

カルミアの茎頂培養および葉片カルス培養による茎葉の大量増殖

須田廣勝*・榎本末男**・中島阜介**

*東京都立アイソトープ総合研究所
(〒158 東京都世田谷区深沢)**農業生物資源研究所
(〒305 つくば市観音台)

(1988年11月1日受付)

(1989年2月3日受理)

カルミアの茎頂培養による茎葉の大量増殖, 葉片カルスからの茎葉の再分化およびその増殖を検討し, さらに, 増殖した茎葉の発根条件を検討した. 培地は, Gellan gum で固化した Woody Plant 培地を用いた. 実験は屋外の個体の枝と葉を材料としたので, 殺菌液に浸して滅菌処理および振盪処理を行って, 除菌とフェノール様物質の影響の軽減を行った. 培養中に茎頂, 葉片等の外植体から培地中にフェノール様物質の滲み出しを認めた場合, その悪影響を軽減させるために, 1ないし2回の植え替えを行った. 茎頂からの茎葉の伸長と増殖には, 1 mg/l の BA が有効であり, 茎頂培養後4ヵ月間で3回の分離・増殖によって1個の茎頂から平均1,130本の茎葉を養成することができた. 葉片上でのカルス形成は BA 10 mg/l と 2,4-D 1 mg/l の組合せが, カルスからの不定芽の誘導には BA 0.1~5 mg/l と NAA 0.1 mg/l の組合せが有効であった. IBA の水溶液中に得られた茎葉を浸して24時間通気処理した. 70%の茎葉が, 5週間の培養後20~30 mm の長さの根を数本形成し, 幼苗に生長した.

1. 緒言

最近, 組織培養を利用した大量増殖技術の進展は目ざましいものがある. しかし, それらの成功例は大部分草本類であり, 木本類の例は極めて少い. これは, 木本類が一般的に含むフェノール様物質が, 組織培養による増殖の大きな障害となっているからである. そのために, これまで木本植物の成熟葉由来のカルスから不定芽形成及び, それらから茎葉の増殖に成功した例は, フジツギ (*Buddleja davidii*) 等数種で報告されているにすぎない³⁾.

カルミア (*Kalmia latifolia* L) は, 最近日本で普及しはじめたアメリカ原産のシャクナゲ科の花木である. カルミアの増殖は, さし木による大量増殖が難しく実生によっているため, 形質が均一な突然変異育種用の材料が得られ難い. Lloyd and McCown²⁾ は, カルミアの大量増殖に成功しているが, この方法は, 培養の始めの7日間, 毎日培養液を交換するために, 雑菌による汚染の危険が高く操作も煩雑である.

そこで, 本研究では, 材料の除菌処理と, フェノール様物質の影響に留意して, カルミアの大量増殖法につい

て検討した. その結果, 茎頂培養による茎葉の大量増殖法と成熟葉片からカルスを誘導し, そのカルスから茎葉を再分化させる大量増殖法を確立した. さらに, 大量増殖した茎葉に根を形成させ, 完全な植物体を養成したので, ここに報告する.

2. 材料および方法

(1) 茎頂培養による茎葉の増殖

穂木の長さは約8 cm とし, 屋外で栽培されていた株から得た. 除菌処理は, 流水中に1時間, 1% Tween 20 液に1時間, 70% エタノール液に30秒間, 2% 次亜塩素酸ナトリウム液に滅菌して30分間, さらに2% 次亜塩素酸ナトリウム液に30分間浸漬後, 滅菌水で3回洗った. 実体顕微鏡下で切り出した約0.5 mm の茎頂を Table 1 に示す BA (6-Benzyladenine) と 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid) を組み合わせた16種類の培地上に置床した.

置床2ヵ月後, 茎頂に増殖した長さ10~15 mm の茎葉を分離し継代培養した. この継代培養は1ヵ月ごとに3回繰り返した. 培地は同一培地を用いた. 継代培養でも, 培養10日目に新しい同一培地に植え替えた.

用いた培地は、2 g/l (w/v) の Gellan gum で固化した Woody Plant 培地 (Lloyd & McCown, 1980, 以下, WP 培地とする) で, pH は 5.5~5.7 に調節した。培養は, 25°C, 白色蛍光灯を用いて 2,000~3,000 lux 18 時間照明下で行った。

培養中, 外植体から培地へフェノール様物質が滲み出たので, 茎頂培養では 4 日目, 17 日目に, 継代培養では 10 日目に同一条件の新しい培地に植え替えた。

培養 4 ヶ月後に発根処理を行った。

(2) 葉片カルス由来の茎葉の増殖

屋外から得た成熟葉を前述した方法で除菌した後, 中央部分を約 15 mm の幅に切断した。100 ml のエーレンマイヤーフラスコに葉片 16 枚を入れ, 2 iP (^2N - Δ^2 isopentenyladenine) を含む WP 液体培地 50 ml を加え, 60 rpm での振盪処理を行った。処理は, 1,000 lux, 18 時間照明, 25°C の条件下で 2 回, 合計 72 時間とした。葉片は, 水洗後, 5 mm 角大に切り, **Table 3** に示す BA, 2,4-D を組み合わせた 16 種類の WP 培地に置床し, カルスの形成を誘導した。フェノール様物質の影響を軽減するため, 置床後 4 日目, 20 日目に新しい同一培地に植え替えた。

培養 1 ヶ月後, カルス部分を 5 mm 角大に分割し, 再分化培地に置床した。培地は BA と NAA (α -Naphthaleneacetic acid) を加えたものおよびホルモンフリーの WP 培地を用いた。

再分化した茎葉は, 1 mg/l の BA を含む WP 固体培地で 1 ヶ月ごとに分離・増殖を繰り返し, 4 ヶ月間後に発根処理をした。

(3) 茎葉からの根の形成

増殖された茎葉 20 本を, IBA (indolebutyric acid) あるいは NAA を含む 1,000 ml の水溶液中に入れ, 約 1,500 ml/分の空気を送り込む処理を 24 時間行った。処理後, 滅菌したパーミキュライトに挿し木し, 25°C, 湿度約 70%, 約 500 lux の自然日長下で培養した。

3. 結果と考察

(1) 茎頂培養による茎葉の増殖

置床した茎頂のうち 60% の茎頂が, 茎葉あるいはカルスを形成した。茎葉の形成は, BA あるいは 2,4-D を単独で含む培地あるいは両者を含まない培地で認められた (**Table 1**)。茎葉を形成した茎頂のうち, 2 ヶ月後まで生存したのは, 1 mg/l の BA をふくむ培地で培養した 5 個の茎頂だけであった。

分離した茎葉の増殖は, 初め基部に近い位置にある腋芽や不定芽が伸長して新しい茎葉を形成し, 次にそれらの茎葉の腋芽が伸長することによっておこなわれた

Table 1. Shoot or callus formation rate in shoot tips after five weeks of culture.

		BA concentration (mg/l)			
		0	0.1	1	10
2,4-D	0	* ^b 5/6 ^a	*4/6	*5/6	0/6
concent-	0.1	*5/6	2/6	4/6	1/6
ration	1	7/10	6/10	1/6	2/10
(mg/l)	10	6/6	6/6	2/6	0/6

^a No. of shoots produced calli or shoots/No. of shoot tips cultured.

^b *; The shoot tips in these plots propagated shoots only, and others only calli.

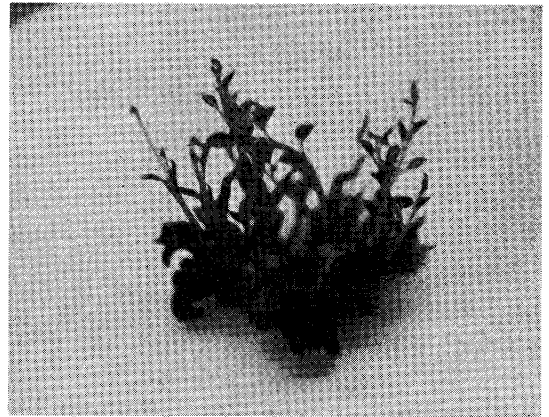


Fig. 1. Shoot multiplication obtained from axillary and adventitious bud elongation.

Table 2. Shoot propagation from initial shoot tip after three sub-cultures.

Shoot tip number	No. of shoots produced		
	first	second	third
1	19 (1)	277 (17)	2594 (233)
2	12 (1)	141 (9)	1360 (127)
3	10 (1)	87 (8)	813 (78)
4	10 (1)	84 (9)	477 (81)
5	5 (1)	38 (5)	408 (36)
Total	56 (5)	627 (48)	5652 (555)

Figures in the blankets show the number of shoot tips or shoots cultured.

(**Fig. 1**). 茎葉の基部に形成されたカルスから不定芽が再分化し茎葉が伸長した例が, 極めて少数例認められた。

これらの 5 個の茎頂で形成され伸長した茎葉を 1 ヶ月間隔で 3 回にわたって分離・増殖を繰り返した。

増殖された茎葉数を **Table 2** に示した。茎頂培養 2

ヵ月後の第1回目の分離・増殖で平均約11倍(5~19倍)に増殖し,第2回目では,平均約13倍(7~17倍)に,第3回目では,平均約10倍(5~11倍)に増殖した。

茎頂培養開始から4ヵ月後に,5個の茎頂から平均約1,130本の茎葉を得たが,茎頂から増殖した茎葉数は,茎頂間で400~2,600本と大きな差が認められた。分離・増殖中に,茎葉が枯死した割合は,各々の増殖で平均約10%であった。その後も分離・増殖を1ヵ月ごとに繰り返し行っているが,いずれの増殖率も約10倍であった。

著者等の第1回目の茎葉の分離・増殖までの茎頂培養は, Lloyd 等²⁾が行った液中で枝を培養した処理に相当する。この枝挿しには,培養開始1週間で合計9回の培養液交換を行うという煩雑な操作が必要で,汚染の危険性が高いうえ,増殖に移すために6ヵ月の培養期間を必要とする。著者等は,茎頂培養2ヵ月後に伸長した茎葉を分離・増殖することができた。増殖率についても,本研究では著しく高い値を得ることができた。

培養初期に,外植体を同じ培地に植え替えたのは,外植体からその生長を妨げると思われる茶褐色のフェノール様物質の影響を軽減しようとしたためである。この新しい培地への早い植え替えが,効率的な茎葉増殖に直接結びついたものと考えられる。

(2) 葉片カルスからの茎葉の再分化およびその茎葉の増殖

カルスを形成した葉片の割合とそのカルスを分割して得た約5mm角のカルス数を Table 3 に示した。カルスは, BA 0.1, 1, 10 mg/l, 2,4-D 0.1, 1, 10 mg/l の単独およびその組合せでいずれも誘導されたが,ホルモンフリー区ではその形成が認められなかった。12の処理区で,平均15個以上のカルスが得られたが,それらを継続して同一種類の培地で培養すると,約1/2の処理

Table 3. Callus formation rate in leaf segments after five weeks of culture.

	BA concentration (mg/l)				
	0	0.1	1	10	
2,4-D	0	0/6 ^{a)} (0)	4/6(17)	*5/6(33)	5/6(27)
concent-	0.1	3/6(18)	*5/6(44)	*5/6(40)	4/6(28)
ration	1	*4/6(17)	*4/6(36)	*5/6(29)	*6/6(60)
(mg/l)	10	2/6(11)	1/6(5)	*5/6(41)	1/6(3)

^{a)} Number of leaf segments which formed callus/Number of leaf segments cultured.

Figures in the blankets show the total number of calli divided into ca. 5 mm pieces from the leaf calli obtained.

The calli in these plots survived and proliferated after five weeks.

区でカルスは増殖せず枯死した (Table 3)。

葉片上に誘導されたカルスは,淡桃色,淡緑色,濃緑色などの色調を示した。BA 10 mg/l と 2,4-D 1 mg/l で培養した葉片は,100%のカルス形成率を示し,分割して得られた葉片当たりの平均個数も最も多く,この淡桃色のカルスだけが,後に不定芽を形成した。

培養中,葉片やカルスから培地に,フェノール様物質の滲み出しが多く認められたものは,枯死するか,あるいは,生長してもカルスの増殖率は低かった。

屋外で生育した木本類の葉は,活力を維持して完全な除菌を行うことが非常に難しく,またフェノール様物質を除くことも難しい。これらの問題を解決するために,液体中に葉片を浸たして行った振盪処理と減圧処理が,成熟した葉片上にカルスを誘導するうえに,極めて有効であったと考えられる。

カルスからの茎葉の再分化は,BA と 2,4-D あるいは NAA を組み合わせた培地で試みた。

再分化が認められた培地は,BA 0.1 mg/l, BA 0.5 mg/l+NAA 0.1 mg/l, BA 5 mg/l+NAA 0.1 mg/l と



Fig. 2. Adventitious bud regenerated on the callus.

Left; one adventitious bud. Right; multiple adventitious buds.

ホルモンフリーの区であった。また、茎葉を再分化したカルスは、0.1あるいは10 mg/l の BA と 1 mg/l の 2, 4-D を含む培地で培養したカルスだけであった。

茎葉は、増殖したカルスの上に形成された不定芽が伸長して得られた。

再分化した茎葉は、1個のカルスから1本の場合が大部分であるが (Fig. 2-左)、2本あるいは10本以上伸長したカルスが、各々、1例ずつあった (Fig. 2-右)。

茎葉を再分化したカルスは、根をまったく形成しなかった。

茎葉の再分化までの培養条件をまとめると、次のとおりである。

(1) フェノール様物質の影響の軽減および滅菌のための葉片の振盪処理は、1ないし5 mg/l の 2 iP を含む WP 液体培地中で行う。

(2) 葉片を 10 mg/l の BA と 1 mg/l の 2,4-D を含む WP 個体培地で培養し、葉片上にカルスを誘導する。

(3) 分割したカルスを、0.1~5 mg/l の BA と 0.1 mg/l の NAA を含む WP 個体培地で培養し、不定芽を形成させ、茎葉を伸長させる。

Table 4 は、カルス由来の茎葉の増殖率である。1カ月ごとに、分離・増殖を繰り返したが、初めの1カ月で約9.4倍に、次の1カ月で約2.2倍に、次の1カ月で約0.9倍と、培養中に枯死する茎葉が増加したことにより、増殖率は急速に低下したが、次の1カ月では、約15.6倍と急激に増殖率が向上した。その増殖率は、茎頂由来の茎葉の増殖率を凌いだ。しかし、葉片培養から茎葉伸長を経て初めて茎葉の分離・増殖を行ったのは、

Table 4. Shoot propagation by adventitious bud formation from leaf calli during four sub-cultures.

Callus number	No. of shoots produced			
	Subculture			
	first	second	third	fourth
1	15(1)	36(15)	29(25)	545(24)
2	5(1)	18(5)	16(15)	278(15)
3	5(1)	13(5)	11(10)	187(11)
4	3(1)	9(3)	2(2)	20(1)
5	19(1)	27(18)	6(5)	155(6)
Total	47(5)	103(46)	64(57)	1185(57)

First sub-culture was done after 170 days from initial leaf culture. Sub-culture was repeated every one month during four months.

Figures in the blankets show number of shoots cultured.

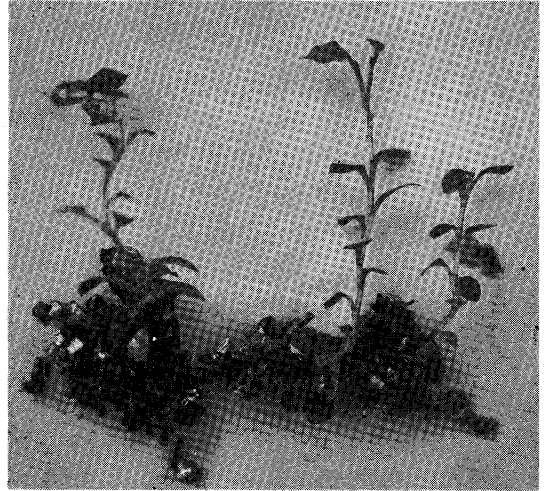


Fig. 3. Roots formation on the shoot cultured in vermiculite for five weeks after 24hr of IBA treatment under air ventilation.

Table 5. Effect of auxins on root formation in kalmia shoots obtained from shoot tips and leaf calli cultures.

Concentration (mg/l)	Root formation rate (%)	
	IBA	NAA
0	0	—
1	70	25
10	40	15
20	20	5
Control	0	—

20 shoots were used in each treatment.

Control; no air ventilation and no auxin treatment.

培養開始後190日目であり、茎頂由来の茎葉の約3倍を要した。

(3) 茎葉からの根の形成

IBA 1 mg/l 液中で通気処理後5週間目に、挿し木した茎葉の70%が、その基部から、長さ20 mm以上の数本の根を発生した (Fig. 3, Table 5)。一方、NAA処理での茎葉の発根率は0~40%であった。

発根した茎葉は、幼苗に生長した。

発根が難しいといわれる種類の植物は、個体内にフェノール様物質を含むことが多い。今回、培養中に茎葉からのフェノール様物質の滲み出しが、茎頂では3回目から、カルス経由の茎葉では2回目からの増殖培養で減少したと考えられ、このことが、発根処理による根の形成を促進したと思われる。

以上の結果から、屋外から得た外植体の除菌および

フェノール様物質の滲出の軽減に、前記の振盪処理が有効であること、茎頂からの茎葉増殖に BA が、葉片カルスからの茎葉の再分化には NAA と BA の組合せが、および IBA の通気処理が根の形成に有効であることがわかった。

また、カルスからの茎葉の増殖までの期間は茎頂の場合より長かったが、その後の増殖率は茎頂の場合より高くなった。さらに、増殖した茎葉には外見上、形態的な変化が認められなかったことから、本方法はカルミア大量増殖用に有効な手段と言える。

本実験を行うに当たり、適切など指導をいただいた同所細胞育種部長、大山勝夫博士に深謝するとともに、貴

重な文献をお送りくださった、農林水産省野菜・茶業試験場久留米分場、山口 聡博士、ならびにカルミアの穂木を提供していただいた、東京都農業試験場、加藤禎一主任研究員に感謝致します。

文 献

- 1) Economou, A. S., P. E. Reed, 1984. J. Hort. Sci., **60**: 269-274.
- 2) Lloyd, G., B. McCown, 1980. International Propagators Society Combined Proceedings, **30**: 421-427.
- 3) 山口 聡, 1986. 農業及び園芸, **61**: 599-604, 700-704.

Summary

Micropropagation through Shoot Tip and Leaf-derived Callus Culture in *Kalmia* (*Kalmia latifolia* L.)

Hirokatsu SUDA*, Sueo ENOMOTO** and Kousuke NAKAJIMA**

* Tokyo Metropolitan Isotope Research Center, Fukasawa, Setagaya, Tokyo 158

** National Institute of Agrobiological Resources, Tsukuba, Ibaraki 305

Shoot tips and leaf segments taken from outdoors were sterilized intensely, and leaf segments cultured for 72 hr on gyratory shaker to reduce phenol-like substances. The basal medium was Woody Plant medium solidified by Gellan-gum. When phenol-like substances exuded out, explants were transferred on the same medium.

Shoot tips produced adventitious shoot on the medium containing 1 mg/l BA. After 4 months of culture, 5 shoot tips turned to be 5,650 shoots.

Leaf-derived calli induced on the medium containing 2,4-D and BA were divided and cultured on the medium containing 0.1 to 5 mg/l BA and 0.1 mg/l NAA. Shoots were obtained on these calli and propagated three times on the medium containing 1 mg/l BA. After 4 months, 1,185 shoots were obtained from 5 pieces of leaf derived calli.

For root formation, shoots were dipped in the ventilated solution containing 1 mg/l IBA for 24 hr, and cultured in vermiculite by cuttage. After 5 weeks, 70% of shoots rooted to be juvenile plants.