、茎頂分裂組織を覆う葉鞘が7枚から8枚程度になるまで側葉を切除した(写真1)。これらは、不特定な菌によって汚染されているため、70

%エタノール溶液と飽和カルキ水を用いて滅菌処理を加え、その後、オートクレーブによって滅菌した蒸留水でさらに洗浄し、組織の採取とあとで述べる培地への置床開始までのあいだクリーンベンチのなかで保存した。

基本培地には、Murashige & Skoog 培地¹⁾(表1、以下、MS培地と呼ぶ)を用いた。茎頂分裂組織から器官を分化させるための生長調節物質としては、 α -ナフタレン酢酸(以下、NAAと呼ぶ)と、6-ベンジルアミノプリン(以下、BAPと呼ぶ)を採用し、これらの添加濃度を違えた25種類の処理区2)を設けた(表2)。

各処理区の培地には、ショ糖を3%添加した後、1N、HClと1N、NaOHによって、pHを5.5から5.8に調整し、植物体支持剤として1.0%の粉末寒天(Difco Bacto Ager)を添加し、加熱しながら寒天を完全に溶解させた。

つぎに、分注器を用いることにより、処理区毎に培地を試験管($\phi 25\text{mm}$,長さ100mm)に分注し、アルミホイルで栓をした。また、培地の分注量は、試験管1本当たり5mlである。培地の滅菌処理には、オートクレーブ(1.2kg/cm²,120°C,15分)を使用し、その後、試験管は、茎頂分裂組織の置床までのあいだ、クリーンベンチのなかで保存した。

(2) 供試組織の培養

供試した株は、クリーンベンチのなかで、葉鞘が4枚から5枚程度になるまで肉眼下で切除し、これ以後は、実体顕微鏡下で、茎頂分裂組織(0.1mmから0.3mm)が露出するまで葉原基を切除した。

茎頂分裂組織は、メスでこれを切り取り、試験管に入れ

* 東京農業大学短期大学部 ** 名城大学農学部 *** 有限会社三重緑地

表-1 Murashige & Skoog培地の組成 (mg/l)

KNO ₃	1,900
NH ₄ NO ₃	1,650
CaCl ₂ ・2H ₂ O	440
KH ₂ PO ₄	17.0
MgSO ₄ ・7H ₂ O	370
MnSO ₄ ・4H ₂ O	22.3
ZnSO ₄ ・7H ₂ O	8.6
KI	0.83
H ₃ BO ₃	6.2
NaMoO ₄ ・2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ ・5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ ・6H ₂ O	0.025
FeSO ₄ ・7H ₂ O	27.8
Na ₂ -EDTA	37.3
ニコチン酸	0.5
チアミン塩酸	0.1
ピリドキシン塩酸	0.5
ミオ-イノシトール	100
グリシン	2.0
ショ糖	30.0

写真1. 供試組織を含む植物個体の滅菌前の状態
左から株分け後、根の切断後、葉身の切断後、葉鞘の切断後

表-2 生長調節物質の濃度の違いによる処理区一覧

NAA濃度 mg/l					
BAP濃度 mg/l	0	0.1	0.5	1.0	2.0
0	N0.1	N0.6	N0.11	N0.16	N0.21
0.1	N0.2	7	12	17	22
0.5	N0.3	8	13	18	23
1.0	N0.4	9	14	19	24
2.0	N0.5	10	15	20	25

* コントロール区, NAA 濃度0mg/l, BAP濃度0mg/lの処理区を示す

** NAA濃度0mg/l, BAP濃度0.1mg/lの処理区を示す

図-1 チャボリュウノヒゲの組織培養手順

写真2 生長調節物質の種類と濃度の違いによる分化器官の状態

a:NAA 0mg/ℓ, BAP2.0mg/ℓ, b:NAA0.1mg/ℓ, BAP0mg/ℓ
c:NAA0.1mg/ℓ, BAP2.0mg/ℓ, d:NAA1.0mg/ℓ, BAP0.5mg/ℓ
e:NAA2.0mg/ℓ, BAP2.0mg/ℓ

られた25種類の処理区の培地計250本に対し、10反復ずつ置床し、インキュベーター（23±1℃, 700lux, 16時間明期, 8時間暗期）において静置培養した（図1）。

(3) 供試組織から分化した器官と組織の調査

培地に置床してから35日目に、処理区ごとに、シュートの有無を調べたほか、不定芽の有無とその数、カルス形成の有無、他の分化組織の有無を調査した。35日目以降については、新たな不定芽の発生、カルス形成の有無、他の分化組織の形成の有無を調べた。

なお、ここで述べるシュートとは、供試組織から出現した芽を、不定芽とは、それ以外の芽を示す。

(4) シュートの継代

シュートは、培地が枯渇するまで培養し、さらにその後も同じ培地へ継代した。これ以後も、不定芽、カルス、その他の分化組織の形成の有無を調査した。

2. 結果と考察

(1) シュートの誘導と組織の形成

シュートは、置床後35日目の観察において、17種類の処理区から得られた（表3）。しかし、NO.1区（コントロール区）、NO.6区（NAA 0.1mg/ℓ, BAP 0mg/ℓ）、NO.21区（NAA 2.0mg/ℓ, BAP 0mg/ℓ）、NO.22区（NAA 2.0mg/ℓ, BAP 0.1mg/ℓ）、NO.23区（NAA 2.0mg/ℓ, BAP 0.5mg/ℓ）、NO.24区（N

AA 2.0mg/ℓ, BAP 1.0mg/ℓ）、NO.25区（NAA 2.0mg/ℓ, BAP 2.0mg/ℓ）においては、シュートが得られなかった。また、培地に添加した2つの生長調節物質は、それぞれ異なった作用を示し、NAAはカルスと根を、BAPはシュートの誘導を促し、これらの生長調節物質が同時に働くことによって、処理区毎に異なった形態の器官や組織を得た。

その内訳をみると、BAPだけを含む、NO.2, 3, 4, 5の処理区では、茎頂分裂組織の肥大がみられ、シュートが誘導されたが、根、カルスは誘導されず、シュートの生育は、NAAを添加した区、例えば、NO.10区などに、比べて劣った（写真2 a）。これらのことから、シュートの誘導は、BAPの作用によって生じ、その生長の促進にはNAAが影響しているものと考えられた。

また、0.1mg/ℓのNAAと0.1mg/ℓのBAPを含むNO.7ならびに、0.1mg/ℓのNAAと0.5mg/ℓのBAPを含むNO.8の処理区においては、シュートと根が誘導されたが、カルスは得られなかった（写真2 b）。これに対し、NO.7, 8と同じ濃度のNAAに、2.0mg/ℓのBAPを添加したNO.10区では、シュートとカルスが誘導されたが、根の誘導は、みられなかった（写真2 c）。このことは、NAAが根の誘導を促進し、高い濃度（2.0mg/ℓ）のBAPがこれを抑制していることを示している。

つぎに、NAAの濃度が、0.5mg/ℓ、または、1.0mg/ℓであり、これらに、0mg/ℓから2.0mg/ℓのBAPを加えたNO.11からNO.20までの処理区においては、シュート、根、カルスの誘導がみられた。ただし、これらの処理区においても、NO.15とNO.20の処理区のように高い濃度のBAP（2.0mg/ℓ）を含む場合には、カルスと根の誘導が抑制された（写真2 d）。

高い濃度のNAA（2.0mg/ℓ）と0mg/ℓから2.0mg/ℓのBAPを添加したNO.21からNO.25までの処理区では、BAPの濃度とは関係なく、カルス（写真2 e）に加え、あとで述べるようなカルスとは明らかに区別できる組織が得られた。

これらのことから、NO.7とNO.8の処理区のように、NAAの濃度が低い場合（0.1mg/ℓ）には、根が、NO.11からNO.25までの処理区のように、NAAの濃度が高い場合（0.5mg/ℓから2.0mg/ℓ）には、カルスの誘導が促され、根とカルスの誘導は、高い濃度のBAPによって抑制されるものと考えられた。

以上に述べた茎頂分裂組織に対する生長調節物質の作用によって、この物質の濃度を意図的に操作することにより、目的とする器官の分化を調節することができることが示唆された。

すなわち、最初は、NAAの濃度が高い培地（0.5mg/ℓから2.0mg/ℓ）で培養することにより、カルスなどの増殖体を誘導させる。つぎに、シュート分化に必要な濃度のBAPを含んだ培地（NAA 0.1mg/ℓから1.0mg/ℓとBAP 2.0mg/ℓ）上へ継代し、最後にシュートの生長と発根を促すため、低い濃度のNAAとBAPを含んだ培地（NAA 0.1mg/ℓ、BAP 0.1mg/ℓから1.0mg/ℓ）へ継代する。これによって、新しい個体を得ることが可能となる（図2）。

(2) カルス誘導

カルスは、NO.1からNO.15の処理区のようにNAAの濃度が低い場合（0mg/ℓから0.1mg/ℓ）には、NO.10の処理区の2個の供試組織を除いて得られなかった。NO.11、NO.13、NO.14、NO.17、NO.18、NO.21、NO.22、NO.23、NO.25の9種類の処理区、すなわち、NAAを0.5mg/ℓ以上添加した場合には、70個の供試組織のうち22個がカルスを誘発した。このことから、カルスは、NAAの濃度を、0.5mg/ℓから2.0mg/ℓに高めることによって得られやすくなるものとみられる（表3）。

また、これらのカルスは、その発現したもとの組織により2つの形態に分類することができた。ここでは、NO.21からNO.25の処理区のように、茎頂分裂組織から直接に誘発されたカルスを1次カルス（写真2 e）、NO.11からNO.20の処理区のように、すでに誘導されたシュートの基部や根の側部から出現したものを2次カル

表3. シュートとカルス誘導数に及ぼす生長調節物質の種類と濃度の違い

処理区	調査サンプル数	シュートが誘導された供試組織数	カルスが誘導された供試組織数
NO. 1	2	0	0
2	3	1	0
3	3	2	0
4	1	1	0
5	3	2	0
6	1	0	0
7	3	3	0
8	3	1	0
9	1	1	0
10	10	6	2
11	8	5	2
12	8	8	0
13	8	5	1
14	8	4	1
15	6	3	0
16	6	3	0
17	5	4	1
18	6	3	1
19	10	7	0
20	9	9	0
21	7	0	3
22	8	0	6
23	5	0	2
24	7	0	0
25	8	0	5

・ 調査サンプル数は、10反復の中から培養中の培地の表面に雑菌のコロニーが発生したサンプル数を除いたもの

図2. 組織培養のフロー

写真3. シュート基部から誘導された2次カルス
NAA 0.5mg/ℓ, BAP 1.0mg/ℓ

スとした(写真3)。

1次カルスは、高い濃度のNAA (2.0mg/ℓ) のときに誘導され、白色で緻密な性状を呈していた。しかし、この場合には、NAA濃度が高くBAP濃度がNAAと同程度ないしは、それ以下であるために、シュートは誘導されなかった。

2次カルスは、NAAが0.5mg/ℓ、または、1.0mg/ℓの濃度の場合に誘導された。2次カルスは、1次カルスとほとんど同じ色彩と性状を呈していたが、この場合には、誘導されたカルスの表面に白色のシュート状の組織を形成し、置床後、約60日目に、これらから不定芽が誘導された。これは、NO.15やNO.20の処理区でみられたBAPのシュート誘導作用によって起こったものと考えられる。

不定芽の数は、前項に述べた茎頂分裂組織から直接にシュートを形成したNO.11からNO.20の処理区の場合には、3個、ないしは4個であった。しかし、2次カルスが生じた場合には、不定芽によって多芽体状の組織が形成され、その組織は、不定芽を10個程度有していた。

これらのことから、チャボリュウノヒゲの増殖率は、2次カルスに生じた多芽体状の組織を活用することによって、茎頂組織に直接シュートを形成した場合よりも高くなるものと考えられた。また、1次カルスからは、シュートが誘導されなかったため、シュートの誘導を促進する生長調節物質の種類と濃度について検討が必要とされた。

なお、本実験では、培養初期、一部の供試組織の培地表面に雑菌がコロニーを形成した。これらについては、雑菌が、培地に含まれる糖を吸収し、このコロニーがみられない培地とのあいだに、組織の生長に必要な炭素に濃度の差が生じたため、追跡調査から除外した。これによって、供試組織の反復数に増減が生じ、処理区のあいだにおいて、根やシュートといった器官や、カルスなどの組織の誘導率を統計的に比較することができなかった。

写真4. 高濃度のNAAによって分化した苗条原基集塊
NAA 2.0mg/ℓ, BAP 2.0mg/ℓ

このため、供試組織の滅菌の手法については、薬品の濃度と種類などに検討の余地が残っている。

(3) その他の分化組織の出現

NO.22(NAA 2.0mg/ℓ, BAP 0.1mg/ℓ), NO.25(NAA 2.0mg/ℓ, BAP 2.0mg/ℓ)の処理区では、カルスは出現したが、シュートと根は発生しなかった。ただし、カルスのほかに、これとは明らかに区別できる分化組織が誘導された。

この組織は、全体に白色を呈し、コンペイ糖状の形をしていることから(写真4)、茎頂分裂組織と同様にシュートや根を発生させる能力をもつ苗条原基集塊とみられた³⁾。

したがって、この組織を切断して培養することにより、茎頂分裂組織から直接シュートを誘導させる場合に比べ、増殖率を上げることが可能である。また、苗条原基集塊は、生長調節物質などによって遺伝的変異を起こさないことから³⁾、これによって形質的に均一な植物を得ることができる。

(4) 再生個体の鉢上げ(順化)

計25種類の処理区のなかで、18種類の処理区においてシュートが誘導された。このうち便宜的に、NO.10, NO.15, NO.20の処理区に限って、シュートの継代培養を実施した。その結果、これらすべてが正常に生長し、置床開始から約90日目で、植物の基本構造である、根、茎、葉を有した個体が得られた。

組織培養による他の植物の増殖では、得られた個体の順化に、通常、遮光とミスト管理を加えた特別な条件が必要とされる。この場合、順化に要するコストが生産費用全体の40%を越えることがある⁴⁾。しかし、チャボリュウノヒゲの場合には、遮光だけを施した常温の室内においても順調な生長を示したことから(写真5)。他の種に比べ、順化、鉢上げにかかるコストは低いものと考えられる。

写真5. 組織培養によるチャボリュウノヒゲの再生個体

3. まとめ

本実験により、チャボリュウノヒゲ *Ophiopogon japonicus* Ker.f. *nanus* hort.の無菌再生個体が得られたことから、組織培養法による本種の増殖が可能であることが確認された。また、培地に添加する生長調節物質の濃度を違えることによって、茎頂分裂組織から、4つの異なる分化組織（シュート、根、カルス、その他の分化組織）を得ることができた。

生長調節物質の効果は、つぎのようである。 α -ナフタレン酢酸（NAA）については、高濃度の場合にカルスを、低濃度の場合に根を誘導し、濃度の違いに関係なくシュートの生長を促進した。また、6-ベンジルアミノプリン（BAP）は、シュートを誘導し、1-ナフタレン酢酸の効果を抑制することがほぼ明らかになった。

組織培養法の培地には、MS培地¹⁾、B5培地、N6培地など多種のものが提案されてきた。これらのなかで、

MS培地は、植物の器官分化や植物体の再生に最も有効とされ、本実験においても、これを基本培地とした。しかし、MS培地には、多種の無機塩類やビタミンが必要のため（表1）、非常に高価で、しかも調合に手間どる。近年、植物の種や分化する器官の違いに応じた培地⁵⁾や、ハイポネックス等を利用した培地⁶⁾も開発されている。チャボリュウノヒゲについても、簡便、安価な培地の開発が必要である。

引用文献

- 1) Murashige T. and F. Skoog: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures: *Physiol. Plant*, Vol. 15, 473-497, 1962
- 2) Tanaka R. and Ikeda.: Perennial maintenance of annual *Haplopappus gracilis*: *Jpn. J. Gent.*, Vol. 58, 65-70, 1983
- 3) Tanaka R., Taniguchi K., and Fujishige I.: Artificial induction of clonal plant, *Haplopappus gracilis* ($2n=4$), by using tissue cultured shoot primordia: *Jpn. J. Gent.* Vol. 63, 113-125, 1988
- 4) 藤野守弘: バイオテクノロジー利用による花きの種苗生産: 園芸学会平成元年度秋季大会シンポジウム講演要旨集, 77-85, 1989
- 5) Lloyd G., and McCown B.: Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture, comb., *Proc. Int. Plant Propagator's Assoc.*, Vol. 30, 421-427, 1980
- 6) 古河一, 松原千尋, 重松典宏: トルコギキョウの根からのシュート形成: 植物組織培養, 7(1), 11-13, 1990

Summary : *Ophiopogon japonicus* Ker.f. *nanus* hort. was micropropagated on several media and produced regenerated plants. Meristems were cultured on 25 types of media. Basal medium was Murashige and Skoog supplemented with two different plant growth regulators: α -naphthalenacetic acid (NAA), 0, 0.1, 0.5, 1.0 and 2.0 mg/ ℓ , and 6-benzy laminopurine (BAP), 0, 0.1, 0.5, 1.0 and 2.0 mg/ ℓ . All media contained 1.0% agar and 30g/ ℓ sucrose and were adjusted to pH 5.5-5.8 before autoclaving for 20 minutes at 120°C.

The meristems were cultured on MS medium incubated in a chamber in 16 hours light at 700 lux at $23 \pm 1^\circ\text{C}$ and in 8 hours darkness. Shoot was induced in vitro from some meristems on 23 types of media. Callus was formed on meristems and regenerated shoots from some media containing high NAA concentrations. Root was induced on meristems and regenerated plants from some media containing NAA. But high BAP concentration prevented root formation. Regenerated shoots were transferred to the same medium which allowed shoot growth.