

ハスの組織培養(1)

| | |
|-------|--------------------------------------------------------------------------|
| 誌名 | 山口県農業試験場研究報告 = Bulletin of the Yamaguchi Agricultural Experiment Station |
| ISSN | 03889327 |
| 著者 | 山本, 雄慈 松本, 理 |
| 巻/号 | 40号 |
| 掲載ページ | p. 44-48 |
| 発行年月 | 1988年3月 |

ハスの組織培養(第1報) 生長点からの苗条誘導

山本雄慈・松本 理

Tissue Culture of Lotus (*Nelumbo nucifera* GAERTN) I. Culture media for inducing plantlet from apical meristem

Yuji YAMAMOTO and Osamu MATSUMOTO

Abstract. Plantlet have been raised successfully *in vitro* by culturing meristems excised from rhizome bud of *Nelumbo nucifera* GAERTN. Enlargement of leaf primodium and bract was observed on the medium containing 0.2mg/ℓ NAA and 0.2mg/ℓ BA. These enlarged tissues were transferred to the MS liquid medium containing 0.2mg/ℓ BA for leaf development and next to MS agar and liquid double layer medium containing 0.2mg/ℓ NAA and 0.02mg/ℓ BA for rooting.

緒 言

生長点培養はイチゴをはじめ多くの植物でウイルスフリー苗を得るために利用されている。ハスのウイルス病は1978年に我国で発見された報告⁸⁾がある。栽培種のウイルス汚染状況は不明であるが、栄養繁殖性作物であるためウイルスの汚染が問題となり、将来ウイルスフリー苗の生産が必要となることが考えられる。また、植物体を無菌化して培養系に取り込む生長点培養は、カルスからの再分化に比べて変異が少ないことから、優良系統の大量増殖の第1段階として用いられている²⁾。さらに、生長点や生長点培養によって得られた幼植物は培養系での育種の素材として利用されている⁶⁾。

ハスの組織培養については長島の報告⁷⁾があり、地下茎の頂芽の第1苞および第2苞を除去し、第1葉節から切断したものを培養し培養器内で幼植物を得ている。しかし、この場合の外植片は10~20mm程度と考えられ、この大きさの組織ではウイルスの除去は困難¹⁾と考えられる。

本実験はハスのウイルスフリー化や大量増殖に必要とされる生長点培養法を確立するために実施した。

材料および方法

ハス (*Nelumbo nucifera* GAERTN) の支那種を

供試した。地下茎の頂部15~20mmを切り取り中性洗剤及び流水で洗浄し、70%エタノールで30秒間、Tween 20を加え20倍に希釈した次亜塩素酸ナトリウム溶液(活性塩素0.25%)で30分間それぞれ殺菌後滅菌水で数回洗浄した。次に、実体顕微鏡下で生長点を取り囲んでいる苞、葉原基を外側から順次取り除き生長点に葉原基1個を付けて頂芽及び側芽を切り取り培地に置床した。

培地はMS (Murashige & Skoog) 培地⁵⁾を基本とし、これにしょ糖3%とホルモンを加え、NaOHおよびHClでpH 5.8に調整して培養容器に分注後120℃15分間滅菌した。液体及び寒天培地を用い、寒天培地では寒天濃度を0.8%とした。生長点置床用培地ではホルモンの組合せについてBA(6-Benzylaminopurine)と三種類のオーキシン、NAA(α -Naphthaleneacetic acid), 2,4-D(2,4-Dichlorophenoxyacetic acid), IAA(3-Indoleacetic acid)を種々の濃度で組合せて用いた。培地は15mmφの試験管に10ml、25mmφの試験管では15mlずつ分注した。次に、葉展開用培地、発根増殖用培地についてはホルモン組成など培地条件の検討をおこなった。この時GA(Gibberellic acid)は加圧滅菌後滅菌フィルターを通して添加した。葉展開用培地は液体培地とし15mmφの試験管に15mlずつ分注した。生育した植物体は同様の培地を入れた150mlガラ

ス容器に継代した。さらに発根、増殖のためホルモンと活性炭 0.05% を加えた寒天培地上に同様のホルモンを含み、活性炭を除いた液体培地を重層した 800 ml ポリエチレン容器へ継代した。

培養に用いる芽の採取時期について検討するため、採取を休眠期の 2 月と 11 月及び生育期の 4, 5, 6, 8 月におこない、採取後ただちに生長点置床用培地に置床した。

培養条件はいずれも 25℃, 5,000 lux, 18 時間日長条件下で回転培養, 静置培養のそれぞれをおこなった。

結果と考察

1. 生長点置床用培地

培地条件を検討するためにホルモンとして NAA 0 ~ 0.5 mg/l, BA 0 ~ 10 mg/l を組合せて添加した寒天培地での培養をおこなった。その結果, ホルモン無添加の培地では葉原基がわずかに緑化肥大する個体が少数ながら見られたが以後褐変枯死した。しかしホルモンを添加した培地ではいずれも緑化肥大個体が多く, ホルモンの添加を必要とする結果を得た。しかし, 生育は遅く培養期間が長くなるにしたがい多くの個体は外側から褐変した。植物組織の褐変はポリフェノール物質の酸化による場合⁴⁾が多く, 組織培養ではしばしば問題となる。そこで外植

片が空気に接触しない液体培養との比較をおこなった。その結果, 第 1 表に示すように置床 1 ヶ月後の液体回転培養では寒天培養に比べ生育は著しく優れた。次に, 液体培地でのオーキシシンとサイトカイニンの組合せ及び濃度について検討した。NAA と BA のそれぞれ 0 ~ 4 mg/l の組合せで試験をおこなった結果, 第 2 表に示すように NAA 0.02 ~ 0.2 mg/l, BA 0.02 ~ 0.2 mg/l の範囲で生育が良好であった。また, 第 3 表に示すように他のオーキシシンについては IAA 1 mg/l, 2,4-D 0.2 mg/l でも NAA 0.2 mg/l と同程度の生育を示すことが明らかになった。

生長点の採取, 置床時期では第 4 表に示すようにハスが圃場で旺盛な生育をする茎葉生育期に置床した方が生育が良く, 休眠期のハスの頂芽や側芽を培養したものは生育が不良であったり全く生育しなかった。

2. 葉展開用培地

第 1 図, A に示すように生長点の置床から 4 ~ 5 週間後, NAA 0.2 mg/l, BA 0.2 mg/l の組合せで大部分の個体は葉原基及び苞が 10 ~ 20 mm の長さに伸長肥大した。しかし, このままの状態で培養を続けると組織は異常な形に肥厚し, 葉の展開が見られないままついには褐変枯死した。このため継代培地について検討した。その結果

Table 1. Comparison of culture method on meristem growth

| Culture method | Growth | | | | Numbers of inoculated |
|-------------------------|--------|---|----|-----|-----------------------|
| | - | + | ++ | +++ | |
| Liquid rotary culture | 0 | 1 | 1 | 8 | 10 |
| Agar stationary culture | 0 | 4 | 6 | 0 | 10 |

Medium: MS medium containing 0.2 mg/l NAA and 0.2 mg/l BA with/or without 0.8% Agar. The meristems were inoculated on 28 th. May. 1986 and scored the growth on 20 th. Jun. Growth: - (no) ~ +++ (good)

Table 2. Effects of concentrations of hormones on meristem growth

| NAA (mg/l) | BA (mg/l) | | 0 | | 0.02 | | 0.2 | | 2.0 | | 4.0 | |
|------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | - ^z | nt ^y | - ^z | nt ^y | - ^z | nt ^y | - ^z | nt ^y | - ^z | nt ^y | nt ^z | nt ^y |
| 0 | - ^z | nt ^y | - ^z | nt ^y | - ^z | nt ^y | - ^z | nt ^y | - ^z | nt ^y | nt ^z | nt ^y |
| 0.02 | + | + | + | + | + | ++ | - | ++ | - | ++ | nt | + |
| 0.2 | ++ | + | ++ | ++ | ++ | ++ | + | ++ | + | ++ | nt | - |
| 2.0 | ++ | + | ++ | - | ++ | - | + | - | + | - | nt | - |
| 4.0 | nt | - | + | + | + | + | nt | ++ | nt | ++ | nt | - |

The meristems were inoculated on 8th. Jun(z) & 20th. Jul (y). 1986 and scored the growth after 30 days. Growth: The same as in Table 1. nt: Not tested.

Table 3. Effects of individual Auxins and BA combination on meristem growth

| Hormon combinations (mg/l) | Growth | | | | Numbers of inoculated |
|---------------------------------------------|--------|---|----|-----|-----------------------|
| | - | + | ++ | +++ | |
| NAA 0.2 ^z BA 0.2 | 0 | 1 | 8 | 6 | 15 |
| IAA 1.0 ^z BA 0.2 | 0 | 3 | 4 | 8 | 15 |
| NAA 0.2 ^y BA 0.2 | 0 | 1 | 1 | 8 | 10 |
| 2,4-D 0.2 ^y BA 0.2 | 0 | 0 | 3 | 7 | 10 |
| NAA 0.2 ^y 2,4-D 0.2 BA 0.2 | 0 | 1 | 1 | 8 | 10 |

The meristems were inoculated on 14th. Jun (z) & 12th. Apr (y). 1986 and scored the growth after 30 days. Growth: The same as in Table 1.

Table 4. Influence of inoculated season on meristem growth

| Seasons of inoculated | Numbers of survived | Numbers of died | Numbers of inoculated |
|-----------------------|---------------------|-----------------|-----------------------|
| 6th Nov. 1985 | 3 | 80 | 83 |
| 12th Feb. 1985 | 43 | 57 | 100 |
| 11th Apr. 1986 | 28 | 2 | 30 |
| 20th May. 1986 | 20 | 0 | 20 |
| 19th Jun. 1986 | 26 | 4 | 30 |
| 15th Aug. 1986 | 45 | 5 | 50 |

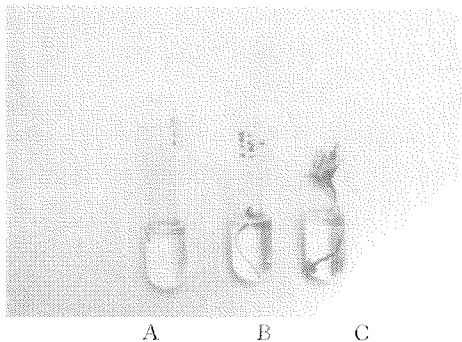


Fig. 1. Meristem growth on liquid rotary culture. A: 30 days after inoculated. B: 20 days after transfer to media for leaf emerging. C: The same as 30 days after.

第1図, B Cに示すように生長点置床用培地からNAAを除いたBA 0.2 mg/l 単独添加培地で第1葉目の伸長が認められた。液体培地への継代では継代後2~3日で生育が始まり葉柄が伸び始めるが, 同様のホルモン濃度の寒天培地への継代では生育が遅く全個体が枯死した。

次に, BA 0.2 mg/l を含む培地へのGAの添加効果については第5表及び第2図に示すようにGAを加えることにより出葉が促進され, 全個体で葉身の伸長が見られた。これに対して, BA単独添加では葉身の伸長が認められない個体もあった。しかし, GAを加え長期間培養すると展開してくる葉の葉柄が極端に細くなるためさらにGAの濃度, 培養期間の検討が必要と考えられる。

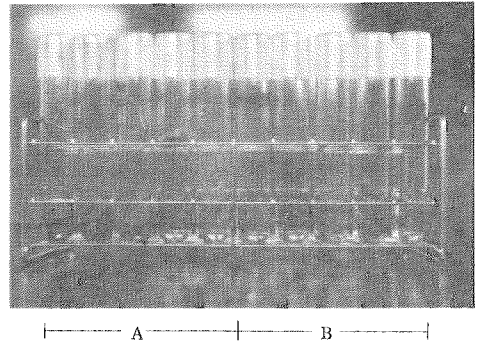


Fig. 2. Effect of GA on leaf emerging

A: BA 0.2 mg/l, GA 5 mg/l.

B: BA 0.2 mg/l 20 days after transfer to individual medium.

Meristems were precultured on the medium containing NAA 0.2 mg/l and BA 0.2 mg/l.

Table 5. Effects of hormone concentrations on emerging leaf number

| Media | Hormons (mg/l) | Numbers of leaves | | | | Numbers of inoculated |
|------------|----------------|-------------------|----|---|---|-----------------------|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | |
| Liquid | BA 0.2 | 5 | 13 | 2 | 0 | 20 |
| Liquid | BA 0.2 GA 5 | 0 | 12 | 6 | 2 | 20 |
| Agar | BA 0.2 | 20 | 0 | 0 | 0 | 20 |
| Paper wick | Free | 20 | 0 | 0 | 0 | 20 |

BA 0.2 mg/l 単独あるいはこれにGAを加えた培地で4~5週間培養すると葉柄が伸長し新たな出葉もあり植物体が大きくなるため, 試験管からガラス容器に継代し静置培養した。この状態で葉が次々に展開し, その後一部

の個体からは発根も見られた。

3. 発根, 増殖用培地

第3~4葉目が展開した段階で発根を促進しさらに増殖をおこなうための培地について検討した。その結果, NAA 0.2 mg/l, BA 0.02 mg/l, 活性炭 0.05%を加えた寒天培地の上に同様のホルモンを含み, 活性炭を除いた液体培地を重層した培地が適した。BA濃度を低下させたこの培地では発根が良好で葉も連続して展開し, 茎の伸長も認められ第3図に示すように完全な苗条が得られた。ここでも寒天培地だけでは液体培地からの継代に伴って枯死する個体が多かった。

発根した苗条はホルモン無添加の培地でも良く生育し, 3週間程度で2~3個体に分割し増殖することが可能であった。

ハスの培養では頂芽培養の報告⁷⁾がある。長島はKnop

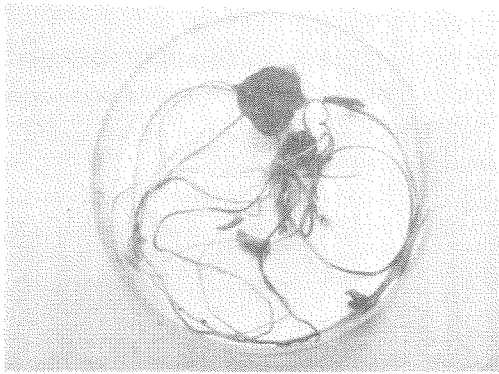


Fig. 3. Plantlet, formed from meristem.

及びMS培地を一部改変しGA 0.1 ppmを添加した寒天培地で地下茎の頂芽を培養し幼植物を得ている。本実験の結果と異なるがこの場合の外植片は10~20 mm程度と大きく, 内部に葉原基3~4個を含む組織で試験管内でのさし芽とも考えられる。外植片が大きい培地へのオーキシン, サイトカイニンの添加を必要とせずまた寒天培地でも生育したのと考えられる。

本実験でおこなった生長点培養では, ホルモンとして初期生育にはオーキシンとサイトカイニンが必要であり, 以後も生育の段階に合わせてホルモンの種類と濃度を変えていく必要がある。生長点培養ではイチゴやジャガイモのように培地へのホルモン添加を必要としない植物もある¹⁾が, ハスは発根した苗条が得られるまでホルモンの添加が必要であった。

生育は培養のどの過程でも液体培地と接触した状態で優れた。これは寒天培地に比べ液体培地の方が組織との接触面積が大きいこと。またハスでは完全な植物体に生長するまで組織が培地外に出て空気に触れると褐変し易く, 褐変すると生育が停滞し, やがて枯死することが原因と考えられる。さらに苗条にまで生育したものではハスが水生の植物であり植物体の大きさに比べて根の生育が貧弱であること, また本来生育期間中に常に潤沢な水分を必要とすることから液体培地が適するものと考えられる。

4. 順化

一般に培養した幼植物は滅菌土を入れたポットに鉢上げして順化される³⁾。ハスではこの方法では全個体が枯死した。このためハスが圃場で生育している状態と同じよ

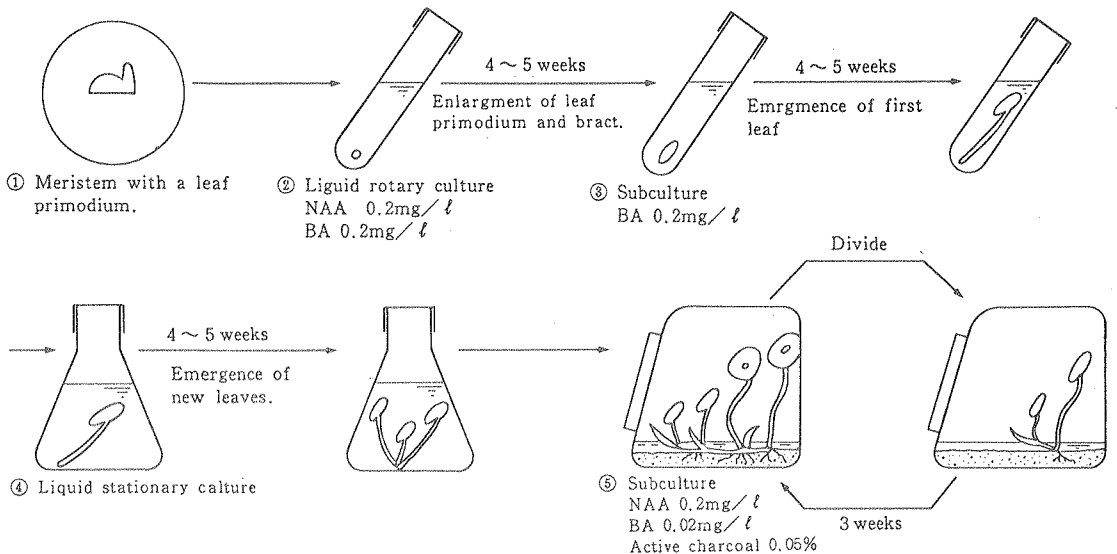


Fig. 4. Schematic representation of the meristem culture of Lotus.

うに滅菌した土壌の上に水を張り、この中に地下茎を数節形成した幼植物を植えたところ約半数が活着した。

以上の結果から第4図に示すハスの生長点培養法を確立した。今後順化過程における活着率の向上、大量増殖法の研究を進める必要がある。

摘 要

1. ハスの生長点培養では液体培地が適した。
2. 生長点置床用培地にはNAA0.02～0.2 mg/l, BA 0.02～0.2 mg/l 添加培地が適した。
3. 葉展開用培地はBA0.2 mg/l 添加培地が良く、GAを加えることによりさらに生育が促進された。
4. 発根増殖用培地はNAA0.2 mg/l, BA0.02 mg/l, 活性炭0.05%を加えた寒天培地の上に同様のホルモンを含み活性炭を除いた培地を重ねる方法が適した。
5. 生長点の採取、置床は4～8月の茎葉生育期が良かった。

引 用 文 献

- 1) 原田宏・駒嶺穆：植物細胞組織培養；119—160 P. 1982.
- 2) Reinert, J. & Y. P. S. Bajaj : Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue, and Organ Culture : 138—143. 1977.
- 3) 加古舜治：園芸植物の器官と組織の培養：165—167. 1985.
- 4) 向山武彦：ランの生長点培養の実際。植物の化学調節17：77—84. 1982.
- 5) Murashige, T. & Skoog F. : A revised medium for rapid growth and bioassays with Tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15 : 473—497. 1962.
- 6) 宮崎貞己・田代洋丞・金澤幸三・松本弘幸：サトイモの培養茎頂のコルヒチン処理による倍数体の作出と倍数体の特性。佐賀大農彙59 37—45. 1985.
- 7) 長島時子：ハスの頂芽培養に関する実験 — とくに頂芽第1葉および第2葉に及ぼす糖の影響。恵泉女学園短期大学研究紀要9：69—80. 1976.
- 8) 山下修一・岡本康博・藤井新太郎・土居養二・興良清：ハスのえそ条斑病から見出されたRhabdovirus—ハス条斑ウイルス(Lotus streak virus) (仮称) について。日植病報44；61. 1978.