

組織培養による山菜・観賞用野草の大量増殖と 簡易育苗システムの開発

—タラノキ，アシタバ，セリ，サクラソウを例にして—

キーワード：タラノキ，アシタバ，セリ，サクラソウ，組織培養，大量増殖，根，不定芽，不定胚，*in vitro*，培養幼植物体，固体支持材，順化，育苗

古 谷 博

— 2005 年 —

目 次

緒 言	1
第 I 章 タラノキの根組織培養による種苗生産技術の確立	4
第 1 節 培養体由来根組織からの不定芽，不定胚形成および植物体再生	4
材料および方法	4
結果および考察	6
第 2 節 培養体の <i>in vitro</i> 増殖ならびに植物体再生	13
材料および方法	13
結果および考察	15
第 3 節 固体支持材・培養液の種類が培養幼植物体の生長および順化に及ぼす影響	20
材料および方法	21
結果	23
考察	26
第 4 節 品種間差異および培養苗の実用性	27
材料および方法	27
結果および考察	29
第 5 節 根組織培養苗の生産コスト試算	35
試算方法	35
結果および考察	36
第 II 章 アシタバの根組織培養による種苗生産技術の確立	41
—培養体由来根組織からの不定胚誘導および植物体再生—	
材料および方法	41
結果および考察	43

第Ⅲ章 セリの根組織培養による種苗生産技術の確立	49
—培養体由来根組織からの不定胚誘導による増殖—	
材料および方法.....	49
結果および考察.....	50
第Ⅳ章 サクラソウの根組織培養による種苗生産技術の確立	57
—培養体由来根組織培養による <i>in vitro</i> 繁殖—	
材料および方法.....	57
結果.....	59
考察.....	64
総合考察	67
摘 要	77
謝 辞	81
引用文献	82
Summary.....	92

緒 言

広島県は山が多く平坦な農地は少ないが、気候面では夏季冷涼な中国山地から無霜地帯の瀬戸内海島嶼部まで多様性に富んでおり、多くの特産作物が栽培されている。しかし、農業生産基盤に恵まれない島嶼部地域や中山間地域では、担い手の高齢化や耕作意欲の減退により荒廃した農地の増加が問題となっている。このままでは地域農業が消滅してしまう恐れがあり、これに対応するためには各地域の特色を生かした特産作物の開発が必要であり、行政の重要な課題である。

近年、中四国地方の中山間地域では、地域に自生する未利用植物資源を積極的に活用し、地域の特産作物として振興する取り組みが行われ(中西・土井, 1997)、また、過疎化と高齢化の進む地域では、農地の荒廃防止のために遊休農地の有効利用や地域固有の特産作物や山野草等の地域植物資源を活用する技術開発が強く求められている。併せて最近では、新鮮で安全な食品を求める傾向が強く、特に、自然を感じさせる山菜類が機能性成分を含んでいること等からも注目されてきている。

バイオブームの時代には全国各地で地域農業振興へ組織培養技術を役立てる試みが、多くの作物で取り生まれ、栄養繁殖性作物のウイルスフリー苗や花きや観葉植物のクローン苗等で実用化しているが、近年は種苗生産に係わる人件費の高騰や組織体制の悪化に伴う生産意欲の低下等から育苗センターの運営が主要産地でも難しくなっている。このような状況の中で、今後、組織培養技術を地域活性化に役立てるためには、計画段階から確立した培養技術を何処で誰が使うのかを考え、行政と地元が一体となって技術開発することが大切である。すなわち、組織培養による種苗生産を実用化するためには、組織切片から大量に培養体が得られ、安定して簡単に再生植物を育成できる培養系の確立が必要である。次に、再生植物の順化と育苗過程においては低コスト化、省力化および簡易化を図らねばならない。培養苗の低コスト化は、増殖率の向上とともに、確立した手法を誰が何処で行うかということにも関わる問題であり、それを解決しなければ地域農業の現場に組織培養技術を役立てることはできない。また、組織培養による種苗の大量増殖技術は、専用の培養施設が必要であり、専門的知識を有する人材が必要である上に、経済的にも採算がとれないと地域特産作物生産への普及は難しい。そこで、農家への普及(技術移転)が可能で、しかも操作が簡単な種苗生産システムの確立を図らねば実用化は難しいと考える。

植物の組織培養は、植物体の一部を母体から分離し、これを適当な条件下で無菌的に培養し生育させる技術と White(1936)により定義されている。高等植物では、植物体を構成するどの細胞からでも新たに植物体を再生させることができるという能力で、全形成能または分化全能性とよんでいる。これは、Haberlandt(1902)がムラサキツユクサの葉肉や表皮細胞の培養を試みたことから始まり、White(1934, 1939)によるトマトとタバコのカルス培養を経て、1950年代になって Skoog・Miller(1957)がそれを引継いでカルスからの莖葉や根の分化実験を行った。同じ時期に、Reinert(1958)あるいは Stewardら(1958)により、ニンジンの遊離単細胞を用いて胚発生的あるいは形態形成的な一定の方向に沿った細胞分裂を誘起し、寒天培地で培養すると1個の植物体に生育することが報告されるに至った。ここに、植物細胞の分化全能性が証明された。一方、植物体自体の生長点(莖頂)培養は、アスパラガスで最初に報告(Loo, 1945)され、若莖の先端部を培養し発根させて小植物体を得られている。その後、Morel・Martin(1952)による莖頂培養によるウイルスフリー化や Murashige・

Skoog(1962), Linsmaier・Skoog(1965), Gamborgら(1968)による培地の改良等が報告され、今日の基本的な培養技術が確立された結果、組織培養できる植物の種類が増加した。また、効率的な増殖を目的にカルス培養(Caplin・Steward, 1948), 多芽体(Morel, 1960), 不定胚形成(Reinert, 1958; Stewardら, 1958)による増殖法の研究も行われるようになった(加古, 1985)。

なお、不定胚とは、受精胚と同様な形態的变化の過程をとって植物の体細胞から生ずる一種の胚(岩波生物学辞典)であり、植物の細胞や組織を特定の条件で培養すると形成される場合がある。世界で最初に不定胚誘導に成功したのは、Reinert(1958)と、Stewardら(1958)によるニンジンの根の培養細胞からである。1975年までの不定胚誘導の成功例は、セリ科の8種以外に双子葉植物で13種と単子葉植物で2種の合計23種にすぎなかった(Ammirato, 1982)が、1980年前後から不定胚誘導の研究が急速に進み、1990年までに少なくとも200種以上の植物種で組織培養による不定胚誘導の報告がされている(西村ら, 1990)。その内、農業・園芸作物で報告された例としては、ニンジン、パセリ、セルリー、ペチュニア、オレンジ、タバコ、ブドウ、コーヒー、ワタ、アルファルファ、アスパラガス、ワサビ、イネ、コムギ、トウモロコシ、オーチャードグラス、ダイズ、サツマイモ、ライムギ、タケ、メロン、トマトなどがある(嶋津・蔵田, 2002)。

山菜類の組織培養による増殖については、既にタラノキ(雨宮ら, 1992; 貝守, 1986; Yoshizawaら, 1994; Amamiya・Mochizuki, 2002), アシタバ(中原ら, 1991a, b; 遠藤・庄子, 1994), セリ(遠藤・庄子, 1994; 遠藤ら, 1987), ウド(山元, 1997; 野口, 1997; Leeら, 2002; 西平ら, 1998), シオデ(村山・井澤, 1988; 田沢・笹原, 1988; 田沢ら, 1990; 渡部ら, 1990; 吉野ら, 1991; Yamamoto・Oda, 1992; 黒田・川村, 1994; 山本, 1995; 川村・久島, 1995), フキ(森下ら, 1980; 矢部ら, 1986; 浅見ら, 1999), ワサビ(細木ら, 1986; 春木ら, 1988), モミジガサ(城守ら, 1989; 川村, 1992), ゼンマイ(橋本ら, 1989; 原田ら, 1993), ハマボウフウ(平佐・山田, 1994; 平井ら, 1995), ギボウシ(高樹・小松, 1995), ツワブキ(山本ら, 1999, 2000), オオナルコユリ(高橋ら, 2000), クサソテツ(井内ら, 1999)およびユキザサ(劉ら, 2000)等の報告がある。一方、山野草類の中には開発行為、園芸採取、植生変化等により、絶滅の危機にあるものや希少植物となっているものも多く、園芸的利用が可能な種類もある(加藤, 1998; 本間, 1998)。ラン科植物以外の宿根性山野草については、サクラソウ(松本ら, 1986; Yamamotoら, 1999), ハクサンコザクラ(Shimadaら, 1997), ミスミソウ(露木ら, 1989; Nomizuら, 2003), オオミスミソウ(村山・三位, 1981), エヒメアヤメ(古谷・池田, 1993; 渡辺ら, 1995), カタクリ(藤木ら, 1994; 古谷, 1995), センノウ類(古谷, 1997), イワタバコ(樋浦ら, 1993), カンアオイ(太田ら, 1993), キキョウ(Hosoki・Mochida, 1995; 霞ら, 1997), オミナエシ(Hosoki・Sakamoto, 1995), ホトトギス(Hosoki・Nishimoto, 1997; 和田・石井, 2000), シラネアオイ(鈴木ら, 1999, 2000; 近藤・小林, 2000; 石井ら, 2003), イワギリソウ(近重・名古, 1999)およびノカンゾウ(川村・吉村, 2002)についてそれぞれ培養系の確立や大量増殖に関する報告がある。

これらの報告では、外植体から直接あるいはカルス経由で不定芽・多芽体を誘導し、継代培養による増殖と発根培養を経て再生植物を得ており、いずれも種苗生産体系についての検討はほとんどの種類で行われていない。また、大量増殖の手法として最も効率的な不定胚誘導についての報告は、タラノキ、アシタバ、セリ、ウドおよびハマボウフウの種類に限られている。今後、大量増殖技術の効率化とともに農家へ導入可能な施設の簡易化、資材の節減および作業の合理化等により種

苗生産コストが削減できれば、組織培養による種苗生産は生産意欲の啓発と地域社会の維持的发展へ寄与することも考えられる(奥野ら, 1994a, b)。

以上のような背景から本研究は、組織培養を利用して未利用植物資源を地域振興に役立てる目的で計画したものである。本試験の対象にした植物の種類は、山菜のタラノキ、アシタバおよびセリの3種類と、観賞用野草のサクラソウである。

山菜の王様として需要があるタラノキは、県内二か所の地域で生産振興が図られており、一地域では農業公社が中心となって耕作放棄田への導入による農地の荒廃防止に役立てることが検討されている。他の地域は県内で最初にタラノキを導入した地域で、西日本一の産地化を目指して熱心な栽培が行われている。最近、機能性植物として全国的に注目されているアシタバは、伊豆諸島の特産として栽培されているが、瀬戸内海の島嶼部でも栽培が可能であることから導入が検討されている。セリは、現在は春の七草として利用されている程度で本格的な栽培はないが、不定胚誘導の試験報告の多いセリ科植物の供試材料として取り上げた。更に全国的に絶滅危惧種となっているサクラソウは、県内自生地でも個体数が減少していることから、培養苗による自生地の復元と共に鉢花としての園芸的利用が要望されている。

組織培養による大量増殖の基本的な手法は、前述したように植物細胞が有する分化全能性に基づいており大きく二通りに分けられる。一つは植物組織切片からの不定芽・不定根誘導と継代培養による腋芽増殖法で、現在、洋ラン、イチゴ、カーネーション等で実用化している茎頂培養による増殖苗やウイルスフリー苗もこれに当たる。茎頂培養による苗の生産は、生長点の摘出、置床、分割移植、発根等多くの熟練を要する作業から成り、その割に増殖効率はそれほど高くはない。他の方法は、カルス経由の不定胚形成を経て植物体を再生する方法で、増殖効率は高いが高度な技術が必要である。そこで、本研究は上記4種類の山菜・観賞用野草について、*in vitro* 培養体由来根組織からの不定芽・不定胚誘導による大量種苗増殖体系を確立し、中山間地域や島嶼部地域の活性化に役立てるために行ったものである。

本報告は鳥取大学大学院連合農学研究科に提出した学位論文である。

第 I 章 タラノキの根組織培養による種苗生産技術の確立

タラノキ (*Aralia elata* Seemann) は、ウコギ科の木本植物で北海道から九州まで日本全国の山野に広く分布する落葉低木樹である(佐竹, 1989)。昭和40年代から山梨県を中心に園芸作物化の研究がなされた結果、現在は全国的に栽培が普及し、タラノメは春の山菜の王様として珍重されている(藤嶋, 1988)。近年、中国地方の中山間地域では農地の荒廃防止を目的とした水田転作の新品目に、春の山菜の王様であるタラノメの導入を進め地域特産物として振興している集落がある。

タラノキの種苗生産は根伏せ繁殖で行われており、新規に栽培を計画する場合には母株養成圃が必要である(中山, 1980; 藤嶋, 1988)。また、栽培株から種根の採取が可能であるが、増殖率が低く、かつ断根による立枯疫病の発生等が問題で(内田ら, 1984)、新規導入地域における大量育苗には適さない。組織培養による大量増殖は、不定胚から植物体を再生すると増殖効率が低いことが知られており(高柳, 1988; 西村ら, 1990)、タラノキについては、新梢の葉柄切片からの不定胚誘導の報告(貝守, 1986; 雨宮ら, 1992; Yoshizawa ら, 1994)はあるが、不定胚の形成率は低く、実用化のためにはさらに効率の良い培養手法の開発が必要である。

第 1 節 培養体由来根組織からの不定芽, 不定胚形成および植物体再生

タラノキは根伏せ繁殖できるので、*in vitro*で生育した幼植物体の根組織切片を用いれば、滅菌することなしに多くの外植体を取り扱いき、効率的に植物体再生ができると思われる。そこで、本実験では根組織切片からのカルス形成とカルスからの不定芽, 不定胚形成並びに植物体再生について検討した。

材料および方法

タラノキ品種‘新駒’の新芽葉柄切片(図1)から、稲葉・吉川(1993)の手法を参考にして幼植物体を再生し、発根1~2か月後の*in vitro*培養体の根組織切片(長さ約1.5cm)を外植体として供試し、以下の実験を行った(図2, 図3)。

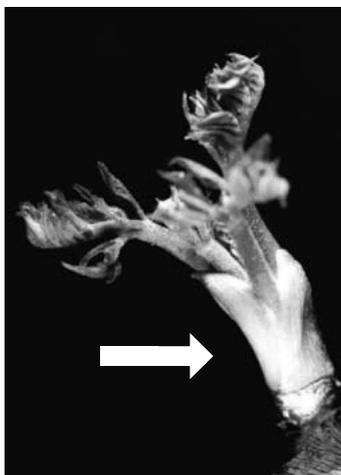


図1 葉柄切片培養
矢印部分の輪切り切片を外植体に用いる

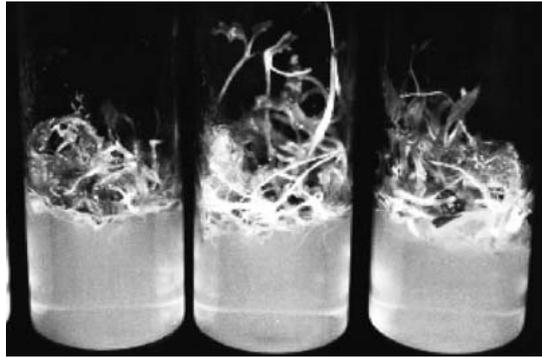


図2 葉柄切片からの *in vitro* 培養体



図3 葉柄切片からの再生植物

1. 根組織切片からのカルス、不定芽および不定胚形成に及ぼす 2,4-D 添加濃度の影響

培地は、Murashige・Skoog 培地(1962；以下 MS 培地)に 3% ショ糖，0.8% 寒天を加えたものを基本培地とし，これに異なる濃度の 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸(2,4-D)を添加したのち，pH5.7 に調整した。試験区は，2,4-D 0，0.01，0.05，0.1，0.5，1，2 および 4 mg/l を添加した 8 区を設けた。培養容器(高さ100mm×径25mm 試験管；培地量10ml)の培地上に外植体 3 個を置床し，試験区当たり 10 容器(外植体計 30 個)を供試して，2001 年 2 月 24 日と 3 月 17 日の 2 回繰り返して行った。外植体置床後は 25℃，暗黒下で培養を行い，30 日後に外植体から形成したカルスを同一容器の 2,4-D フリー培地へ移植(継代培養)した。2,4-D フリー培地に移植した後は，25℃，3,000lx(白色蛍光灯)，16 時間日長条件で培養を行った。

外植体を培地に置床した 30 日後にカルス形成率を，また，2,4-D フリー培地に移植 30 日後に不定芽形成率および不定胚形成率を調査した。カルス形成率(%)は，(カルスを形成した外植体数/供試外植体数)×100 で算出した。不定芽および不定胚形成率(%)は，(不定芽，不定胚を形成した外植体数/供試外植体数)×100 で算出した。なお，両端に芽と根の原基を持ち，外植体およびカルス組織から独立して形成した幼植物体を不定胚(西村ら，1990)と判断した。

2. 2,4-D 添加培地での培養期間が根組織切片からのカルス形成と、2,4-D フリー培地での継代培養後の不定芽および不定胚形成に及ぼす影響

試験は、2,4-D 1 mg/1 添加培地を入れた培養容器(高さ100mm×径25mm 試験管；培地量10ml)内の培地上に外植体3個を置床し、2,4-D フリー培地に移植するまでの培養期間について行った。すなわち、試験区として5, 10, 15, 20, 25, 30, 35日の7区を設け、区当たり10容器(外植体計30個)を供試して、2001年5月24日に行った。2,4-D 添加培地で所定の期間を経過した外植体は、同一容器の2,4-D フリー培地へ移植して継代培養した。

2,4-D 添加培地での培養および2,4-D フリー培地へ移植後の培養は実験1と同じ条件で行った。2,4-D 添加培地におけるカルス形成率および2,4-D フリー培地に移植し、継代培養30日後の外植体あるいはカルスから形成した不定根、不定芽および不定胚形成率を実験1と同様に調査した。

3. Embryogenic callus からの植物体再生および再生幼植物体からの不定胚形成に及ぼす2,4-D 添加濃度の影響

供試材料は、2,4-D 1 mg/1 添加培地で形成したカルスを、2,4-D フリー培地に移植して継代培養を行って得られた不定胚を形成し得るカルス(embryogenic callus, 以下EC；西村ら, 1990)を用いた。試験は、1で示した基本培地に、2,4-D 0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5および1 mg/1を添加した6区を設け、培養容器(高さ100mm×径25mm 試験管；培地量10ml)当たり径5 mm 集塊のEC(生体重約50mg)を移植し、試験区当たり10容器を用いて2001年11月13日と2002年5月24日の2回繰り返して行った。培養は、25℃, 3,000lx(白色蛍光灯), 16時間日長下で行った。培地へ移植して45日間継代培養後に、移植ECからの再生した幼植物体の生体重(不定胚・カルスを含む)と草丈が1 cm以上伸長した再生幼植物体数、および幼植物体の表面に形成した不定胚の形成率と移植EC当たりの不定胚形成数を調査した。不定胚の形成率(%)は、(不定胚を形成した再生幼植物体(容器数)/供試EC(容器数))×100で示し、不定胚形成数は、再生幼植物体の表面に形成した不定胚数/供試EC(容器数)で示した。

なお、再生植物はポリカーボネイト製容器(高さ100mm, 径80mm；培地量40ml)内で2か月間継代培養した後、パーミキュライトを詰めた育苗箱で2～3週間順化し、花崗岩風化土壌とバーク堆肥混合用土(容積比3:1, v/v)を用いてポット(7.5cm)に植え付けた。ビニールハウス内で養成した苗を2002年5月20日に圃場に定植し、6か月間栽培を行い落葉前に生育状況を調査した。

結果および考察

1. 根組織切片からのカルス、不定芽および不定胚形成に及ぼす2,4-D 添加濃度の影響

1) カルスおよび不定芽形成

外植体からのカルス形成率は、2,4-D 無添加区の30%に対し、2,4-D を添加した培地では、0.01 mg/1区が20%と差がなかったが、0.05mg/1以上の添加区では80～100%と著しく高かった(表1)。形成したカルスは淡黄色～茶褐色を呈し、ゼリー状で柔らかく、1～4 mg/1区ではカルスが外植体全体を覆っていた(図4)。

表1 2,4-D 添加濃度が根組織切片からのカルス, 不定芽および不定胚形成に及ぼす影響

2,4-D (mg/l)	外植体数 (個)	カルス 形成率 ^z (%)	不定芽 形成率 ^y (%)	不定芽 形成数 ^y (本/外植体)	不定胚 形成率 ^y (%)	不定胚 形成数 ^y (個/外植体)
0	30	30	70 ^x	4.0±0.9 ^w	0	—
0.01	30	20	65 ^x	3.6±0.5	0	—
0.05	30	80	15	4.8±0.6	0	—
0.1	30	85	10	4.3±0.5	0	—
0.5	30	90	55	3.4±0.4	45	50.5±1.8 ^w
1	30	100	90	2.7±0.4	63	50.9±3.4
2	30	100	20	2.5±0.5	90	59.8±6.8
4	30	100	0	—	100	27.3±5.9

^z 外植体置床30日後に調査

^y 2,4-D フリー培地へ移植し, 30日間継代培養後に調査

^x 外植体から直接形成

^w 平均値±SE.

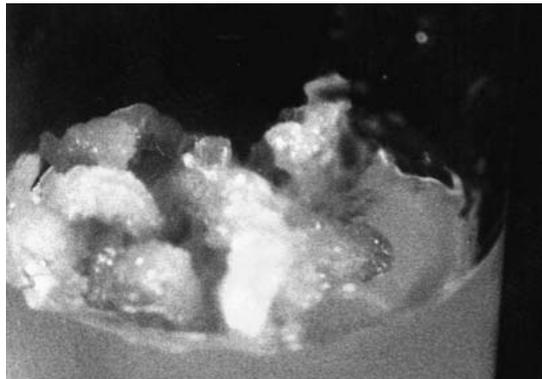


図4 2,4-D 添加培地で根切片から形成したカルス

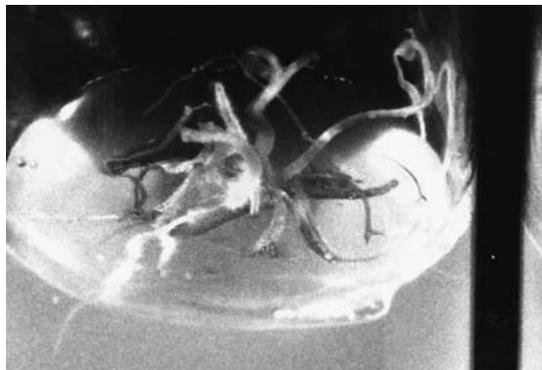


図5 フリー培地で根切片から直接形成した不定芽

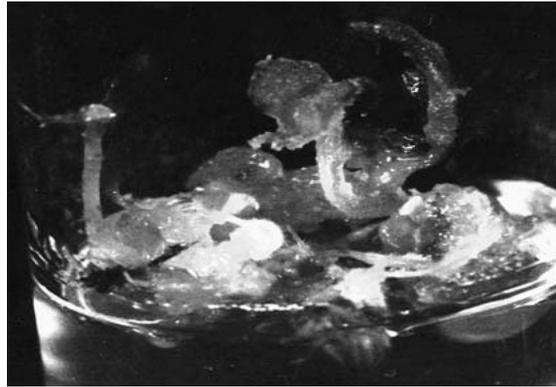


図6 2,4-D 添加培地で形成したカルスをフリー培地へ移植後形成した不定芽

次に、2,4-D フリー培地に継代した時の不定芽形成率をみると、無添加区と0.01mg/1区では70~65%の外植体から直接不定芽の形成が認められた(図5)。一方、0.05mg/1以上の添加区では、外植体表面に形成したカルスから不定芽の形成が認められた(図6)。その形成率は、1mg/1区が90%と高く、次いで0.5mg/1区の55%で、0.05, 0.1および2mg/1区は10~20%と低かった。1外植体当たりの不定芽形成数は、2,4-D 0.05mg/1区で最も高く、外植体当たり4.8本で、0.01, 0.5, 1および2mg/1区との間に有意な差が認められた。なお、4mg/1区では不定芽形成は認められなかった(表1)。

タラノキの葉柄切片からの植物体再生には、培地への2,4-Dとベンジルアデニン(BA)の添加効果が認められている(貝守, 1986)。また、根組織からの植物体再生について、シラカンバ(Vaarioら, 1995)ではBAと α -ナフトレン酢酸(NAA), ミヤマタタビ(劉ら, 1998)では2,4-DとZeatinをそれぞれ併用添加した培地で認められている。そこで、著者らは予備実験として、NAAとBAを併用添加した培地で根組織切片を培養したところ、すべての外植体がカルスを形成したが、そのカルスを植物生長調節物質を添加しない培地へ移植しても、カルスから不定芽は全く形成されなかった。次いで、2,4-Dの添加濃度について検討したところ、2,4-D 1mg/1添加した培地で形成したカルスを、2,4-Dフリー培地に移植して継代培養すれば高率に不定芽が形成されることが認められた(表1)。従って、タラノキの根組織からの不定芽形成は、NAAよりも2,4-Dが適しており、2,4-Dのみで高率に誘導できることからサイトカイニンの併用添加は必要ないものと思われた。

2) 不定胚形成

2,4-D 0.5mg/1以上添加した培地で形成したカルスを、2,4-Dフリー培地に移植して継代培養すると不定芽の形成と共にカルスから不定胚が誘導できた。不定胚は、黄白色で粒状を呈した柔らかくさわると容易にくずれるカルス、すなわち、Embryogenic callus; EC(図7)から形成され、外植体や不定芽とは明らかに区別できた。その形成率は、0.5mg/1区が45%、1mg/1区が63%で、2mg/1区が90%、4mg/1区が100%であった(表1)。

組織培養を用いた増殖法の中で、最も効率の良い増殖法は不定胚誘導法である(高柳, 1988; 西村ら, 1990)。不定胚は、最初オーキシン処理で外植体からカルス形成を導き、その後、オーキシンを含まない培地に移植することによって誘導できる(原田・駒嶺, 1989)。現在までに、根組織から

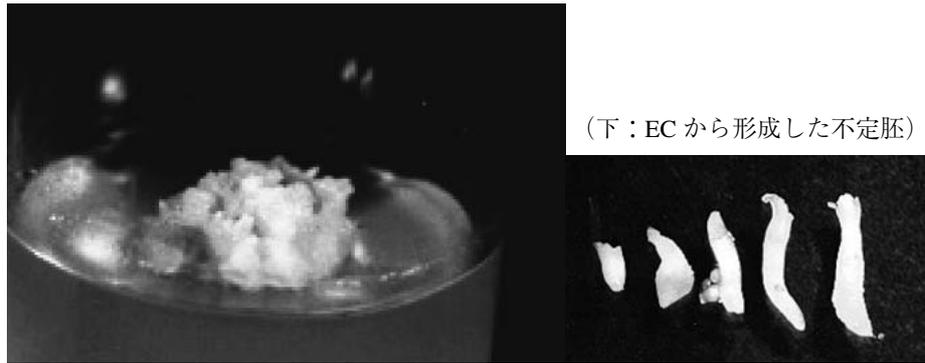


図7 2,4-D 添加培地で形成したカルスをフリー培地へ移植し，形成した EC



図8 根切片から不定胚を経由して再生した幼植物体

の不定胚誘導の報告例は少なく，シラカンバ(Vaario, 1995)，シオデ(吉野ら, 1991)では，BAとNAAの併用添加が有効であると報告されている。しかし，本実験の結果はこれらの報告と異なり，タラノキでは2,4-Dが不定胚誘導に有効であることが明らかになった。さらに，2,4-D添加培地で形成したカルスは，2,4-Dフリー培地に分割移植を繰り返して継代培養を行えば不定胚は発育し幼植物体となった(図8)。

劉ら(1998)は，ミヤマタタビの根組織切片培養において2,4-DとZeatinとを組み合わせで添加した培地で，形成率は低く，外植体当たりの形成数は少ないが，不定胚経由の植物体再生を認め，不定芽形成と不定胚形成が同時に起こることを報告している。タラノキでは，2,4-D単独培地で不定芽と不定胚が同時に形成されることが本実験において初めて見いだされた。

2. 2,4-D 添加培地での培養期間が根組織切片からのカルス形成と，2,4-Dフリー培地での継代培養後の不定芽および不定胚形成に及ぼす影響

1において，2,4-D添加培地で形成したカルスは2,4-Dフリー培地に移植して継代培養すれば不定胚が形成されることが明らかとなった。そこで，高率にしかも安定して不定胚を得るため，外植体からのカルス形成(脱分化)期間の影響について実験を行った。すなわち，外植体を2,4-D添加培地に置床し，所定期間培養後，2,4-Dフリー培地へ移植して30日間継代培養を行った(表2)。

その結果、外植体からのカルス形成は、5日間培養区では認められなかったが、10日間培養区は90%、15日間以上の培養区では100%の形成率であった。不定芽形成は、5日間培養区では20%の外植体から直接認められたが、10日間以上の培養区では形成したカルスから不定芽が形成した。その形成率は、10日間培養区は60%、15日間培養区は80%で、20日間以上の培養区では100%であった。不定胚形成は、15日間までの培養区では認められなかったが、20日間培養区で20%、25~35日間培養区では100%の形成率であった。従って、2,4-D添加培地での培養期間が短いと、不定根の形成率が高く、一方、その期間が長くなるとカルス、不定芽および不定胚の形成率が高くなることが分かった。

外植体のカルス化(脱分化)やカルスからの不定芽、不定胚形成(再分化)は、外植体やカルスの内生ホルモンに大きく影響される(原田・駒嶺, 1989)。貝守(1986)、雨宮ら(1992)によると、タラノキの葉柄切片から不定胚を誘導するためには、2か月間のカルス形成およびカルスの増殖期間が必要であると報告している。本実験で、ECを誘導するためには、根組織切片を完全に脱分化させる必要があり、そのための2,4-D添加培地での培養期間は25~30日間必要であることが明らかとなった。

ECの誘導は、不定胚を伴わないカルスを誘導するより長期間を要し、通常3か月程度を要する(西村ら, 1990)。本実験結果が、前記したタラノキの葉柄切片培養の報告よりも短いのは、供試した *in vitro* の根組織は、葉柄切片カルスから新しく発根し、1~2か月経過して3~5 cm 伸長した若い組織であり、内生ホルモンによる細胞分裂が盛んに行われるためと考えられる。なお、吉野ら(1991)は、シオデの根切片培養において根の先端部よりも基部から採取した外植体の方がシュート形成能は高いことを報告している。本実験では外植体の採取部位については検討しなかったが、今後、継代培養中の根組織の age(不定根形成からの経過期間)および外植体の採取部位が不定胚形成に及ぼす影響について検討する必要がある。

表2 2,4-D 1 mg/l 添加培地での培養期間が2,4-D フリー培地での継代培養後のカルス、不定根、不定芽および不定胚形成に及ぼす影響

2,4-D 添加培地での 1 mg/l 培養期間(日)	供試外植体数 (個)	形成率(%)			
		カルス ^z	不定根 ^y	不定芽 ^y	不定胚 ^y
5	30	0	100	20	0
10	30	90	90	60	0
15	30	100	100	80	0
20	30	100	30	100	20
25	30	100	0	100	100
30	30	100	0	100	100
35	30	100	0	100	100

^z 2,4-D 1 mg/l 添加培地で所定期間培養後、2,4-D フリー培地へ移植時に調査

^y 2,4-D フリー培地へ移植し、30日間継代培養後に調査

3. Embryogenic callus からの植物体再生および再生幼植物体からの不定胚形成に及ぼす2,4-D 添加濃度の影響

2において、2,4-D 1.0mg/l 添加培地で一定期間培養して得たカルスは、2,4-D フリー培地に移植して継代培養すれば不定胚が誘導できることが明らかとなった。不定胚形成の誘導は、分化して器官を形成している体細胞から EC を経由する間接法と、体細胞から直接誘導する直接法とに区別される (Williams・Maheswaran, 1986)。そこで、継代培養培地への2,4-D 添加濃度が EC からの不定胚形成と発育(植物体再生)および再生幼植物体からの不定胚形成に及ぼす影響について実験を行った(表3)。

2,4-D 0 mg/l 区および0.01~0.05mg/l 区に移植した EC は、45日間培養後に移植時の生体重(50mg)の約80倍(約4g)の幼植物体(不定胚を含む)に生育した。また、これらの試験区では、EC から形成した不定胚のほとんどが発育して幼植物体となり、草丈が1 cm 以上に伸長した個体数は移植 EC 当たり52~56本と多かった。

EC からの不定胚形成および形成した不定胚の発育は、移植培地の2,4-D の添加濃度が高いほど抑制される傾向が見られ、0.5mg/l 区と1 mg/l 区の再生幼植物体数は移植 EC (生体重50mg) 当たり5~6本と少なかった。また、0.05~1 mg/l 区では、再生幼植物体の生育に伴いその表面に不定胚の形成が70~80%と高率に認められ、肉眼で観察した不定胚の形成数は0.01mg/l 区と0.05mg/l 区が26.5~30.6個と他区に比べて多かった(図9)。

植物組織切片から、不定芽を形成して完全な再生植物体を得るためには発根が必要である。マタタビ(Sugawara ら, 1994)とサルナシ(劉ら, 1995)では NAA と BA の併用、ミヤママタタビ(劉ら, 1998)では NAA 単独で不定芽からの発根が認められている。しかし、不定胚は両端に芽と根の原基がそれぞれ存在し、生育の両極性があるため不定芽のように発根処理を行わなくても完全な植物体になる(西村ら, 1990; 嶋津・蔵田, 2002)。タラノキの根組織切片カルスから誘導した EC

表3 2,4-D フリー培地で継代培養後に誘導した EC からの植物体再生および再生幼植物体からの不定胚形成に及ぼす 2,4-D 添加濃度の影響^z

2,4-D (mg/l)	幼植物体生体重 ^y (g)	幼植物体数 ^x (本)	不定胚形成率 ^w (%)	不定胚形成数 ^w (個)
0	4.2±0.2 ^v	55.7±4.2 ^v	0	—
0.01	4.1±0.2	54.5±4.2	20	26.5±3.7 ^v
0.05	3.8±0.2	52.0±3.6	65	30.6±7.5
0.1	2.0±0.1	24.4±4.0	70	11.3±2.4
0.5	1.0±0.2	5.7±1.8	80	9.9±2.6
1	0.6±0.1	5.1±1.8	70	7.4±1.8

^z 各濃度の2,4-D 添加培地へ移植し、45日間継代培養後に調査

^y EC(生体重50mg)から再生した幼植物体(不定胚・カルスを含む)の生体重

^x 草丈が1 cm 以上伸長した再生個体数

^w 再生幼植物体の表面に形成した不定胚

^v 平均値±SE. (n=20)

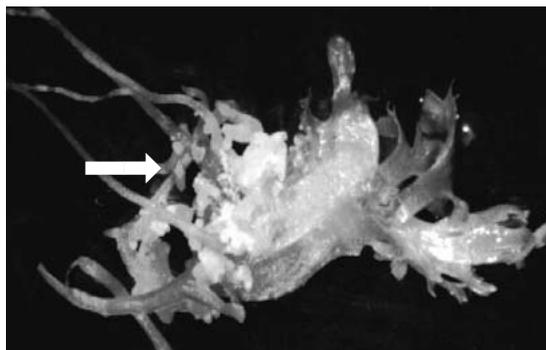


図9 再生幼植物体の表面に形成した直接不定胚

は、2,4-Dフリー培地に移植して継代培養を続ければ不定胚から生育した幼植物体は全ての個体で芽と根の伸長が認められた。一方、0.01~0.05mg/l 2,4-D添加培地で培養すると、再生幼植物体から不定胚が直接形成され、継代培養を行うことにより再生幼植物体数は増加した。

以上のように、本実験では *in vitro* 培養体の根組織切片から EC 経由の不定胚誘導と共に、再生幼植物体上に不定胚が形成し、増殖効率は一段と向上することが認められた。Kamada ら(1993, 1994)は、ニンジンの子葉切片培養において、浸透圧や熱ストレスを与えればカルス形成を経ることなく、外植体上に直接体細胞不定胚を誘導できると報告している。本実験では、根組織切片から再生した培養体の表面に不定胚が直接形成したことから再分化後の幼植物体は不定胚が形成し易いものと思われる。

in vitro 幼植物体の根組織切片を用いた不定胚誘導による増殖手法は、クリーンベンチ内での無菌操作(培養体の分割移植)を数回繰り返す簡単な方法なので、タラノキの急速大量増殖法として有効な培養系になり得ると考えられる。一方、組織培養苗の実用化に当たっては、培養変異についての検討が必要である。そこで、本実験で得た根組織切片からの再生植物(図8)を、バーミキュライトで順化後、ポットに植え付け45日間養成した。この苗木を現地圃場に定植して栽培した結果、茎葉の形態的変異は観察されず、従来の根伏せ繁殖苗と同等に生育し、10月下旬には茎長85~100 cm、茎径18mm、側芽数18個、頂芽径20mm となり、落葉後にはふかし栽培用の穂木が得られるまでに生育した。従って、種苗としての利用は可能であると思われる。

第2節 培養体の *in vitro* 増殖ならびに植物体再生

タラノキは、中山間地域における生産振興品目として注目されているが、新規導入畑への種苗供給には従来の根伏せ繁殖では増殖率が低く実用的でない。タラノキの組織培養による大量増殖は、既に報告(雨宮ら, 1992; 貝守, 1986; Yoshizawa ら, 1994)はあるが、種苗生産システムについての検討はされていない。そこで、著者は生産現場への技術移転が可能で、しかも操作が簡単な組織培養による大量種苗増殖体系の確立について試験を行い、培養体由来の根組織切片からの効率的な不定胚誘導法について報告した(第1節)。ここでは、根組織切片から誘導した培養体の *in vitro* 増殖ならびに植物体再生における培養条件について検討した。

材料および方法

1. 継代培養における培養体の増殖

タラノキ品種‘新駒’の *in vitro* 培養体の根組織切片から無菌培養系で誘導し、植物生長調節物質を添加しない MS 培地で継代培養中の培養体(図10, 図11-A)を分割したものを供試した。クリーンベンチ内の滅菌シャーレ上で分割(図11-B)した培養体は生体重を測定後、新しく作成した培地に移植し30日間培養(図11-C)を行い、その後の培養体の生体重と増殖倍率(30日間培養後の生体重/移植時の生体重)、幼植物体数およびシュートが伸長して順化可能な大きさに生育した再生個体数を調査した。なお、培養容器には試験管(高さ100mm×径25mm)を使用し、培地はいずれも pH5.7 に調整後、加熱溶解したものを10ml 分注して二重のアルミホイルで蓋をし、オートクレーブで滅菌して作成した。試験は、実験1) 以外は全て25℃, 3,000lx(白色蛍光灯), 16時間照明下の培養室内で行った。

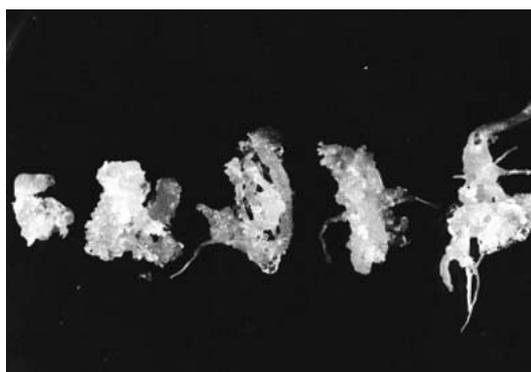


図10 供試材料

根組織切片から形成した培養体



図11 継代培養による培養体の増殖

A：根組織切片から誘導した培養体，B：培養体の分割移植，C：継代培養の状況

1) 培養温度の影響

根組織切片を、1.0mg/l 2,4-D 添加 MS 培地で30日間培養して得たカルスを2,4-D フリーの MS 培地(シヨ糖3%，寒天0.8%)に移植し、45日後に増殖した培養体を3mm 集塊(生体重 50 ± 5 mg)に分割して新しく作成した MS 培地に移植した。その後、光条件3,000lx(白色蛍光灯)、16時間照明の温度勾配人工気象器内で15、20、25、30℃区を設け、1区試験管10本の2反復で検討した。

2) 培地と固形化剤およびシヨ糖添加量の影響

継代培養中の培養体(生体重3～4.5g)を4分割して供試した。培地は、MS 培地と MS 培地の多量要素と微量要素を1/2、1/3、1/4にしたもの(以下、1/2 MS、1/3 MS、1/4 MS)および Hyponex(6.5-6-19) 4、3、2、1g/l 培地(以下、4 HP、3 HP、2 HP、1 HP)の計8区(いずれもシヨ糖3%，寒天0.8%)、固形化剤は、MS 培地(シヨ糖3%)で、寒天0.4、0.8、1.2%区とゲランガム0.1、0.2、0.3%区の計6区、また、シヨ糖添加量は、MS 培地(寒天0.8%)で、0、1、2、3、4%の5区をそれぞれ設けて1区試験管20本を供試して検討した。

3) 培養体の増殖推移

根組織切片を2,4-D 1.0mg/l 添加 MS 培地(シヨ糖3%，寒天0.8%)に置床し、1か月後に形成したカルスを2,4-D フリーの MS 培地(シヨ糖3%，寒天0.8%)に移植した。その後、1か月間隔で分割(2～4倍)・移植を6回繰り返し、順化可能な大きさの再生植物体に至るまでの間、培養体の増殖量(生体重、幼植物体数)を調査した。培養容器は、1回目から5回目までは試験管(高さ100mm×径25mm)を用い、6回目の最終培養はポリカーボネイト製の培養容器(高さ100mm×径80mm)を用いた。

2. 最終培養における培養体からの植物体再生

1の継代培養によりシュートが1～2cm 伸長した培養体(以下、培養幼植物集塊；生体重約1g)を供試し、25℃、3,000lx(白色蛍光灯)、16時間照明の培養室内で2か月間最終培養を行った。順化時に、培養容器当たりの順化可能な大きさに生長した幼植物体数と各容器5個体(試験区計50個体)の草丈、葉数および地上部生体重を調査した。

1) 培地成分とシヨ糖添加の影響

培地は、MS と 1/2 MS の成分に3%シヨ糖添加区と無添加区を設け、pH5.7に調整後、0.8%寒天を加えて加熱溶解したものを培養容器(ポリカーボネイト製：高さ100mm×径80mm)内に40ml 分注した後、オートクレーブで滅菌した。試験は、1区10容器を供試して2反復で行った。

2) 植物生長調節物質の種類と添加量の影響

培地は、MS(3%ショ糖)を基本に、植物生長調節物質を添加して pH5.7 に調整後、0.8%寒天を加えて加熱溶解し、培養容器(100ml 容広口フラスコ)に 30ml 分注し、二重のアルミホイルで蓋をした後、オートクレーブで滅菌して作成した。試験は、植物生長調節物質の種類と添加量について、オーキシンの indole-3-acetic acid (IAA : 0.1, 1.0, 5.0, 10.0mg/l) と gibberellin (GA : 0.5, 1.0, 5.0, 10.0mg/l) の計 8 区を設け、無添加区を加えて 1 区 10 容器を供試して行った。

結果および考察

1. 継代培養における培養体の増殖

1) 培養温度の影響

培養体を MS 培地に分割移植し、30日間培養後の増殖状況を表 4 に示した。増殖培養体の生体重は、25℃区が増殖倍率40.9と一番多く、次いで20℃区、15℃区、30℃区の順であった。容器当たりの幼植物体数は生体重と同様の傾向にあり、25℃区は24.8個、20℃区は22.8個、15℃区は18.0個、30℃区は13.4個であった。なお、15℃区、20℃区および25℃区では二次不定胚の形成が容器当たり7.7~11.7個認められたが、30℃区では認められなかった。

2) 培地と固形化剤およびショ糖添加量の影響

継代培養により増殖した培養体の生体重について、培地の種類および塩類濃度で比較すると、MS および HP とも塩類濃度が高いほど多く、試験した範囲内では MS 区が一番良く、30日間における増殖倍率は4.3倍であった。次いで3 HP 区と4 HP 区が2.9~3.1倍と高かった。1/2 MS 区、1/3 MS 区と2 HP 区はそれぞれ2~2.4倍でほぼ同等であった(表5)。次に、固形化剤は、寒天では0.4%区と0.8%区は差がなく増殖倍率は3.9~3.8倍と高かったが、1.2%区では少し劣り2.8倍であった。一方、ゲランガムでは0.2%区が4.1倍と一番高く、0.1%区と0.3%区は3.5倍と0.2%区より少し低かった(表6)。ショ糖添加量については多い方が培養体の生育が良く、3~4%区の増殖倍率は3.8~3.9倍であった。1%区では生育が劣り培養体の増殖量はほとんど無く、無添加区では葉色が白化し培養体の生育および増殖はほとんど見られなかった(表7)。

表 4 培養温度が培養体の増殖に及ぼす影響

培養温度 (℃)	培養後生体重 ^z a(mg)	増殖倍率 a/50(倍)	幼植物体数 ^y (個/容器)	草丈 (cm)	二次不定胚 形成数(個)
15	1035±161 ^x	20.7	18.0±2.0 ^x	1.1±0.1 ^x	7.7±1.5 ^x
20	1483±260	29.7	22.8±2.5	1.3±0.1	11.7±2.7
25	2044±298	40.9	24.8±3.2	1.4±0.1	9.4±2.0
30	835±106	16.7	13.4±2.8	1.0±0.1	0

^z 移植時生体重 : 50 ± 5 mg

^y シュートが0.5cm 以上伸長した個体数

^x 平均値 ± SE. (n=20)

表5 培地の種類が培養体の増殖に及ぼす影響

培地	移植時生体重 ^z a(g)	培養後生体重 ^y b(g)	増殖倍率 b/a(倍)
MS	4.2±0.3 ^x	18.1±1.2 ^x	4.3
1/2MS	4.2±0.3	10.1±1.0	2.4
1/3MS	3.9±0.2	8.2±0.8	2.1
1/4MS	4.5±0.2	3.6±0.6	1.5
4HP	4.2±0.2	13.0±0.6	3.1
3HP	4.1±0.2	11.9±0.9	2.9
2HP	4.1±0.3	8.2±0.6	2.0
1HP	4.4±0.2	6.6±0.4	1.5

^z 供試培養体(4分割前)

^y 30日間培養後(4分割分合計)

^x 平均値±SE.(n=20)

表6 固形化材の種類と添加量が培養体の増殖に及ぼす影響

固形化剤 ^z (%)	移植時生体重 ^y a(g)	培養後生体重 ^x b(g)	増殖倍率 b/a(倍)
A0.4	3.9±0.2 ^w	15.2±0.2 ^w	3.9
A0.8	4.3±0.2	16.3±0.2	3.8
A1.2	4.5±0.1	12.6±1.2	2.8
G0.1	4.5±0.1	15.8±0.3	3.5
G0.2	4.3±0.2	17.6±0.3	4.1
G0.3	4.2±0.2	14.7±0.2	3.5

^z A：寒天, G：ゲランガム

^y 供試培養体(4分割前)

^x 30日間培養後(4分割分合計)

^w 平均値±SE.(n=20)

表7 シヨ糖添加量が培養体の増殖に及ぼす影響

シヨ糖添加量 (%)	移植時生体重 ^z a(g)	培養後生体重 ^y b(g)	増殖倍率 b/a(倍)
0	3.3±0.2 ^x	3.6±0.0 ^x	1.1
1	3.3±0.3	6.9±1.6	2.1
2	3.4±0.2	10.5±1.3	3.1
3	3.5±0.2	13.3±1.4	3.8
4	3.4±0.2	13.3±1.0	3.9

^z 供試培養体(4分割前)

^y 30日間継代培養後(4分割分合計)

^x 平均値±SE.(n=20)

以上、根組織切片から誘導した培養体を *in vitro* で効率的に増殖するための培養条件について検討した結果、培地の養液濃度は MS 培地が良い、MS の組成を希釈すると培養体の生育が劣った。HP 培地でも養液濃度が高い(4 ~ 3 g/l)と生育が良かった。また、培地に添加するショ糖濃度は通常の3%が良い、固形化剤はゲランガム0.2%が最適であった。このことは、ニンジン(駒嶺・原田, 1989), アスパラガス(甲村・井本, 1994), シオデ(川村・久島, 1995)の不定胚や多芽体の増殖において培地に添加するショ糖濃度は通常2~3%が最適であると報告されている結果と一致した。また、下村・鎌田(1986)は、培地のゲル強度(重量/培地容量)は1%寒天と0.2%ゲランガムは同等であるが、センキュウ(*Cnidium officinale*)の茎頂培養により得た個体の容器内増殖では、ゲランガムの方が植物体の生長が促進されたと報告している。本試験においてもゲランガム0.2%区は寒天0.4~1.2%区より培養体の増殖倍率が優れることが認められた。

3) 培養体の増殖推移

外植体置床後1か月毎に分割(1, 2か月後は2倍, 3か月後は3倍, 4か月後以降は4倍)移植を繰り返し、継代培養による培養体の増殖量と移植時に観察した幼植物体数の増殖推移を図12に示した。培養体の生育に伴う幼植物体の形成は、外植体置床5か月後から確認でき、シュートの伸長と共に二次不定胚による増殖が認められ、1個の外植体由来のカルスから増殖・生育した幼植物体数は外植体置床5か月後に5,000個、6か月後に10,000個、7か月後の最終培養培地移植時には約23,000個(培養容器768個)となり、最終培養後には約41,000個の再生植物体を得られた。

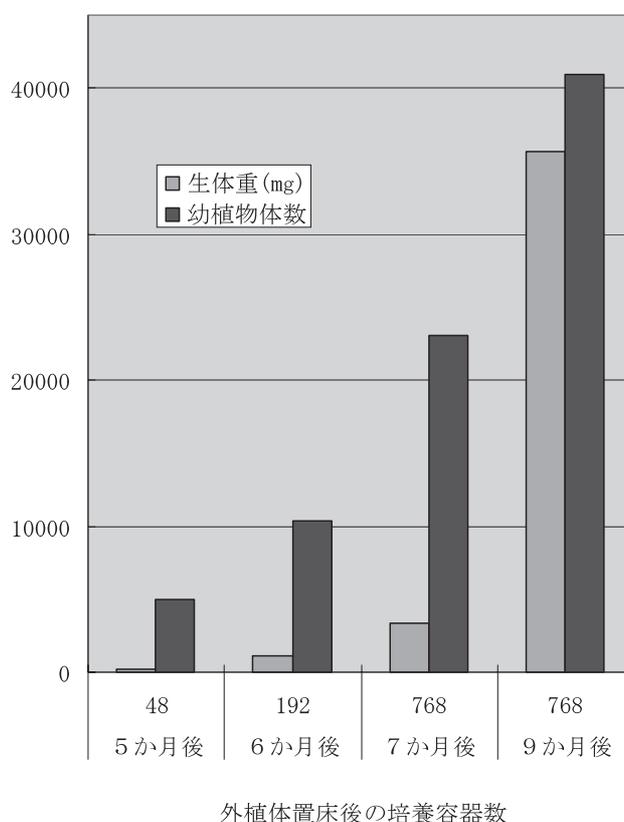


図12 *in vitro* 培養における培養体の増殖

大量増殖を目的とした植物組織培養技術は、大きく分類すると茎頂培養および腋芽形成法、不定芽・不定根誘導法および不定胚誘導法などがある(高柳, 1988)。この中で効率の良い増殖法は不定胚誘導法で、第1節で確立した手法はこれに当たり、アスパラガス(甲村・井本, 1994)やウド(Leeら, 2002; 西平ら, 1998)の既報と同様に増殖率は非常に高いことが確認できた。また、シオデでは茎頂培養と不定芽・不定根誘導を組み合わせた連続多芽体培養による種苗大量増殖法が確立(黒田・川村, 1994)されているが、本試験で確立した不定胚経由の培養体はピンセットで分割し新しい培地に移植を繰り返すだけで不定胚の増殖と幼植物体の伸長が同時に行われるので簡素化・効率化の点で多芽体分割よりも勝っている。また、連続腋芽培養による増殖率は奥野ら(1994a)のハカラシナの報告では2週間で4倍、3か月で約3,000倍ということからも、不定胚誘導による本手法の増殖率は非常に高いことが明らかである。

2. 最終培養における培養体からの植物体再生

1) 培地成分とシヨ糖添加の影響

シュートの伸長した培養幼植物集塊を最終培養培地に移植し、30日間培養後に順化可能な大きさとなった幼植物体数は、MSのシヨ糖添加区は培養容器当たり26.2個であった。1/2MSのシヨ糖添加区では14.3個と少なく、幼植物体の地上部重もMSより軽かった。これに対し、シヨ糖無添加区では培養体からのシュート伸長が認められず培養幼植物集塊の色も淡黄緑色で展開葉は白化し、根の伸長もほとんど認められず再生植物体は全く得られなかった(表8)。

古在(1998)は、培養容器中の明期の二酸化炭素濃度を大気中レベルに高めれば、培地に糖がなくても培養幼植物は十分に生育することを明らかにしている。しかし、本実験では、タラノキ根組織切片カルスから誘導した培養体のシュートが1~2cm伸長した幼植物集塊から再生植物を得るためには最終培養培地へのシヨ糖添加は必要であり、無糖では幼植物体は全く生育せずにほとんどの個体が白化し枯死した。この原因として、培養幼植物集塊の生育に必要な栄養(糖)が培地になく、密閉容器内の二酸化炭素濃度が長期間の培養により極端に低下していること、更に光強度(蛍光灯の本数)が少ないこと等が影響していると思われる。今後、培養容器の大型化による効率化・省力化や順化の簡略化を目的としたセル成型トレーによる育苗技術への発展を考えた場合には、無糖

表8 最終培養における培地の種類とシヨ糖添加が培養幼植物体の生育に及ぼす影響

培地	シヨ糖添加	幼植物体数 ^z (個/容器)	草丈 (cm)	葉数 (枚)	地上部生体重 (mg/個体)
MS	有	26.2±1.0 ^y	5.6±0.4 ^x	5.0±0.2 ^x	110±17 ^x
1/2MS	有	14.3±1.0	3.5±0.1	4.4±0.1	58±4
MS	無	0	—	—	—
1/2MS	無	0	—	—	—

^z シュートが2cm以上伸長した個体数

^y 平均値±SE. (n=20)

^x 平均値±SE. (n=50)

培養が可能となる培養幼植物集塊の大きさ(生育ステージ)や二酸化炭素濃度および光強度などの培養環境についての検討が必要である。

2) 植物生長調節物質の種類と添加量の影響

培養幼植物集塊を分割移植して2か月間培養後、順化可能な大きさに生育した幼植物体の培養容器当たりの数、草丈、葉数および地上部生体重を表9に示した。

植物生長調節物質を添加しない区(無添加区)の幼植物体数は14.2個であった。これに対し、IAA添加培地では、1 mg/l区が26.2個と一番多く、次いで、5 mg/l区と0.1mg/l区が19.8~17.5個とほぼ同数であったが、10mg/l区は11.6個と無添加区より少なかった。GA添加培地では、5 mg/l区と10mg/l区の幼植物体数は88.9~86.2個と非常に多く、1 mg/l区と0.5mg/l区はそれぞれ49.5, 22.0個であった。IAAおよびGA添加区で生育した幼植物体の草丈、葉数および地上部生体重は無添加区に比べていずれも大きかった。

以上のように、順化可能な大きさに生育した幼植物体数は、植物生長調節物質を添加した培地で増加することが認められた。なわち、IAA添加培地では1 mg/l区が最大となり、それより添加濃度の高い区では無添加区よりも少なかった。GA添加培地では添加濃度の高い区ほど幼植物体数が多くなる傾向が見られ、5 mg/l区が最高となり無添加区の6.3倍の幼植物体が得られた。5 mg/l区と10mg/l区との間には差はなかったことから、培養幼植物集塊の最終培養における植物体再生培地にはGA 5 mg/l添加が最適であると判断した。

植物生長調節物質のオーキシンは、一般には若い生長中の葉や若い芽生えの子葉で合成され、茎を移動して節間伸長を制御する。また、GAを外から与えた植物体では、内生オーキシンとの間の相互作用の結果、生長促進効果がみられる(Wareing・Phillips, 1985)。本試験の培養幼植物集塊は、不定胚から生育した若い苗条であるためにIAAよりもGAによる生長促進が顕著に認められたものとする。

表9 植物生長調節物質の種類と添加濃度が培養幼植物体の生育に及ぼす影響

植物生長 調節物質	添加濃度 (mg/l)	幼植物体数 ^z (個/容器)	草丈 (cm)	葉数 (枚)	地上部生体重 (mg/個体)
IAA	0.1	17.5±1.6 ^y	4.0±0.2 ^x	5.3±0.1 ^x	107±8 ^x
	1	26.3±1.3	4.7±0.1	5.4±0.1	126±8
	5	19.8±1.0	3.9±0.2	5.0±0.1	98±7
	10	11.6±1.7	3.4±0.1	4.5±0.2	92±5
GA	0.5	22.0±2.6	4.4±0.2	5.3±0.1	85±6
	1	49.5±3.5	6.3±0.2	5.5±0.1	106±7
	5	88.9±7.2	7.4±0.3	5.8±0.1	91±5
	10	86.2±4.5	7.2±0.2	5.5±0.1	100±7
無添加	—	14.2±0.8	2.6±0.1	3.9±0.1	73±5

^z シュートが2 cm以上伸長した個体数

^y 平均値±SE. (n=10)

^x 平均値±SE. (n=50)



図13 バーミキュライトで順化後，ポット養成中の再生植物

以上により，*in vitro* 培養体の根組織切片から誘導した培養体は，1か月毎にクリーンベンチ内の無菌操作で新しく作成したMS培地に分割移植を繰り返して継代培養を行えば，増殖した培養体からの植物体再生と二次不定胚形成による大量増殖が可能であることが確認された。なお，組織培養による大量増殖苗は培養変異が問題になることがある。そこで，著者は本実験で得た再生植物を，バーミキュライトで順化後，ポットに植え付け45日間養成した(図13)。この培養苗を現地圃場に定植して栽培した結果，茎葉の形態的変異は観察されず，従来の根伏せ繁殖苗と同等に生育し，10月下旬の落葉後にはふかし栽培用の穂木が得られるまでに生長した。従って，種苗としての利用は十分可能であると考えられる。

第3節 固体支持材・培養液の種類が培養幼植物体の生長および順化に及ぼす影響

組織培養による種苗生産では，培養室内の容器内(*in vitro*)で外植体置床による無菌培養開始から培養幼植物体の増殖と発根のための継代培養を数か月間行った後，得られた再生植物(培養苗)の順化を室外で行っている。寒天やゲランガム等のゲル化剤を用いて育成した培養苗を圃場に定植するためには，培養容器から出す時に根に付着した固型化剤を洗い落としバーミキュライト等に仮植する作業，いわゆる順化を行う必要がある。培養苗は環境ストレスに弱いので，この作業には手間と時間がかかる一方，冗長な作業は苗の活着率にも影響する(古在，1987；鶴島，2003)。

培養苗の生産コストを削減するためには，培養期間の短縮と順化作業の簡略化を図ることが必要であり，生産現場の近くで農家自らが培養苗の育苗を行うことも考えられる。そのためには，農家への普及(技術移転)が可能で，しかも操作が簡単な種苗生産システムの確立について検討が必要である。タラノキの組織培養に関しては，既に貝守(1986)，雨宮ら(1992)およびYoshizawaら(1994)による葉柄からの植物体再生の報告があり，葉柄培養による種苗の増殖マニュアルも作成されてい

る(稲葉・吉川, 1993)。これらの既報を参考に, タラノキ根組織からの不定芽, 不定胚形成と培養体の *in vitro* 増殖および植物体再生について第1節, 第2節で検討した。本節では, 根組織切片由来の不定胚から養成した培養幼植物体の生育に及ぼす固体支持材と培養液の種類の影響およびセル成型トレーによる培養苗の直接順化・育苗法について検討した。

材料および方法

タラノキ品種‘新駒’の *in vitro* 培養体の根組織切片から誘導した不定胚を, Murashige・Skoog (1962)の基本培地にショ糖3%を添加して pH5.7に調整した培地(以下 MS)で1か月毎に4回継代培養して養成した。培養容器(高さ100mm×径25mm 試験管)内の培養幼植物体集塊を供試し, 以下の実験を行った(図14)。



図14 供試材料

継代培養(*in vitro*)により増殖・養成した培養幼植物体集塊

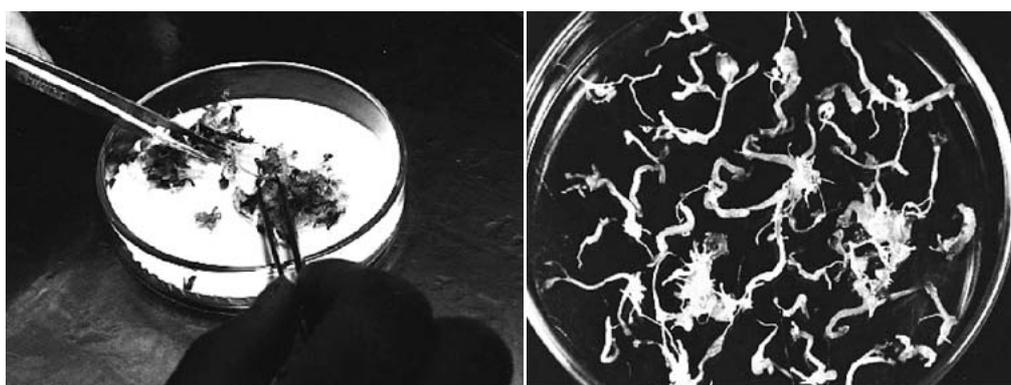


図15 試験方法

培養幼植物体集塊を, 滅菌シャーレ上でほぐし(左), 固体支持材培地およびセル成型育苗培土へ移植した培養幼植物体(右)

1. 固体支持材培地における培養幼植物体の生育

1) 固体支持材の種類

固体支持材は、バーミキュライト、パーライトおよびピートモスの粒径が3 mm 以下になるようにふるい落とししたもの、長さ約1 cm に切断した水苔の4種類を供試した。試験は、バーミキュライト単独(以下V)、バーミキュライトとパーライトの等量混合(容積比1:1, v/v, 以下VP)、バーミキュライト、パーライトおよびピートモスの等量混合(容積比1:1:1, v:v:v, 以下VPP)、バーミキュライトと水苔の等量混合(容積比1:1, v/v, 以下VS)の4区と、対照として通常の固型化剤培地(ゲランガム0.2%)区を設けて行った。培地は、ポリカーボネイト製容器(高さ100mm×径80mm)に各支持材を50ml(容積)詰め、MS液体培地を40ml注入した後、オートクレーブ滅菌して培養に用いた。

培養幼植物体の集塊(試験管1個分:図14の1集塊)を滅菌シャーレ上においてピンセットでほぐし、展開葉が1~2 cm 伸長した幼植物体数約30個を各固体支持材培地に移植して25°C, 3,000lx(白色蛍光灯), 16時間照明下で2か月間培養した(図15)。その後、培養幼植物体から順化可能な大きさに生育した再生植物の容器当たり個体数を調査し、各試験区から生育の進んだ個体(各容器5個体, 試験区計60個体)をサンプリングして草丈、葉数および地上部生体重を測定した。試験は、1区12容器を供試して行った。

2) 培養液の種類

固体支持材培地は、VPPを供試して試験した。培養液は、MSの他に、Lloyd, G.・McCown, B.(1981, 以下WPM)、Hyponex(肥料成分:N6.5, P₂O₅ 6, K₂O 19%; Hyponex Corporation)の0.4%液(以下HP)および野菜や花き栽培において広く使用されている液肥用肥料(肥料成分:N15, P₂O₅ 8, K₂O 17%; 大塚化学(株)製, 商品名:OK-F₁)の0.2%液(以下OK)の4種類(いずれもショ糖3%添加, pH 5.7調整)を供試した。ポリカーボネイト製容器内にVPPを50ml(容積)詰め、各培養液を40ml注入した後、オートクレーブ滅菌して培養に用いた。1区12容器を供試し、培養および調査は1)と同様に行った。

3) ショ糖添加の影響

固体支持材は、V単独と比較にバーミキュライト、ピートモス等を主原料とした市販のセル成型苗用育苗培土(肥料成分:N150, P₂O₅ 1,000, K₂O 150mg/l; 全農製, 商品名:与作, 以下CTC)の2種類を供試し、VにはMS液体培地(pH5.7)を、また、CTCには水道水(pH6.4)を用い、それぞれにショ糖3%添加区と無添加区を設けて検討した。ポリカーボネイト製容器に上記2種類の培地を50ml(容量)詰め、MS液体培地または水道水を40ml注入した後、オートクレーブ滅菌して培養に用いた。1区12容器を供試し、培養および調査は1)と同様に行った。

2. 培養幼植物体の直接順化育苗

育苗用土は、1)の実験に供試したV、VPPおよび3)の実験に供試したCTCの3種類を用い、培養幼植物体の直接順化・育苗について検討した。継代培養により増殖した培養幼植物体集塊を試験管から取り出して全体を水洗後、指先で5分割して各用土を充填したセル成型トレイ(72セル; 1セル40×40mm×深さ50mm, 容積50ml)に置床し、ポリプロピレン樹脂製の密閉容器(縦740mm×横400mm×深さ325mm)に入れて灌水(水道水:3,000ml)した。その後、25°C, 3,000lx(白色蛍

光灯), 16時間照明の培養室内で2か月間管理した。調査は, 培養幼植物体から再生植物が得られたセル数を数え, 全セル数(72)に対する割合を育苗率(%)として算出した。また, 養成したセル成型苗の草丈, 葉数, 地上部生体重および乾物重を調査した。乾物重は, 60℃の恒温乾燥器内に48時間以上置いた後に測定した。試験は, 1区セル成型トレイ3個を供試し2反復で行った。

結 果

1. 固体支持材培地における培養幼植物体の生育

1) 固体支持材の種類

培養幼植物体を試験区培地に移植し, 2か月間培養後の再生植物体数は, ゲランガム区が26本と一番多く, 次いでVP区とVS区が23本でゲランガム区に対する指数は89とほぼ同じであったが, V区とVPP区は16~18本と劣った(表10)。再生植物の草丈は, VPP区とVP区が7.7~6.4cmでゲランガム区の3.8cmより大きかった。葉数は4.0~4.8枚で培地による差は小さかった。地上部生体重は, VPP区が196mgで, ゲランガム区の倍以上の重さであった。VP区とVS区も136~106mgとゲランガム区の89mgより重かったが, V区は64mgと軽かった。なお, 供試した固体支持材の比重は, V区とVP区が0.18, VPPは0.16, VS区は0.14とほぼ同じであった。また, 各支持材培地にpH5.7に調整したMS液体培地を施用し, オートクレーブ滅菌後, 培養幼植物体移植時の培地のpHは試験区により異なり, V区とVP区は6.0~6.2で対照のゲランガム区の6.0と同じであったが, VPP区とVS区は3.5~4.4と低かった。

2) 培養液の種類

2か月間培養後の再生植物体数は, HP区が20.9本で, MS区, WPM区およびOK区の16.8~17.2本より多かった(表11)。再生植物の草丈は5.5~6.4cm, 葉数は5.0~5.2枚で試験区間の差は小さかったが, 地上部生体重は, HP区とOK区が107~108mgで, MS区とWPM区の83~84mgより重かった。ポリカーボネイト製容器内のVPP培地に, pH5.7に調整した各培養液を注入し, オ

表10 固体支持材培地の違いがタラノキ培養幼植物体の生育に及ぼす影響

固体支持材 ^z	再生植物体数		草丈 (cm)	葉数	地上部生体重 (mg)	オートクレーブ 滅菌後 pH
	(本/容器)	(%/G100)				
V	16.3±0.5d ^{y,w}	62.5	3.4±0.2d ^{x,w}	4.3±0.1c ^{x,w}	64± 5.4e ^{x,w}	6.0
VP	23.2±0.9b	88.9	6.4±0.2b	4.6±0.1b	136± 9.2b	6.2
VPP	17.7±0.7c	67.8	7.7±0.3a	4.8±0.1a	196±15.9a	3.5
VS	23.3±1.4b	89.3	3.7±0.2c	4.0±0.1d	106± 7.7c	4.4
G(対照)	26.1±1.1a	100	3.8±0.2c	4.2±0.1c	89± 6.6d	6.0

^zV: バーミキュライト単独, VP: バーミキュライトとパーライト等量混合(容積比1:1, v/v)

VPP: バーミキュライト, パーライトおよびピートモス等量混合(容積比1:1:1, v:v:v)

VS: バーミキュライトと水苔等量混合(容積比1:1, v/v), G: ゲランガム

^{y,x} 平均値±SE. (n=12, *60)

^w 異なるアルファベット間には5%水準で有意差あり(Tukey-Kramer test)

オートクレーブ滅菌後，培養幼植物体移植時の培地の pH は各区とも3.5～3.8の値で培養液による差はなかった。

3) ショ糖添加の影響

2か月間培養後の再生植物体数は，V培地の3%区が24.6本，0%区が3.4本であった(表12)。CTC培地では3%区が21.9本，0%区が5.8本で，両培地とも0%区は3%区に比べて少なかった。草丈は，3%区の5.3～4.7cmに対し，0%区は3.8cmと少し低かったが，葉数は全ての試験区とも4.2～4.4で差はなかった。地上部生体重も同様に，3%区は80～71mg，0%区は58～62mgと3%区で生育が勝った。なお，ポリカーボネイト製容器内のV培地にpH5.7に調整したMS液体培地を，また，同容器内のCTC培地に水道水を注入し，オートクレーブ滅菌後，培養幼植物体移植時の培地のpHは全て6.0であった。

以上のことから，固体支持材と培養液の種類および培地へのショ糖添加の有無はタラノキ培養幼植物の生育に影響を及ぼすことが明らかとなった。

2. 培養幼植物体の直接順化育苗

セル成型トレイに充填した各育苗用土上に培養幼植物体を分割して置床し，2か月間密閉容器内で管理してセル成型苗を養成した(図16)。

表11 固体支持材培地へ施用する培養液の種類がタラノキ培養幼植物体の生育に及ぼす影響^z

培養液	再生植物体数 (本/容器)	草丈 (cm)	葉数	地上部生体重 (mg)	オートクレーブ 滅菌後 pH
MS	16.8±0.9b ^{y,w}	5.7±0.2c ^{x,w}	5.2±0.1a ^{x,w}	83±5.8b ^{x,w}	3.5
WPM	17.0±0.7b	5.5±0.2d	5.0±0.1b	84±5.1b	3.6
Hyponex	20.9±0.7a	6.4±0.2a	5.0±0.1b	107±6.2a	3.6
OK-F1	17.2±0.8b	6.2±0.1b	5.2±0.1a	108±6.7a	3.8

^z 固体支持材：パーミキュライト，パーライト，ピートモス等量混合(容積比1：1：1，v：v：v)

^{y,x} 平均値±SE。(n= y12, x60)

^w 異なるアルファベット間には5%水準で有意差あり(Tukey-Kramer test)

表12 固体支持材培地へのショ糖添加の有無がタラノキ培養幼植物体の生育に及ぼす影響

固体支持材 ^z	ショ糖添加 (%)	再生植物体数 (本/容器)	草丈 (cm)	葉数	地上部生体重 (mg)
V	3	24.6±1.8a ^{y,w}	5.3±0.2a ^{x,w}	4.4±0.1a ^{x,w}	80± 5.0a ^{x,w}
V	0	3.4±0.5d	3.8±0.3c	4.4±0.1a	58±10.4c
CTC	3	21.9±1.2b	4.7±0.2b	4.3±0.1a	71± 8.1b
CTC	0	5.8±0.8c	3.8±0.2c	4.4±0.1a	62± 5.3c

^z V：パーミキュライト(MS液体培地施用)，CTC：セル成型苗用育苗培土(水道水施用)

^{y,x} 平均値±SE。(n= y12, x60)

^w 異なるアルファベット間には5%水準で有意差あり(Tukey-Kramer test)

セル成型トレイ72穴当たりの活着苗数の割合(活着率)は、V区が83.3%と一番高く、次いでVPP区78.8%、CTC区67.1%の順であった(表13)。セル成型苗の生育は、CTC区が草丈、葉数、地上部生体重、同乾物重および乾物割合とも一番大きく、充実した培養苗が得られた(図17)。活着率の高かったV区は、いずれの調査項目ともVPP区およびCTC区に比べ値は小さかった。

供試用土の理化学性は、CTC区の比重は0.23でV区、VPP区の0.18より大きく、pHは6.6でV区とほぼ同じであった。また、CTC区の電気伝導度(EC)は、1.2mS/cmでV区およびVPP区の約15倍と高かった(データ省略)。

表13 セル成型トレイ育苗用土がタラノキ培養幼植物体の直接順化・育苗に及ぼす影響

育苗用土 ^z	育苗率 (%)	草丈 (cm)	葉数	地上部生体重 (mg)	地上部乾物重 (mg)	乾物割合 (%)
V	83.3±2.4a ^{y,w}	6.6±0.3c ^{x,w}	4.9±0.2c ^{x,w}	263±20c ^{x,w}	34.2±3.2c ^{x,w}	12.8±0.9c ^{x,w}
VPP	78.8±2.7b	8.0±0.4b	5.3±0.2b	401±24b	56.1±4.2b	14.0±1.1b
CTC	67.1±4.8c	8.2±0.5a	5.6±0.2a	484±27a	74.5±3.6a	15.3±2.1a

^zV：バーミキュライト単独，VPP：バーミキュライト，パーライトおよびピートモス等量混合（容積比1：1：1，v：v：v），CTC：セル成型育苗用育苗培土

^{y,x} 平均値±SE.(n= 36, 348~60)

^w 異なるアルファベット間には5%水準で有意差あり(Tukey-Kramer test)



図16 培養幼植物体のセル成型トレイによる直接順化育苗(移植60日後)



図17 培養幼植物体からセル成型トレイで直接順化育苗した培養苗(CTC 培土区)

考 察

培養幼植物体の生長や発育の速度および生理学的、形態学的な特徴の多くは、温度、湿度、光、CO₂濃度等の培養環境条件に大きく影響される(古在, 1993)。また、培養器・支持材の種類も生長に影響を及ぼし(高澤・古在, 1992)、培地も寒天などのゲル化剤に比べ、繊維性の支持材を用いた場合には培養幼植物体の生育が促進される(Andrew・Smith, 1990)。ミヤコワスレの培養では、バーミキュライトとパーライトの等量混合物を支持材に用いた培地は寒天培地より培養幼植物の生育が優れ、その理由としては粘土鉱物質であるバーミキュライトの高い塩基置換容量やアンモニア態窒素の吸着・固定によることが報告されている(元岡ら, 1992)。また、バーミキュライトとパーライトを等量混合した培地は気相率と液相率の割合が改善され、ササユリ子球の生育に適した培地条件となり子球肥大が促進したという報告もある(大川, 2002)。本実験結果でも、保肥力の大きいバーミキュライトに比重の小さいパーライトまたは水苔を混合すると培地の全孔隙が大きくなるため、タラノキ培養幼植物体の生長が促進された。再生植物体の生育はゲランガム培地よりも優れていた。VP培地とVS培地は、対照としたゲランガム区とほぼ同数の再生植物体が得られたが、草丈はVP培地の方がVS培地より長かった。この原因は、固体支持材に注入した培養液のpHは5.7に調整したにも関わらず、オートクレーブ滅菌後の培地のpHは固体支持材に影響を受け、VP培地は6.2に上昇し、VS培地は4.4に低下していたためと考えられる。*in vitro*培養体からの発根は培地のpHに影響し、pH6.5の培地はpH5.7や4.5の培地より発根が優れる(Sathyanarayana・Blake, 1994)ことから、根の生長にはpHが高い方が良いものと思われる。

Kozaiら(1988)は、植物組織培養培地の基礎成分よりも養液栽培に使用される培養液成分のほうがカーネーション小植物体の生長を促進することから、光独立栄養培養条件下と従属栄養培養条件下では、小植物体の生長に適する培地組成は異なるという。養液栽培用の液肥培地は植物組織培養培地に比べ、低価格である上に調整が簡単であるので生産現場での利用に適している。本実験でも固体支持材培地に注入する培養液は、MS、WPM培地成分よりも簡単に調整できるHPまたはOK液肥の方が生育は勝る結果となった。

植物組織培養では、幼植物体の生長に必要な炭素源として通常は培地へのショ糖添加が行われている。しかし、培養器内の光強度や二酸化炭素濃度を高めれば、無糖培地でもカーネーション小植物体は生育したという報告がある(Kozai・Iwanami, 1988)。また、カーネーション小植物体は、光独立栄養培養条件下では養液栽培用の無機成分を用いた無糖培地で生育が促進された(古在ら, 1990)。しかし、本実験の結果では、固体支持材培地およびセル成型培土とも培養液または水道水にショ糖を添加して用いないと培養幼植物体の生育は劣り植物体再生数は少なかった。これは、供試した培養幼植物体は不定胚由来の生育ステージが異なる個体の集塊であるため、発育の進んでいない個体は根の吸肥力が弱く光独立栄養できずに枯死するためと考えられる。今後、光独立栄養が可能となる生育ステージと不定胚発育の同調化のための培養条件についての検討が必要である。

以上により、タラノキ不定胚由来の幼植物体は、固体支持材に、炭素源としてショ糖3%を添加したHPまたはOK液肥を培養液として用いるか、市販のセル成型育苗培土にショ糖3%を加えた水道水で作成した培地でも植物体再生は可能であり、順化前の最終培地の簡略化が示唆された。

次に、再生植物の順化とセル成型育苗を同時に行うことができれば培養期間短縮と作業の省力・

簡略化が図られ、培養苗生産コストの低減に役立つ。そこで、培養幼植物体のセル成型トレイを用いた直接順化・育苗について検討した結果、固体支持材を充填したセル成型トレイに培養幼植物体を分割して置床し、水道水を灌水して透明プラ密閉容器内で2か月間管理するだけでセル成型育苗が可能であった。この場合、固体支持材に市販のセル成型育苗培土を用いると生育が進み地上部生体重量が大きく乾物割合の高い充実したセル成型苗が得られた。しかし、活着率はバーミキュライト単独あるいはバーミキュライト、パーライトおよびピートモス混合用土より低かった。これは、セル成型育苗培土はECが非常に高いことと、培養幼植物体は無糖培地では光独立栄養が行えず、セル成型育苗容器内の環境条件の急変が影響して枯死個体が多くなったものと考えられる。一方、バーミキュライト単独培地は、活着率は高いが地上部生体重量がセル成型育苗培土の約1/2であった。この理由は、バーミキュライトには肥料成分が含まれていないために活着後の生育が不十分であったためと思われる。従って、実用面では活着後に液肥施用を行えば充実したセル成型苗が育成できるものと考えられる。

一般に培養幼植物体は、密閉条件下の高湿度、低照度環境条件下で生育しているため、気孔の発達が不十分で調節機能が悪く、根の生理・生態的機能の発達が不十分なために水ストレスに対して弱い。従って、順化時の急激な環境変化に十分に順応できない(古在, 1987)。その対策には、培養苗の生育後半に容器内へ通気を行うと順化率が向上する効果があり、フキでは葉柄切片から得た不定芽をセル成型トレイに移植し、通気培養により発根個体を得る培養法が確立されている(浅見ら, 2000)。今後、通気培養における炭酸ガス施用や光環境条件について検討を加えれば更に育苗率は高まるものと思われる。

本実験で確立した育苗法は、培養幼植物集塊をセル成型トレイに分割移植するといった簡単な方法であり、農家自らが生産現場で行える手法である。

第4節 品種間差異および培養苗の実用性

組織培養による大量増殖については、これまで多くの種類で報告されているが、その培養系を用いて増殖したクローン苗の実用化栽培について検討された報告例は少ない。確立した増殖法を実際の農業生産に利用するためには、対象作物の品種間差異、培養苗の生育特性および培養の過程で起きる、いわゆる培養変異(ソマクローナル変異)の確認が必要である。タラノキの上記報告でも、品種間差異ならびに培養苗の実用性については検討されていない。

本節では、タラノキ *in vitro* 培養体根組織切片から不定胚誘導により増殖した培養苗の実用性を検討するため、根組織切片からの植物体再生の品種間差異、および再生植物のフローサイトメーターによる染色体数の変異調査を行った。また、順化後、ポット植えで養成した培養苗の現地栽培における生育特性について調査した。

材料および方法

1. 根組織切片からの植物体再生の品種間差異

供試した品種・系統は、県内でふかし栽培向きに多く栽培されている‘新駒’と青芽系トゲなし

品種‘静岡みどり’（タキイ種苗）および県内の山野の野生株から選抜した全くトゲのない系統（以後、野生種）の3種類である。

1) 外植体からのカルス，不定芽および不定胚形成

稲葉・吉川(1993)の手法を参考に新芽葉柄切片から幼植物体を再生し，発根1～2か月後の *in vitro* 培養体の根組織切片(太さ0.5mm，長さ約1.5cm)を外植体に用いた。培地は，MS培地に3% ショ糖を加えたものを基本培地とし，これに2,4-ジクロロフェノキシ酢酸(2,4-D)を1～2 mg/l 添加し，pH5.7に調整後，0.8%寒天を加えて溶解したものを培養容器(高さ100mm×径25mm 試験管)に10ml 分注し，オートクレーブ滅菌して作成した。クリーンベンチ内で培養体から切り取った外植体を培地上に3個置床し，試験区当たり30容器(外植体計90個)を供試した。外植体置床後は25℃，暗黒条件下で培養し，30日後に外植体から形成したカルスを同一容器の植物生長調節物質を添加しないMS培地(以下，フリー培地と略す)へ移植した。フリー培地に移植後は，25℃，3,000lx(白色蛍光灯)，16時間日長条件で培養した。

外植体置床30日後にカルスの形成を，また，フリー培地に移植して30日間継代培養後にカルスからの不定芽，不定胚および不定根形成を調査した。不定胚の判断は西村ら(1990)に従い，両端に芽と根の原基を持ち外植体およびカルス組織から独立して形成した幼植物体を不定胚とした。試験は，2001年9月7日と10月3日の2反復で行った。

2) 不定胚由来幼植物体の生育

1)で得た不定胚を含む培養幼植物体を2～3か月間フリー培地で継代培養したものの中から展開葉が1～2 cm 伸長した幼植物体集塊(試験管1個分の幼植物体数約20個)を供試した(図18)。

培養容器は，ポリカーボネイト製容器(高さ100mm×径80mm)を用い，蓋の中央部にコルクボーラーで径4 mm の穴をあけ，ミリシール(日本ミリポア工業社 FWMS 018 00型)を1枚貼った通気区と，穴のあけない蓋を対照(無通気)区に設けて試験した。培地は，ショ糖3%を添加したMS培地をpH5.7に調整し，ゲランガム0.2%を加え溶解したものを上記容器に40ml分注し，オートクレーブ滅菌して作成した。

幼植物体集塊を滅菌シャーレ上でピンセットを用いて分割し，上記容器内の培地上に移植した後，25℃，3,000lx(白色蛍光灯)，16時間照明下で2か月間培養した。その後，幼植物体から順化可能な大きさに生育した植物体(培養苗)数を調査し，各試験区から生育の進んだ個体(各容器5個体，試験区計60個体)をサンプリングして草丈，葉数および地上部生体重を測定した。試験は，1区12容器を供試し，2002年1月24日に行った。

2. 培養苗の細胞遺伝的安定性の確認

1-2)で得た順化可能な大きさに生育した *in vitro* 培養苗の中から無作為に選んだ各品種・系統20個体の葉を供試し，フローサイトメーターによる細胞遺伝的安定性の確認を行った。対照に品種‘新駒’の葉柄切片からの再生植物の葉を供試して比較した。

試料とした葉片(約5 mm 角)に核単離溶液 [High Resolution Kit Type P(Partec 社製；kit A液)]を加えてカミソリで細断し，この懸濁液にDAPI染色液 [High Resolution Kit Type P(Partec 社製；kit B液)]を加えて染色を行った後，フローサイトメーター(Ploidy Analyzer PAS型，Partec社製)でDNA量の分析を行った。

3. 培養苗の現地圃場栽培における生育

1-2) で得た培養苗は、バーミキュライトを詰めた育苗箱(長さ345mm×幅265mm×深さ70mm)に仮植し、ポリプロピレン樹脂容器(長さ450mm×幅315mm×深さ165mm)内に入れて灌水後、アクリル樹脂の蓋(高さ55mm)をし、3週間管理して順化を行った。その後、花崗岩風化土壌(マサ土)とバーク堆肥混合用土を用いて7.5cmポリポットに鉢上げし、ガラス室内で2か月間養成した。2002年5月27日に、東広島市八本松町原の広島県立農業技術センター圃場(標高220m)と同市高屋町造賀の現地圃場(標高350m)の水田転換畑(沖積土壌)で栽培試験を行った。

耕種概要は、植え付け前に堆肥5トン/10aと元肥(窒素6, リン酸12, カリ6kg/10a)を施用し、畦幅200cm, 株間50cmの1条植えで定植した。定植2か月後に茎長, 葉数および茎長中間位置の茎径を調査し, 6か月間栽培後の落葉時のふかし栽培用穂木の伏せ込み時には, 茎長, 節(側芽)数, 中間位置の茎径および頂芽径を調査した。

結果および考察

1. 根組織切片からの植物体再生の品種間差異

1) カルス, 不定芽および不定胚形成

外植体からのカルス形成率は, 供試した3品種・系統とも94.4~100%と非常に高く, 2,4-Dの添加濃度による差はみられなかった。カルスの大きさ別形成割合も, 品種・系統間および2,4-D添加濃度区間に一定の傾向はみられなかった。しかし, 形成したカルスの生体重は, 品種・系統間では‘新駒’が‘静岡みどり’および野生種より, また, 2,4-D添加濃度では1mg/1区が2mg/1区より大きい傾向にあった(表14)。

外植体から形成したカルスをフリー培地に移植し, 30日間継代培養後のカルスからの不定芽形成率は, ‘新駒’が63.3~71.7%と高く, ‘静岡みどり’と野生種はほぼ同等で36.7~58.3%であった。カルスからの不定胚形成率は, ‘静岡みどり’は80.0~93.3%, ‘新駒’は65.0~85.0%, 野生種は

表14 タラノキ根組織切片からのカルス形成の品種間差異および2,4-D添加濃度の影響^z

品種・系統	2,4-D (mg/l)	カルス形成率 (%)	カルスの形成した外植体の割合(%) ^y				カルス生体重 (mg)
			+++	++	+	-	
新駒	1	94.4	52.8	33.9	7.8	5.6	1682±158 ^x
	2	97.8	26.7	65.6	5.5	2.2	1397±131
静岡みどり	1	99.4	24.4	68.9	6.7	0.6	1109±94
	2	98.9	33.3	57.8	8.9	1.1	875±47
野生種	1	99.4	41.6	42.2	15.6	0.6	1167±112
	2	100.0	38.8	45.6	15.6	0.0	916±96

^z 外植体置床30日後に調査

^y +++: 外植体全体に形成, ++: 外植体のほぼ半分形成, +: 外植体の一部に形成, -: カルス形成なし

^x 試験管1個(外植体3個)当たり, 平均値±SE.(n=30)

表15 タラノキ根組織切片由来カルスからの不定芽，不定胚および不定根形成の品種間差異ならびにカルス形成培地の2,4-D添加濃度の影響^z

品種・系統	2,4-D ^y (mg/l)	器官形成率(%)		
		不定芽	不定胚	不定根
新駒	1	71.7	65.0	38.3
	2	63.3	85.0	13.3
静岡みどり	1	58.3	80.0	6.7
	2	36.7	93.3	0.0
野生種	1	58.3	50.0	36.7
	2	48.3	58.3	18.3

^z 2,4-Dフリー培地へ移植し，30日間継代培養後に調査

^y カルス形成培地に添加した2,4-D濃度

50.0～58.3%であった。カルスからの不定根形成率は，‘新駒’と野生種は13.3～38.3%であったが，‘静岡みどり’は0～6.7%と低かった。2,4-D添加濃度による差は，供試した3品種・系統とも不定芽と不定根の形成は1 mg/l区の方が，また，不定胚の形成は2 mg/l区の方が高い傾向にあった(表15)。

先に，タラノキ‘新駒’培養体由来根組織切片からの不定胚誘導について詳細の実験を行った結果，不定胚誘導は2,4-D 0.5mg/l以上添加培地で45～100%得られ，2,4-Dフリー培地で継代培養後に誘導したEmbryogenic callus(EC)を，2,4-D 0.01～0.05mg/l添加培地に移植すると培養幼植物体の表面に不定胚が形成されることが認められた(第1節)。また，根組織切片からの不定胚誘導は非常に増殖効率の高い培養方法であり，外植体置床9か月後には1個の外植体から約40,000個以上の幼植物体得られる(第2節)。本実験では，外植体からのカルス，不定芽および不定胚形成は品種により多少の差はみられたが，いずれの品種・系統とも2,4-D 1～2 mg/l添加培地で不定胚形成率は50%以上と高率に認められたことから実用面での品種間差異は無いものとする。

大量増殖のためにはECの維持・増殖が必要であり，固形培地よりも液体回転培養の方が効率的であることから，ニンジン，アスパラガス等の植物でその技術が確立されている(西村ら，1990)。しかし，本研究は，生産現場への技術移転が可能で，操作が簡単で生産者自らが行うことができる組織培養技術の確立を目的としているため，液体回転培養については検討しなかった。今後，更に増殖効率を高めるためにはECの維持・増殖法と共に不定胚の同調化技術についての検討が必要であろう。

ニンジン未熟胚由来植物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(古川・重松，1991)，それは遺伝的要因によるものと考察されている。サクラソウの園芸品種においても葉切片のカルス経路による不定芽形成率は0～100%と品種により大きく異なる(古谷・表崎，2003)。また，バイカラマツの葉および葉柄切片からの植物体再生は八重，一重，あるいは花色により異なる(貴志ら，1994a)ことが報告されている。

本実験に供試したタラノキ品種‘新駒’は，山梨県農試八ヶ岳分場で山野の自生株の中から，トゲが少なく，新芽の色が濃緑で，芽の大きい系統を長年かけて選抜を繰り返し，昭和54年に育成さ

れたものである(藤嶋, 1997)。一方, 市販品種の‘静岡みどり’は, 新芽の緑色が冴え, セリのようにやわらかいのが特徴で, 県内の山野から選抜した野生種は, 赤芽であり茎葉に全くトゲはないが側芽が小さい。タラノキは品種により, 草丈, 側芽の発達, 茎のトゲの発生状態, 葉の紅葉の時期等が異なる(阿部ら, 1999)。現在栽培されているタラノキの品種は, 自生株から側芽の大きい個体やトゲの少ない個体を長年にわたって繰り返し選抜され, その後は根伏せ繁殖で増殖して育成されたものである。本試験において根組織切片からのカルス, 不定芽および不定胚形成には品種間差異はみられたがその差は小さかった。このことは, タラノキ品種・系統の遺伝的相違は限られた形質の範囲内でおきている程度の小さい変異であることに起因しているものと思われる。

2) 不定胚由来幼植物体の生育

幼植物体(個体数約20個: 図18)は, ポリカーボネイト製容器に移植し, 2か月間継代培養すると順化可能な大きさに生育した。容器当たりの再生植物体数は18~19個で, 供試品種・系統間および通気区, 対照区間に差はなかった。再生植物の草丈, 葉数および地上部生体重は, 品種・系統により若干の相違はあるが3品種・系統とも通気区の方が対照区より値が大きくなる傾向にあった。特に地上部生体重は, 通気区が103~107mg, 対照区が68~84mg と両区間に大きな差が認められた(図19, 表16)。

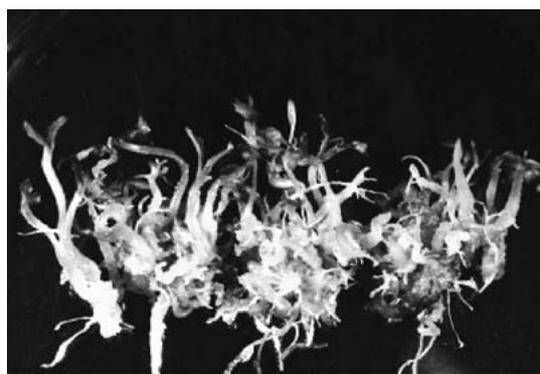


図18 不定胚由来幼植物体



図19 幼植物体の2か月間継代培養後の生育状況
左: 通気区, 右: 対照区(品種: 新駒)

表16 タラノキ不定胚由来幼植物体生育の品種間差異および培養容器の通気の影響

品種・系統	試験区 ^z	生育個体数 (個/容器)	草丈 (cm)	葉数 (枚)	地上部生体重 (mg)
新駒	通気	18.5±1.1 ^y	4.8±0.1 ^x	6.4±0.2 ^x	107±7.8 ^x
	対照	18.3±1.2	4.6±0.1	5.0±0.2	68±4.0
静岡みどり	通気	17.8±1.0	4.7±0.1	5.4±0.1	103±6.2
	対照	18.4±1.2	4.4±0.1	5.3±0.1	84±3.8
野生種	通気	19.2±1.3	5.1±0.1	4.8±0.1	104±7.0
	対照	17.5±1.3	4.3±0.1	4.5±0.1	82±5.0

^z 通気：容器の蓋に穴有り，対照：穴無し ^{y,x} 平均値±SE. (n= ^y15, ^x75)

以上のように，継代培養における幼植物体の生育は供試した3品種・系統とも順調であった。この場合，培養容器内への通気を行うために蓋に穴のあいた培養容器を使用することにより幼植物体の生育が優れた。培養容器の通気は，幼植物体への二酸化炭素の供給と容器内の湿度調節の効果により，特に根部の生育が促進され，その後の順化も容易であることから，ナス台木(雨宮ら，1996)，フキ(浅見ら，2000)，スターチス(宮本ら，1991)，アスパラガス(齊藤ら，1988)などで報告されている。本試験においても，培養容器の蓋に穴をあけた通気区は，供試した3品種・系統とも無通気区に比べて幼植物体の生育は旺盛であった。幼植物体の生育後半や順化の際に，より健全なタラノキの再生植物を得るためには容器内への通気は有効な手段であることが明らかとなった。

2. 培養苗の細胞遺伝的安定性の確認

1-2) で得た再生植物の幼葉を用いてフローサイトメーターによるDNA量を測定した結果，3品種・系統とも供試したすべての個体において，根組織切片からの再生植物および葉柄切片からの再生植物は遊離核のピークが同じ感度100付近にあり，核DNA量の変異を示すことはなかった。従って，倍数体等の染色体数の変異は認められなかった(図20)。

カルス細胞からの再分化個体は，正常な2倍体である場合が多いとされるのが通説(小野，1979)である。しかし，花きの組織培養による染色体数等の変異の発生に関する報告は多くあり(藤野，1990)，栄養繁殖性野菜におけるカルス由来の植物の遺伝的安定性や変異性に関しても，植物の種類や培養部位・培養条件等で大きく異なることが報告されている(大澤ら，1981)。

一方，星ら(2000)は，組織培養によるタラノキ優良母株の増殖を行い，母株と増殖苗をRAPD分析により遺伝子レベルで比較した結果，組織培養による変異は起こりにくいことを示唆している。また，石井ら(2003)は，シラネアオイ未熟種子からの不定胚由来再生植物は葉の色や形の形態的変異は認められず，フローサイトメーターの分析でも葉のDNA量の変異は生じなかったと報告している。

本実験における培養手法は，根組織切片を2,4-D添加培地で脱分化して得たカルスを，フリー培地に移植して継代培養するだけで再生植物が得られる簡単な方法である。従って，植物生長調節物質は初代培養のカルス誘導時に2,4-Dを用いるだけで，その後はフリー培地で継代培養を行い，不定胚の生長・発育を促進するという方法なので染色体変異は起きにくいものとする。

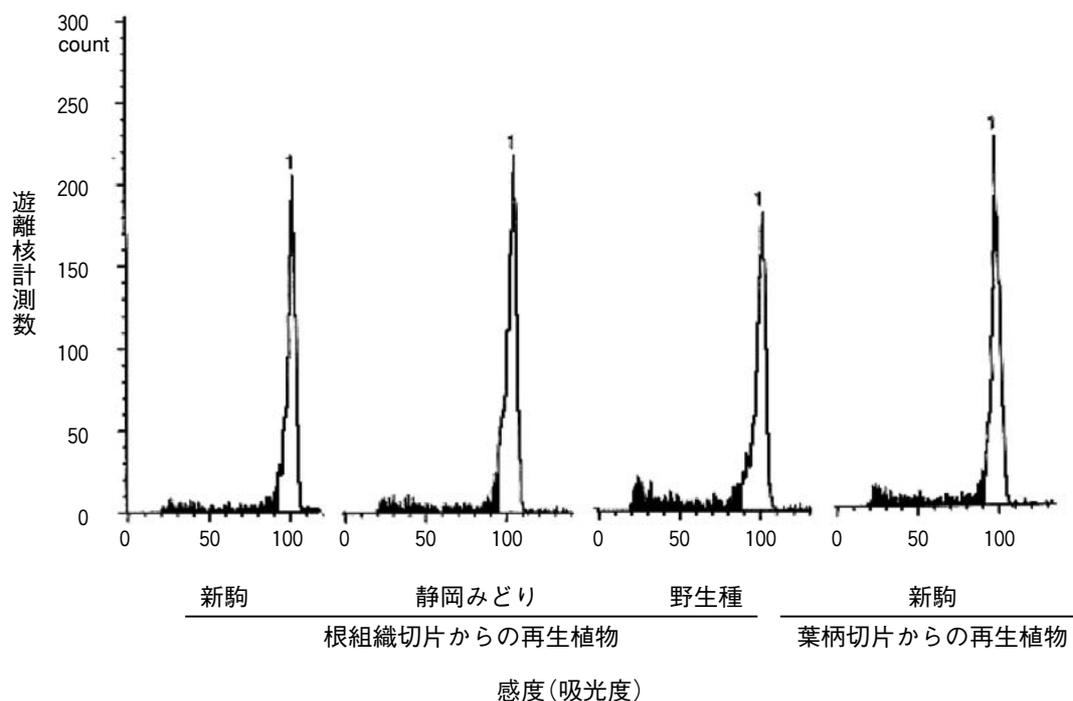


図20 フローサイトメーターによるタロノキ培養苗の幼葉における核 DNA 量

3. 増殖苗の現地圃場栽培における生育

圃場へ定植した培養苗の生育は、定植2か月後には茎長41.1～52.4cm、葉数7.9～9.9枚、茎径11.0～13.4mmとなり、初期生育は圃場により多少異なった。対照とした根伏せ繁殖苗は、茎長47.8cm、葉数9.2枚、茎径12.7mmで2圃場の値の中間にあった。定植6か月後の培養苗の茎長は85.6～111.3cmに伸長し、従来の根伏せ繁殖苗の88.3cmとほぼ同等の生育が認められた。また、落葉後の茎径は16.7～18mm、頂芽径は20.4～21mmとなり、ふかし栽培の穂木の伏せ込みに利用可能な大きさであった(表17、図21)。

培養苗の利用は、1960年代の高級園芸作物であったランのメリクロン苗から始まり、その後のカーネーションやイチゴのウイルスフリー苗で実用化し、栄養繁殖性花きや野菜等で普及してきた。最近では、植林用樹木、熱帯果樹、ヤシ類、工芸作物にも世界的にはひろがりつつある(古在, 1998)。大量増殖を目的とした組織培養技術の研究報告例は多くあるが、培養苗(クローン苗)の実用化を目的とした栽培試験の報告例は少ない。球根花きのユリではシンテツポウユリ(坂本・永井, 1994)、ヒメサユリ(佐藤, 1992)、ササユリ(宮本, 1998)について培養子球の実用性が検討されている。その他の作物では、ナス台木(雨宮ら, 1996)、フキ(浅見ら, 2000)、ウド(池田ら, 1991)、バイカカラマツ(貴志ら, 1994b)、アスパラガス(Kohmuraら, 1996)などで不定胚由来の個体についての報告がある。これらの報告では、いずれの植物もクローン苗は実生苗や慣行の繁殖苗に比べて生育が旺盛であり生産物の品質や揃いが良いことが認められている。なお、古谷(2001)は、キクの茎頂から多芽体誘導により急速増殖した培養苗は母株として利用可能であり、さし芽繁殖苗の切り花栽培における生育開花および切り花品質にも問題はないことを認めている。

本実験のタラノキ根組織切片から増殖した培養苗も、前述したように圃場栽培での地上部の生育は従来の根伏せ繁殖苗と同等で、新芽の色、葉型、トゲの発生状況等の変異個体はみられなかった。また、落葉時の側芽はふかし用の穂木として利用できる大きさとなり、その時の地表に近い地下部(根群)には不定芽が確認でき、根群の太さは根伏せ繁殖用の種根として利用できる大きさになるほど生育は旺盛であった。近年、タラノキふかしの芽の品質の優れる個体や立枯疫病に耐病性を有する個体から種根用母株を育成するのに葉柄培養を利用した報告がある(Amamiya ら, 2002; 星ら, 2000)。この場合、培養体由来根組織切片培養は急速大量増殖手法として有効な手段となるものと確信する。

表17 タラノキ根組織切片から不定胚誘導により増殖した培養苗の現地圃場栽培における生育

調査時期	定植2か月後			定植6か月後			
	試験場所	茎長 (cm)	葉数 (枚)	茎径 (mm)	茎長 (cm)	茎径 (mm)	節(側芽)数
東広島市八本松町原 ^z	41.1	7.9	11.0	111.3	16.7	17.6	20.4
同市 高屋町造賀 ^z	52.4	9.9	13.4	85.6	18.0	17.9	21.0
根伏せ繁殖苗(対照) ^y	47.8	9.2	12.7	88.3	21.2	18.8	19.2

品種：‘新駒’，定植時期：2002年5月27日

^z 定植時の培養苗(ポット苗)の大きさ：茎長1.6cm，葉数5.3枚，茎径2.3mm

^y 試験場所：東広島市八本松町原



図21 現地圃場における生育状況

(定植6か月後：11月下旬)

第5節 根組織培養苗の生産コスト試算

組織培養による大量増殖苗(培養苗)利用の利点は、①収量および品質が高まる、②繁殖率(増殖率)が高く、周年生産できる、③遺伝的均一性が高い、④生産施設の土地利用率高い等にある(古在, 1998)。しかし、培養苗生産を行うためには、施設と機器・機具類、培地作成用の色々な器具類、無菌操作と培養環境、順化のための施設と器具類等の多くの準備が必要である(大澤, 1994; 細木, 1997)。一般には寒天培地を使用し、ポリカーボネイトやガラス製の小型容器で行うために、大量の種苗を生産するためには、多数の容器と多くの手作業労力を必要とする。また、使用する器具類の内でも、容器内に作成した培地等の滅菌を行う高圧蒸気滅菌器(オートクレーブ)、無菌作業に伴うクリーンベンチおよび培養物を育てる培養室あるいは植物育成チャンバー(人工気象器)等の施設・機器類は多額の資金を必要とする。従って、生産された種苗の原価が高くならざるを得ないのが現状である。

現在、広島県内には稼働している育苗施設がないので、本研究の実施に当たっては確立した組織培養技術を何処で、誰が利用するかを考えながら技術組立を行ってきた。その一方法として、県立農業技術センター、市町村および高等学校の既存の組織培養施設を地域の生産者やJA職員等が利用して自らが種苗増殖を行うことも可能であり、この場合の生産コスト等を予め試算しておく必要があると考える。そこで、タラノキの根組織培養による種苗生産技術について第1節から第3節で確立した手法を体系づけて行う場合、新規の圃場に定植する苗10,000本を生産することを想定し、必要な費用の内、固定経費(主な機器類の減価償却費)、消耗品費(資材費)および労働時間(人件費)について試算した。

試算方法

1) 作業工程の概要

培養は、*in vitro* 培養体根組織切片を試験管(高さ100×径25mm)内の2,4-D添加MS寒天培地(培地量10ml)に置床し(初代培養)、誘導したカルスを同試験管内の植物生長調節物質無添加のMS培地に移植し(再生培養)、その後、形成した培養幼植物体の分割移植を同試験管に新しく作成したMSフリー培地で3回繰り返して行い(継代培養)、増殖した培養幼植物体を、バーミキュライトを詰めたポリカーボネイト製培養容器(高さ100mm×径80mm)で再生植物体に育成した後(最終培養)、ポリプロピレン樹脂製の密閉容器を用いてセル成型トレイで直接順化育苗する場合を想定した。この条件で、実際のタラノキ種苗生産にかかる資材費(実験器具類と消耗品)と人件費について試算した。なお、既存の培養施設を利用することを前提としたため、培養施設・機器類の償却費、光熱費は加えなかったが、地域によっては新しく培養施設を導入することもあり得るので、最低限必要な高額機器類の固定経費(取得価格を耐用年数で割った値)と利用時の光熱費の大まかな値を試算した。

2) 資材単価および労賃単価

資材費の単価は、実際の取得価格で計算した。減価償却費は、機器類は10年、また、培地作成用の試験管や作成時に使用する器具類は耐用使用回数を10回とし、金額は1/10で計算した。順化・育苗過程における使用資材についても耐用使用回数を2～5回とし、金額は1/2～1/5で計算し

た。なお、賃金は日額6,800円(時給850円)とした。

3) 作業時間

作業時間は、本研究を行った際の実験室内での経験をもとに表19のとおりとした。

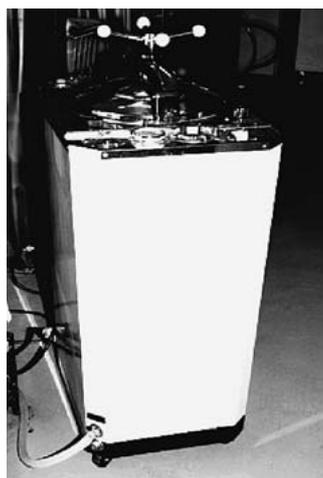
4) 種苗生産における規模，増殖率等の条件設定

培養過程および順化・育苗過程における条件設定は以下のとおりである。

初代培養は試験管50個(外植体100個)から開始すると，継代培養時には試験管100～500本に増え，最終培養時にはポリカーボネイト製培養容器500個を用いることとなる。最終培養時の容器当たりの再生植物の育成個体数は，第4節の成績から25本とすると，約12,500本の培養苗が得られる。セル成型トレイ(72穴)およびポリプロピレン樹脂製密閉容器を用い，直接順化育苗をした場合の育苗率を80%として計算すると10,000本の培養苗(セル成型苗)が生産できる。これはおよそ1.5ha分の圃場に定植する苗数に相当する。

5) 施設・機器類の固定経費および光熱費

施設・機器類の耐用年数を10年とし，減価償却費は1/10で計算した。光熱費(電気代)は1 KWh 25円で計算した。



オートクレーブ



クリーンベンチ

図22 組織培養に必要な器具

結果および考察

タラノキ *in vitro* 培養体の根組織培養により10,000本のセル成型苗を生産するために必要な資材費および人件費について試算した。

組織培養過程で必要な資材費は，培地作成用の試験管等培養容器類に培地，ショ糖，寒天等の消耗品費を加えた金額は合計50.5千円である(表18)。組織培養に要する作業量は，初代培養から最終培養までの人数は延べ12人役で，その人件費は81.6千円である(表19)。次に，順化・育苗過程で必要な資材費は，セル成型トレイ，ポリプロピレン樹脂製密閉容器および育苗用土の合計で80千円，人件費は，作業量20人役で136千円である(表20)。従って，初代培養(試験管50本)による外植体か

らのカルス形成，再生培養によるカルス移植，継代培養による培養幼植物体の育成と増殖を経て，最終培養(培養容器500個)により12,500個体の再生植物体を養成した後，10,000本のセル成型苗を育苗するまでに要する経費の合計は約348千円であった。その内，資材費と人件費の占める割合はそれぞれ37.5%と62.5%となる。

以上の結果，根組織培養により器内増殖・育苗した培養苗の1本あたりに係る経費を計算すると約32円となり，セル成型トレイ(72穴)1個あたりでは約2,000円(32円×72本×育苗率0.85)である。これまでの試算には，既存の組織培養施設を利用することを前提としたので，機器類の購入費(減価償却費)や，ランニングコスト(光熱費)は計算には入れなかった。

次に，新しく組織培養を始めるに当たって最低限必要な高額機器類として高圧蒸気滅菌器(オートクレーブ)，クリーンベンチおよび培養室の代替えとして植物育成チャンバー(人工気象器)1台の購入が必要である。これらの固定経費と光熱費を表21に示した。

この場合，人工気象器内に入るポリカーボネイト製培養容器数は1回に100個であるから，2回繰り返し行うとして5,000本の培養苗生産となる。その他の条件は上記した既存の培養室を使用する場合と同様に計算した。その結果，施設・機器類の固定経費(減価償却費)は151.7千円で，培養苗1本あたり約30円である。また，培養期間中(365日を想定)の機器類の光熱費を計算すると約209.6千円となり，培養苗1本あたり約42円かかることになる(表21)。従って，培養苗1本あたりにして72円の金額が加算されることになるので資材費，人件費を加えた培養苗の生産コストは約104円であり，既存の組織培養施設を利用する場合の3倍となる。

表18 タラノキ *in vitro* 培養体の根組織培養における資材費(試算^z)

必要資材	単価 (円)	数量 (本, 個)	金額 ^y (円)
試験管 径25mm	100	1,000	100,000*
試験管立 径25mm用	2,000	10	20,000*
培養容器(ポリカーボネイト製)	200	500	100,000*
アルミホイル	2,500	1	2,500
MS培地	7,000/20l	1	7,000
ハイボネックス	750/200g	1	750
ショ糖	1,000/500g	1	1,000
寒天	5,000/250g	0.5	2,500
バーミキュライト	1,000	1.5	1,500
エタノール	1,600/500l	1	1,600
メタノール	500/500l	1	500
その他 ^x	—	—	1,150*
計			50,500

^z 試験管1,000本とポリカーボネイト製培養容器500個を使用し，約10,000本の培養苗を生産することを前提とした試算，^y*印は耐用使用回数を10回とし，計は1/10で計算

^x ピーカー，三角フラスコ，メスシリンダー，シャーレ，ピンセット，アルコールランプ，分注器等，培地作成および無菌操作時に必要なガラス器具等の減価償却費

表19 タラノキ *in vitro* 培養体の根組織培養における人件費^z(試算)

培養過程	作業内容	培地作成量 (ml)	必要容器数 (本, 個)	作業量 (人)	人件費 ^z (円)
初代培養	MS 培地作成	500	径25mm 試験管	0.2	1,360
	外植体置床		50	0.2	1,360
再生培養	MS 培地作成	500	径25mm 試験管	0.2	1,360
	カルス分割移植		50	0.2	1,360
継代培養 1 回目	MS 培地作成	1,000	径25mm 試験管	0.2	1,360
	培養体分割移植		100	0.5	3,400
継代培養 2 回目	MS 培地作成	2,000	径25mm 試験管	0.5	3,400
	培養体分割移植		200	1	6,800
継代培養 3 回目	MS 培地作成	5,000	径25mm 試験管	1	6,800
	培養体分割移植		500	2	13,600
最終培養	HP 培地作成	20,000	培養容器	1	6,800
	シュート分割移植		500	5	34,000
計		29,000		12	81,600

^z 日額6,800円(時給850円)で計算

表20 タラノキ培養苗の順化育苗における資材費および人件費(試算)

必要資材	資 材 費			人 件 費		
	単価 (円)	数量 (個)	金額 (円)	作業過程	作業量 (人)	人件費 ^z (円)
セル成型トレー(72穴)	200	200	40,000 ^y	セル成型 トレーへ 植え付け	20	136,000
直接順化育苗用密閉容器	500	200	100,000 ^x			
セル育苗用土	2,000	20	40,000			
計			180,000		20	136,000

^z 日額6,800円(時給850円)で計算

^y 耐用使用回数を2回とし, 計は1/2で計算

^x ポリプロピレン樹脂製, 耐用使用回数を10回とし, 計は1/10で計算

表21 組織培養に必要な機器類の固定経費と使用時の光熱費(試算)

(1) 固定経費

機 器	型 式	購入価格 円	減価償却費 ^z 円/年
高圧蒸気滅菌器	オートクレーブ AK-1256	378,000	37,800
ク 網カゴ		14,000	1,400
クリーンベンチ	卓上式 VET-850G	175,000	17,500
植物育成チャンバー	NK LPH-220N	950,000	95,000
小計		1,517,000	151,700

(2) 光熱費

機 器	使用時間・回数, 時間	電気使用量 (KWh)	電気代(円) ^y
オートクレーブ (AC100V, 15A)	初代培養1回・1時間 再生培養1回・1時間 継代培養4回・延4時間 最終培養5回・延5時間		
小 計	1.5×11	16.5	330
クリーンベンチ (AC100V, 15A)	初代培養1回・1時間 再生培養1回・1時間 継代培養3回・延10時間 最終培養1回・延12時間		
小 計	1.5×24	36	720
植物育成チャンバー (人工気象器) (AC100V, 17A)	24時間×365日 1.7×24時間×365日×0.7 ^x	10,425	208,500
合 計			209,550

^z 耐用年数10年で計算^y 1 KWh20円で計算^x 常時運転時の電力使用量係数

従来の培養苗生産は、培養苗の分割、移植、順化、生産調整などに多くの人手を必要とし、苗価格の50%以上を人件費が占めており生産コストに大きく影響する(古在, 1998)。そのため、労働力の安い海外で苗生産し、生産システムの自動化、培養装置のスケールアップなどによる生産コストの削減が求められている。この培養苗生産における生産費コストについて報告した例は少ない。奥野ら(1994c)は、ハカラシナの試験管内大量迅速育苗系を用いて生産費解析を行っている。それによると、苗生産の大部分を占める費用は労働費(人件費)であり、その割合は2,900本の苗生産で45%、11,500本の苗生産で67%、183,500本の苗生産で80%となり、生産本数とともに増加している。反面、生産費の減少に寄与した項目は培養容器数に関連した固定経費と光熱費である。

培養苗生産費用の低減を図るためには、効率的な培養手法の確立による増殖率の向上と培養手法の簡易化・大型化および発根と順化の同時処理等が考えられる。川村・久島(1996)は、シオデの培養を例にして農家あるいは小規模経営体が組織培養技術の利用を考えたときの投資額、生産コストの経済要因の推定と技術の簡易化・適正化について検討し、生産技術の改善の方向付けとして、再生率の向上、初代シュート数の増加、増加率の向上、容器当たりのシュート数の増加、植え換え時間の短縮による生産コストの低減が可能であると報告している。

花き組織培養苗の増殖率と増殖数は、鶴島(2003)の試算では、無菌培養植物の継代培養によるシュート分割増殖期間が1か月に約2倍増えると10か月後には1千本となるが、約3倍増えると59千本、約4倍増えると1,050千本の苗が増殖できる。本研究におけるタラノキ *in vitro* 培養体の根組織培養による増殖率は、1外植体から9か月で40,000個体の幼植物体が増殖できる培養系(第2節)である。既存の培養施設を利用してこの作業を生産者自らが行えば、培養苗生産に必要な経費(資材費)の占める割合は37.5%であるから、培養苗1本当たりでは僅か12円である。

培養苗の利用は、1960年代に高級園芸作物であったランから始まり、カーネーション、イチゴのウイルスフリー苗の利用、宿根草や球根花きや栄養繁殖性野菜等で実用化してきた。最近では、植林用樹木、食用イモ類、熱帯果樹、工芸作物、絶滅が危惧される野生植物の大量増殖にも培養技術が利用されている(古在, 1998)。これらの種類では、いずれも単一種類・品種のクローン苗生産である。一方、最近では植物の有する機能性成分が注目され、それぞれの地域で、長い間利用されてきた地域固有の特産野菜や山菜の栽培を推進する地域が全国的に見られる(中西・土井, 1997; 鈴木, 2003)。これらの植物資源を地域の財産として見直し、植物組織培養の得意とする種苗増殖技術を活かせば、未利用植物資源を積極的に地域農業の活性化に役立てることができると考える。農家あるいはJA職員等自らが組織培養技術を修得し、利用する場合には投資額、生産コスト等と技術の簡易化、省力化は重要な意志決定要因となる。本研究で確立した種苗生産システムは、新しい作物を地域あるいは小規模経営体に導入し、特産作物として生産振興を図る場合の有効な手段となり得るものであり、既存の培養施設を利用すれば僅かな資材費のみで必要量の種苗が生産できる。

今後の地域農業の進む道の一つとして、今一度、広域合併が進む行政区域内の既存の組織培養施設の利用について生産者を含めて、その運営を考える必要があると思う。本研究で確立した種苗生産技術は今までの組織培養による大量増殖の概念を改め、増殖と育苗、培養苗とセル成型苗を結びつけた種苗生産システムである。

以上のことから、本研究で確立した組織培養によるタラノキの根組織培養による種苗生産技術を地域農業に役立てるために、当面は、農業技術センターの組織培養実験室を開放し、利用規程に従い関係市町村や生産者に対して技術移転を行えば、培養苗の生産費用も僅かですみ実用化できるのでタラノキの生産振興に有効な手段となると確信している。

第Ⅱ章 アシタバの根組織培養による種苗生産技術の確立

— 培養体由来根組織からの不定胚誘導および植物体再生 —

近年、高齢化社会が進むとともに人々の健康への関心が高まり、植物の持つ機能性成分が注目され、山菜や薬用植物が見直されてきている。その中の一つに、食物繊維やビタミン、ミネラルを豊富に含むアシタバ(*Angelica keiskei* (Miq.) Koidz.)がある(小沢ら, 1978; Iguchiら, 1992)。アシタバは、セリ科に属する多年生草本植物で、太平洋沿岸の温暖地に自生する繁殖力旺盛な植物である。伊豆諸島の八丈島では特産野菜として古くから栽培されている(河野, 2002)が、他殖性が強いいため優良種子の採種が困難であり、発芽に長期間を要するとともに種子の貯蔵性が悪いなどの問題がある(小寺, 1991)。今後、振興作物として自生地以外で導入する場合や、機能性成分を高含有する優良系統の育成に役立てるためには効率的な組織培養系の確立が必要である。

山菜や薬用植物などの組織培養による大量増殖に関する報告は、ウド(Leeら, 2002; 野口, 1997; 西平ら, 1998), シオデ(黒田・川村, 1994; 渡部ら, 1990; 田沢ら, 1990; 山本, 1995), ウコン(Prathanturugら, 2003), ヤーコン(浜田ら, 1990)などの報告がある。アシタバについては、中原ら(1991a, b), 遠藤・庄子(1994)の葉柄からの体細胞胚形成の報告以外は見あたらない。アシタバと同属であるカラトウキ(Tsay・Huang, 1998), また、同じセリ科植物であるセリ(遠藤ら, 1987; 古谷・細木, 2003), セロリ(遠藤・庄子, 1994), ハマボウフウ(平井ら, 1995), トウキおよびウイキョウ(大賀ら, 1989)では不定胚誘導の報告がある。本報告では *in vitro* において安定したアシタバの大量増殖系を確立するために、葉柄組織切片からの植物体再生と再生植物の根組織切片からの不定胚誘導および植物体再生について検討した。

材料および方法

1. 葉柄切片からのカルス, 不定芽形成および植物体再生

供試材料の葉柄は2002年7月1日に鉢栽培しているアシタバの未展開葉の基部3~5cmを採取し(図23), 水道水で洗い70%エタノールに数秒浸漬後, 次亜塩素酸ナトリウム溶液(有効塩素0.5%, Tween20添加)に15分間浸漬して滅菌した。クリーンベンチ内において滅菌水で3回洗浄した後, 厚さ1~2mmの横断切片を作出し, これを外植体として培養容器内に水平に置床した。外植体は培養容器(高さ100mm×径25mm試験管; 培地量10ml)当たり1個とし, 1試験区当たり25個を供試した。

培地は, MS培地に3%ショ糖および0.8%寒天を基本とし, 植物生長調節物質として2,4-ジクロロフェノキシ酢酸(2,4-D)とベンジルアデニン(BA)を添加後, pH5.7に調整したものをを用いた。試験区は, 1および2mg/l 2,4-Dと0, 0.01および0.1mg/l BAとを組み合わせる6区を設けた。滅菌は容器当たり10mlを注入した後にオートクレーブ(1.2kg cm⁻², 121°C, 15分間)で行った。培養は25°C, 3,000lx(白色蛍光灯), 16時間日長下で行った。外植体置床30日後にカルスの形成状況を調査し, その形成率(%)は, (カルスを形成した外植体数/供試外植体数)×100で算出した。

次に, 形成したカルスは植物生長調節物質を添加しないMS培地に移植した。60日間継代培養を



図23 葉柄培養

供試材料：未展開葉基部

行った後に、カルスから形成した不定芽を調査し、その形成率(%)は、(不定芽を形成した外植体数/供試外植体数)×100で算出した。また、発根が認められ、葉柄が1 cm以上伸長し、順化可能な大きさに生育した個体を再生植物体として調査した。

2. 培養体由来根組織切片からの不定胚形成および植物体再生

1) 2,4-D 添加濃度の影響

1で得られた *in vitro* 再生植物体(図25)の根組織を材料とし、クリーンベンチ内で長さ約1.5cmの細根切片を作出し、これを外植体として下記の培地に置床した。基本培地には、3%ショ糖および0.8%寒天を添加したMS培地を用いた。試験区は0, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2 mg/l 2,4-D 添加の6区を設けて2反復で行った。外植体は、培養容器(高さ100mm×径25mm 試験管; 培地量10 ml)当たり3個、試験区当たり計30個を供試し、30日間培養した。その後、同一容器の2,4-Dを添加しないMS培地に移植して継代培養した。30日間培養後、増殖した容器1個分(外植体3個分)の培養体は、ポリカーボネイト製培養容器(高さ100mm×径80mm; 培地量40ml)に再度移植し、1と同様に再生植物が順化可能な大きさになるまで45日間培養を続けた。

外植体置床後30日間の培養条件は25℃、暗黒条件とし、2,4-Dを添加しないMS培地へ移植後のそれは25℃、3,000lx(白色蛍光灯)、16時間日長とした。外植体置床30日後にカルス形成状況を調査し、大きさを外植体全体に形成(+++), 外植体の半分に形成(++), 外植体の一部に形成(+), およびカルス形成なし(-)の4段階に分け、大きさ別の形成割合(%)を、(カルスを形成した外植体数/供試外植体数)×100で算出した。また、2,4-Dを添加しないMS培地にカルスを移植し、誘導した不定胚の形成率は、西村ら(1990)の報告に従って、胚軸と幼根を具備し、根組織やカルスと区別できるものを不定胚として判断し、全外植体に対する不定胚を形成した外植体数の割合で示した。

2) 2,4-D と BA の併用添加の影響

MS培地を用い、1)と同様の供試材料および試験方法で検討した。試験区は、1および2 mg/l 2,4-Dと0, 0.01および0.1mg/l BAとを組み合わせる6区を設け、1)と同様の規模で3反復行

った。外植体置床30日後に形成したカルスを、2,4-DとBAを添加しないMS培地に移植して30日間継代培養後に、1)と同様に不定胚形成率を調査した。その後、不定胚から生育した幼植物体は、ポリカーボネイト製容器(高さ98mm×75mm×75mm:培地量40ml)に移植して更に45日間培養を続けた後、外植体当たりの順化可能な大きさとなった再生小植物体数とその発根率、葉数および最大葉柄長を調査した。

なお、得られた再生植物は、バーミキュライトを詰めたセル成型トレイ(96穴)5個に仮植し、透明プラ密閉容器(縦740mm×横400mm×高さ325mm)内で順化した。その後、花崗岩風化土壌とバーク堆肥を混合した用土を用いてポット植えし、無加温のガラス室内で管理した。

結果および考察

1. 葉柄切片からのカルス、不定芽形成および植物体再生

葉柄切片からのカルス形成率は、1および2 mg/lの2,4-Dの単独添加した区でそれぞれ100%および84%と高かった。2,4-DとBAとを併用した場合は2 mg/l 2,4-Dと0.01mg/l BAを添加した区ではその形成率が100%であったが、他区では60~84%と2,4-D単独添加区よりも低かった(表22)。カルスは、外植体の切断面に形成され、黄色を帯び生育にともなって盛り上がって外植体全体を覆うように形成された。

その後、カルスを2,4-DとBAを添加しないMS培地に移植し、継代培養を行ったところ不定芽を形成した(図24)。不定芽形成率は、カルス形成率と同様の傾向を示し、1 mg/l 2,4-Dのみ添加した区と、2 mg/l 2,4-Dと0.01mg/l BAを添加した区が80~84%と高く、他区は40~72%であった。不定芽は、継代培養を続けると葉柄が伸長し、発根した完全な再生植物(図25)となり、外植体当たりの再生植物体数は、2 mg/l 2,4-Dと0.01mg/l BAを添加した区が9.9本と多かった。他区のそれは、4~6本の範囲内であった(表22)。

一般に、外植体からのカルスならびに器官形成は、オーキシシンとサイトカイニンの相互作用によって変化することが知られている(Murashige・Skoog, 1962; Linsmaier・Skoog, 1965)。本試験では、オーキシシンの2,4-D単独添加でもカルス形成率および不定芽形成率が高かった。すなわち、葉柄切片からのカルス形成は、1~2 mg/l 2,4-D添加培地で高率に認められ、このカルスを2,4-DとBAを添加しないMS培地に移植し、継代培養を行えば不定芽の形成が認められた。一方、サイトカイニンであるBAとの併用添加については、2,4-Dを2 mg/l添加の時にはBAを加えても不定芽形成率に差はみられないが、1 mg/l添加ではBAを加えることによりカルス形成率および不定芽形成率が低下した。このことから、アシタバの葉柄切片からの植物体再生には、2,4-Dの効果が大きく、BAの影響は小さいことが示され、同様な結果はニンジン(入谷ら, 1980)でも報告されている。

大量増殖を目的とした組織培養では、初代培養の外植体は分裂活性の旺盛な茎頂を用いることが多い。しかし、取り扱いが簡単で多数の組織切片が得られる部位として、実生の子葉(ウイキョウ;大賀ら, 1989, ハマボウフウ;平井ら, 1995), 葉(ウド;野口, 1997;西平ら, 1998), 節(シオデ;山本, 1995, ヤーコン;浜田ら, 1990), 蕾・花梗(マーガレット;古谷, 1992)等の器官や組織が利用されている。葉柄については、サクラソウ(強瀬・松本, 1992)で報告がある。アシタバは、「今日、葉を摘んでも明日には新葉が出る」といわれるほど生育旺盛なことから、「明日葉」と呼

ばれる(牧野, 1969)。このことは, アシタバの葉柄は茎頂と同様に細胞内の分裂活性が高いと思われ, 本実験においても試験管内での葉柄切片から形成したカルスおよび再生幼植物体の生長は旺盛であった。

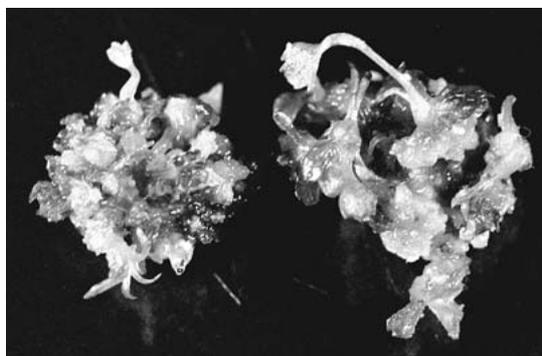


図24 葉柄切片からカルスを経由して形成した不定芽



図25 葉柄切片から不定芽を経由して再生した植物体

表22 2,4-D と BA 添加濃度がアシタバの葉柄切片からのカルス形成率および形成したカルスを継代培養したときの不定芽形成率に及ぼす影響

2,4-D (mg/l)	BA (mg/l)	カルス形成率 ^z (%)	不定芽形成率 ^y (%)	再生植物体数 ^{y,x} (本/外植体)
1	0	100	84	5.7±1.1 ^w
1	0.01	60	40	4.1±1.8
1	0.1	72	52	5.7±1.4
2	0	84	72	4.8±1.1
2	0.01	100	80	9.9±1.7
2	0.1	80	70	5.4±1.7

^z 外植体置床30日後に調査, 数字は2反復の平均値(n=20)

^y 植物生長調節物質を添加しない培地へ移植し, 60日間継代培養後に調査

^x 葉柄が1 cm 以上伸長した個体

^w 平均値±SE.(n=25)

2. 培養体由来根組織切片からの不定胚形成および植物体再生

1) 2,4-D 添加濃度の影響

2,4-D 添加濃度が、アシタバ根組織切片からのカルス形成と、カルスを形成した外植体を 2,4-D フリー培地で継代培養した時の不定胚形成に及ぼす影響について検討した。試験した 2,4-D 添加濃度の範囲内では、0.05mg/l 以上添加区でカルス形成が認められたが(図26)、カルスの形成程度をみると 0.1mg/l 以下の試験区のカルス量は比較的少なかった(表23)。0.5~2 mg/l 添加区でのカルス形成率は 96.7~100% といずれも高かったが、0.5mg/l 区でカルス形成量の多い外植体数が最も多かった。カルスの色は全ての試験区とも薄黄色で、形状は表面に凹凸がなくゼリー状で柔らかかった。2,4-D を添加しない MS 培地に移植し、継代培養したカルスからは不定芽の形成(データ略)とともに、不定胚の形成が認められた。不定胚の形成は、初代培養において 2,4-D を 0.5mg/l 以上添加した区で認められ、その形成率は 1 mg/l 区および 2 mg/l 区で 80% 以上と高かった。なお、2,4-D 無添加区においては外植体の 18% に不定胚がカルスを経由せずに直接形成された(表23)。

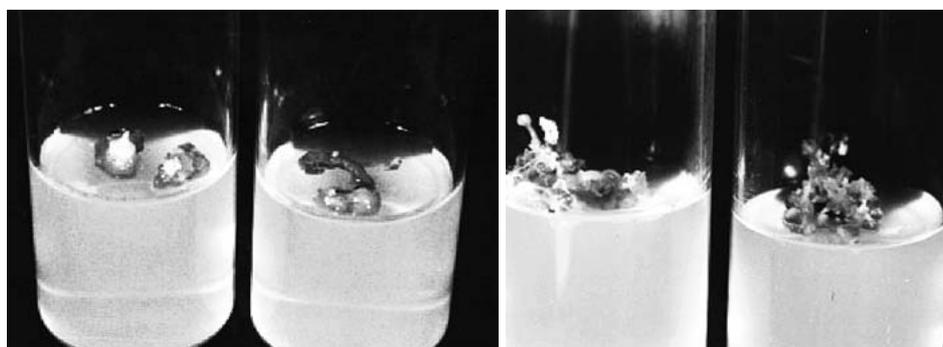


図26 2,4-D 添加培地で根切片から形成したカルス(左)とカルスからの不定芽、不定胚形成(右)

表23 2,4-D 添加濃度がアシタバの根組織切片からのカルス形成とカルス形成した外植体を 2,4-D フリー培地で継代培養したときの不定胚形成に及ぼす影響

2,4-D (mg/l)	カルス形成率 ^z (%)	カルスの大きさ別形成割合(%) ^z				不定胚形成率 ^y (%)
		+++ ^x	++	+	-	
0	0	0	0	0	100.0	18.0
0.05	76.7	0	0	76.7	23.3	0
0.1	86.7	1.7	11.7	73.3	13.3	0
0.5	100.0	51.7	20.0	28.3	0	45.0
1	96.7	28.3	41.7	26.7	3.3	81.7
2	100.0	23.3	45.0	31.7	0	83.3

^z 外植体置床30日後に調査, 数字は2反復の平均値(n=30)

^y 2,4-D フリー培地へ移植し, 30日間継代培養後に調査

^x カルスの大きさ +++: 外植体全体(大), ++: 外植体半分(中), +: 外植体の一部(小), -: 形成なし

中原ら(1991b)は、アシタバ無菌植物の葉柄切片から2,4-D 0.5~1 mg/1 添加培地で不定胚の形成を認めているが、本実験から根組織切片でも不定胚形成が観察された。なお、古川ら(1989)は、植物生長調節物質を用いないでニンジンの幼根先端部の体細胞から不定胚を誘導している。本実験でも2,4-D 無添加区で不定胚形成が認められたことから、アシタバの培養体根組織は不定胚形成能が高い細胞であると考えられる。

2) 2,4-D と BA の併用添加の影響

1) で、2,4-D 1 および 2 mg/1 単独添加培地で形成したカルスを2,4-D フリー培地に移植して継代培養すれば不定胚が高率に形成することが明らかとなった。そこで、カルス形成時のオーキシシンとサイトカイニンの添加が、フリー培地移植後のカルスからの植物体再生に及ぼす影響を検討するため、2,4-D と BA の併用添加効果について実験を行った(表24)。その結果、1 および 2 mg/1 の2,4-D と 0, 0.01 および 0.1 mg/1 の BA を組み合わせて添加した試験区のカルス形成率は、いずれも100%であった(データ略)。形成したカルスは、2,4-D と BA を添加しない培地に移植して継代培養を行うと、いずれの試験区とも全てのカルスから不定胚が形成し、発育して幼植物体となった(図27)。

継代培養により生育した幼植物体は、2,4-D と BA を添加しない MS 培地を入れたポリカーボネイト製培養容器に再度移植して培養を続けた結果、カルス移植75日後(外植体置床から105日後)には、順化可能な大きさとなった再生植物が外植体当たり11~15本得られた(表24, 図28)。試験区間では、2 mg/1 2,4-D のみ添加区と 2 mg/1 2,4-D および 0.01 mg/1 BA を併用して添加した区の外植体当たりの再生植物体数は14.1~14.7本と他区に比べて多く、有意差が認められた。

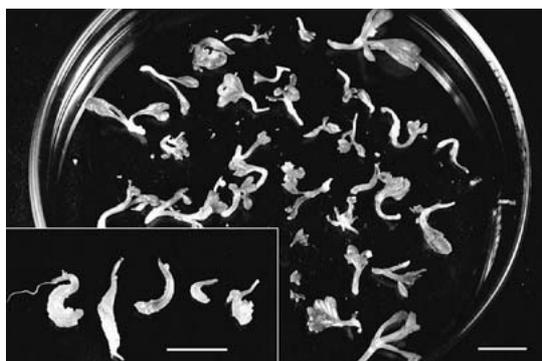


図27 2,4-D 添加培地で根切片から形成したカルスを2,4-D フリー培地へ移植して誘導した不定胚から発育した幼植物(左下:発育初期) Bar: 1 cm



図28 根切片から不定胚を經由して再生した植物体

表24 2,4-D と BA の添加濃度がアシタバの根組織切片からカルス形成した外植体をフリー培地で継代培養したときの不定胚形成率および再生幼植物体の生育に及ぼす影響

2,4-D (mg/l)	BA (mg/l)	不定胚形成率 ^z (%)	再生植物体数 ^{y,x} (本/外植体)	発根率 (%)	葉数 (枚)	最大葉柄長 (cm)
1	0	100	11.5±0.7b ^{wv}	100	3.8±0.1 ^w	1.8±0.1 ^w
1	0.01	100	11.4±0.7b	100	4.0±0.1	2.2±0.1
1	0.1	100	10.7±0.7b	100	4.0±0.1	1.9±0.1
2	0	100	14.1±0.9a	100	4.0±0.2	2.1±0.1
2	0.01	100	14.7±1.2a	100	3.5±0.1	1.7±0.1
2	0.1	100	11.3±1.0b	100	4.8±0.2	2.0±0.1

^z 2,4-D フリー培地へ移植し, 30日間継代培養後に調査

^y 2,4-D フリー培地へ移植し, 75日間継代培養後に調査

^x 葉柄が1 cm 以上伸長し, 順化可能な大きさとなった個体数

^w 平均値±SE. (n=50)

^v 検定は Tukey の方法 (5%水準) を用いて行った

in vitro 内の再生植物を用いて大量増殖を図るには, 継代培養に用いる外植体の検討が必要である。本試験では, 多量の外植体が簡単に取り扱い, しかも生長の盛んな組織として根組織に注目して試験した。根組織切片を外植体に用いた報告例は, ニンジン(入谷ら, 1980), シオデ(吉野ら, 1991), ユーストマ(Fukaiら, 1991), ホウレンソウ(Komaiら, 1996), ハマボウフウ(平井ら, 1995) などがある。この場合の植物生長調節物質の種類としては, α -ナフトレン酢酸(NAA)のみ, または 2,4-D と BA を併用添加した培地で, 外植体から直接不定芽の形成やカルス経由のシュート形成, あるいは不定胚誘導が報告されている。

アシタバにおける根組織切片からの植物体再生は, 本実験において初めて見いだされたものであり, 中原ら(1991a, b), 遠藤ら(1994)の葉柄培養の結果に比べて不定胚誘導率は著しく高く効率的な培養方法である。すなわち, 根組織培養は, 初代培養で本報告の葉柄培養を行うか, または, 一般的な茎頂培養により再生植物を得ることが必要であるが, *in vitro* 植物体を得られれば, 外植体

として用いる根組織切片は、無菌であるから取り扱い是非常に容易である。しかも、1外植体(長さ約1.5cm)当たりの再生植物体数は11~15個(不定胚)と葉柄切片からの4~10個(不定芽)より多い。このようにして、*in vitro* 植物体から100個の根組織切片を得たと仮定して、2.5か月という短期間で1,100~1,500個体の培養苗が増殖可能である。

なお、バーミキュライトを詰めたセル成型トレイに仮植し、密閉容器内で順化した再生植物(480個体)の生存率は97%と非常に高かった(図29)。また、ポットに植え付け後の活着率も95%と高く、45日後には新しい葉が現れるほど生育は旺盛であったことから、本手法はアシタバ種苗の急速大量増殖法として有効であると考えられる。

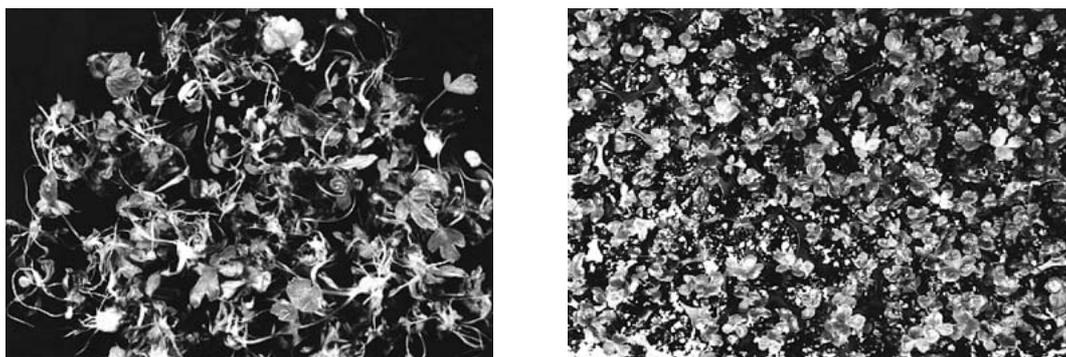


図29 根組織切片からの再生植物(左)と
再生植物のセル成型トレイを用いた順化(右)

第三章 セリの根組織培養による種苗生産技術の確立

— 培養体由来根組織からの不定胚誘導による増殖 —

組織培養による増殖法は茎頂培養法，不定芽・不定根誘導法，不定胚誘導法などがある(高柳，1988，鎌田・原田，1989)が，その中でも不定胚誘導法は，他の培養法と比較して増殖効率がよく，生産プロセスの自動化およびスケールアップがしやすい点で優れ，急速大量種苗生産への応用が期待されており，これまでに200種以上の植物種で不定胚形成の誘導が報告されている(西村ら，1990，嶋津・蔵田，2002)。不定胚誘導による種苗生産を行う場合には，培養手法の簡易化，効率化，安定化，省力化および低コスト化が問題となる。また，増殖効率を高めるためには，継代培養が考えられるが長期間の培養は外植体の再分化能の低下と共に再生個体の培養変異の発生が問題となり好ましくない(鎌田・原田，1989)。

一方，組織切片から再生した *in vitro* 幼植物体は無菌であり，順化可能な大きさに生育した培養苗の根組織からは，安定して確実にしかも簡単に多数の細根切片が得られる。この細根切片を外植体に用いた大量増殖体系を確立すれば計画的な種苗生産が可能になると考える。そこで，Steward et al.(1958)の報告以来，不定胚形成のモデルとして用いられてきたニンジンと同じセリ科のセリ (*Oenanthe javanica* DC.) について，茎頂培養による再生植物体の根組織切片からの不定胚誘導および植物体再生による大量増殖系の確立について検討した。

材料および方法

1. 茎頂培養

東広島市内に自生するセリ野生株(図30)の若い伸長茎を採取し，水洗後，70%エタノールに数秒と有効塩素0.5%の次亜塩素酸ナトリウム溶液に15分間浸漬して振盪殺菌した後に，滅菌水で3回洗浄したものを供試した。頂芽および側芽の茎頂を，0.5mmの大きさに顕微鏡下で摘出して培地に置床した。培地は，MS培地の無機成分を1/2倍濃度に希釈したもの(以下1/2MS)を基本に用い，3%ショ糖と植物生長調節物質を添加した後，pH5.7に調整し，0.8%寒天を加えて溶解したものを，培養容器(高さ90mm，径20mm試験管)に分注(培地量6ml)し，オートクレーブで滅菌(1.2kg cm⁻²，121℃，15分間)して作成した。

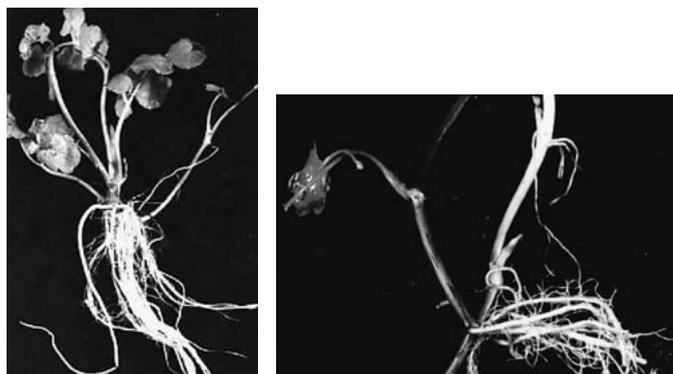


図30 セリ自生株

試験は、 α -naphthaleneacetic acid(NAA)と6-benzyladenine(BA)を用いて表25に示した7区を設け、1区当たり28~30個の茎頂を供試して行った。培養は、25℃、3,000lx、16時間照明下(白色蛍光灯ランプ:FL40SW,三菱電機オスラム(株)製)で行った。茎頂置床1か月後に、茎頂の生存数、カルス形成数、シュート伸長数、発根数を調査し、供試数に対する割合を算出した。

2. 根組織切片培養

茎頂培養(1の実験の0.1mg/1 NAA 添加区)により作出した再生植物(図31)を、植物生長調節物質を添加しないMS培地(フリー培地)で30日間継代培養を行い養成した培養幼植物体を供試した。長さ3~5cmに伸長した根組織を約1.5cmの長さに切断し、その細根切片を外植体として用いた。培地は、MSを基本に用い、3%ショ糖と植物生長調節物質を添加した後、pH5.7に調整し、0.8%寒天を加えて溶解したものを、培養容器(高さ100mm,径25mm試験管)に分注(培地量10ml)し、1の実験と同様に作成した。

試験区は、植物生長調節物質の2,4-dichlorophenoxy acetic acid(2,4-D:0.05, 0.1, 1 mg/l)とBA(0, 0.01, 0.1mg/l)を組み合わせて添加した9区および2,4-D, BAとも添加しない区を設けて試験した。試験は、培養容器当たり外植体3個を置床し、試験区当たり30容器(外植体計90個)を供試して行った。外植体置床後は25℃,暗黒下で培養を行い、30日後に外植体から形成したカルスを同一容器のフリー培地へ移植した。フリー培地へ移植後は、1の実験と同様の条件下で60日間継代培養した。

外植体置床30日後に、カルス形成数を調査し、フリー培地移植60日後にカルスからの不定胚形成数と幼植物体再生数を調査し、それぞれ供試数に対する割合で表した。

3. *in vitro* 増殖

2の実験において、根組織切片を外植体に用い、0.1mg/1 2,4-D 添加培地で誘導した不定胚をフリー培地に移植後に得た再生植物の葉柄(長さ約1cm)および根組織切片(長さ約1.5cm)をそれぞれ外植体として供試した。試験区は、MS培地を基本に0, 0.05および0.1mg/1 2,4-D 添加の3区を設け、3%ショ糖と0.8%寒天を加えて溶解した後、培養容器(高さ100mm,径25mm試験管)当たり10mlを注入し、1の実験と同様に作成した。

試験は、容器当たり外植体2個、試験区当たり10容器(外植体計20個)を供試して行った。外植体置床後の培養条件は、2の実験と同様に行った。

外植体置床30日後に外植体からのカルス、不定芽および不定胚形成数を調査した後、フリー培地に移植し、30日間継代培養後にカルスからの不定胚形成数と幼植物体再生数を調査し、それぞれの供試数に対する割合で表した。

結果および考察

1. 茎頂培養

茎頂を置床し、1か月間培養後の生存率はいずれの試験区とも75.9%以上と高かった。カルス形成率は、0.1mg/1 NAAと0.1~1 mg/1 BA 併用添加区および1 mg/1 NAAと0.1~1 mg/1 BA 併用

添加区が75.9~100%と高く、0.1~1 mg/1 NAA 添加区および0.2mg/1 NAA と0.2mg/1 BA 併用添加区は16.7~30.0%と低かった。茎頂からのシュート伸長率は、0.2mg/1 NAA と0.2mg/1 BA 併用添加区が86.7%と高く、0.1mg/1 NAA 添加区は75.9%であった。0.1mg/1 NAA と0.1mg/1 BA 併用添加区では27.6%と劣った。なお、0.1mg/1 NAA と1 mg/1 BA 併用添加区および1 mg/1 NAA と0~1 mg/1 BA 併用添加区では、シュートの形成はまったく認められなかった。伸長したシュートからの発根は、0.2mg/1 NAA と0.2mg/1BA 併用添加区は80%、0.1mg/1 NAA 添加区は65.5%認められた。なお、両区のシュート当たりの発根数は10.2~8.5本であった(表25)。

ウイルスフリーを目的に行う生長点培養では、培地に添加する植物生長調節物質は低濃度のオーキシシン単独あるいは低濃度のサイトカイニンとを組み合わせで添加した培地が用いられる。一方、増殖を目的とした茎頂培養では、茎頂の頂芽優勢を崩し、茎頂組織に存在する側芽(腋芽)を伸長させるためにサイトカイニンを用いるのが一般的である(斉藤, 1990)。本実験におけるセリの茎頂からのシュート伸長は、0.1mg/1 NAA 添加培地で75.9%認められたが、サイトカイニンのBAを0.1 mg/1 併用添加区ではシュートの伸長率は低下した。また、0.2mg/1 NAA と0.2mg/1 BA 併用添加区では、0.1mg/1 NAA 添加区よりもシュートの伸長率および発根率は向上した。このことから、

表25 NAA と BA の添加濃度がセリ茎頂からの植物体再生に及ぼす影響

NAA (mg/l)	BA (mg/l)	供試数	生存率 (%)	カルス形成率 (%)	シュート伸長率 (%)	発根率 (%)	発根数 (本)
0.1	0	29	79.3	26.1	75.9	65.5	8.5±0.9 ^γ
0.1	0.1	29	75.9	75.9	27.6	6.9	1.5±0.5
0.1	1	28	100.0	100.0	0	0	—
0.2	0.2	30	86.7	16.7	86.7	80.0	10.2±1.0
1	0	30	80.0	30.0	0	0	—
1	0.1	28	82.1	82.1	0	0	—
1	1	28	100.0	96.4	0	0	—

^α 茎頂置床30日後に調査

^γ 平均値±SE.

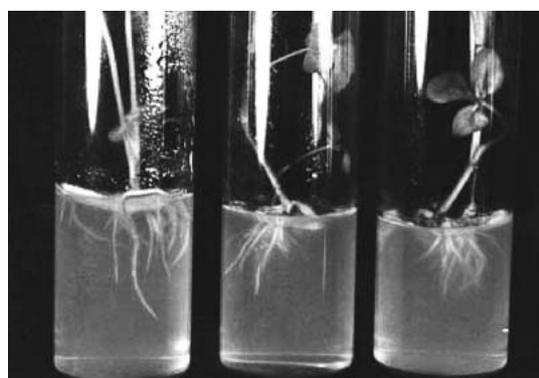


図31 茎頂培養による再生植物

今後サイトカイニンの種類と濃度について更に検討を行えばシュート伸長率および発根率の向上が図られると思われる。

なお、本実験において、0.1mg/1 NAA 添加区または0.2mg/1 NAA と0.2mg/1 BA 併用添加区で得られた再生植物の根組織は細根切片を得るのに十分な大きさに生育したことから、上記培地条件は根組織切片培養に供試する外植体を得る方法として適するものと判断した。

2. 根組織切片培養

茎頂培養により得た再生植物の根組織切片からの不定胚誘導および植物体再生に及ぼす 2,4-D と BA の影響について検討した。その結果、根組織切片からのカルス形成率はいずれの試験区とも 80~100%と高かった(表26)。形成したカルスの形状は、外植体の表面に盛り上がり柔らかく黒ずんだ灰色の小粒の塊であった。

次に、フリー培地へ移植したカルスからは、新しく黄色のカルスが形成した。このカルスは、根組織切片から形成したカルスとは色や形態が異なり、このカルスを不定胚が形成しやすいカルス、すなわち embryogenic callus (EC) と判断した(図32)。その後、増殖したカルスからは多くの不定胚または不定胚様個体が形成し、生育して幼植物体となることが認められた(図33)。なお、厳密に不定胚と判断するには組織切片を作製し、顕微鏡による形態観察の証明が必要である。

EC 誘導による不定胚の形成率は、初代培養時の 2,4-D 添加濃度により異なり、0.1mg/1 添加区は 63.3~76.7%と高く、0.05mg/1 添加区は 20~40%で、1 mg/1 区は 0~26.7%であった。2,4-D と BA の併用添加区では、2,4-D の濃度が 0.05~0.1mg/1 区では BA 併用添加の有無による不定胚

表26 セリ培養体根組織からのカルス形成に及ぼす 2,4-D と BA の添加濃度の影響

2,4-D (mg/1)	BA (mg/1)	カルス形成率 (%)
0	0	0
0.05	0	80.0
0.05	0.01	80.0
0.05	0.1	80.0
0.1	0	86.7
0.1	0.01	96.7
0.1	0.1	100.0
1	0	93.3
1	0.01	90.0
1	0.1	83.3

² 外植体置床30日後に調査

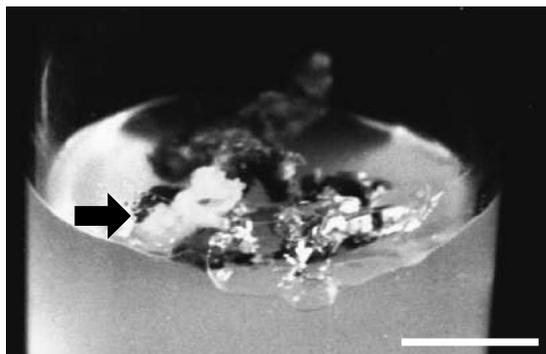


図32 茎頂培養再生植物の根組織切片から形成した EC
(0.1mg/l 2,4-D 添加 MS 培地) Bar: 1 cm.

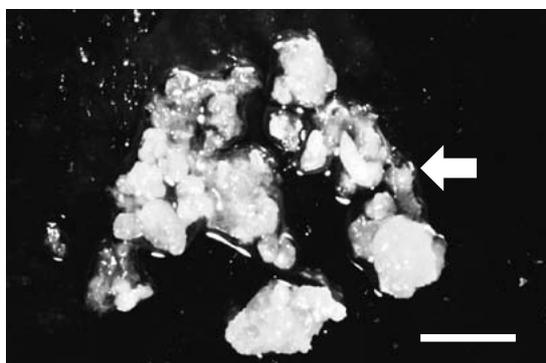


図33 カルスからの不定胚形成
(2,4-D 0.1mg/l 添加培地で形成したカルスを, フリー培地へ移植し, 継代培養後に形成) Bar: 1 cm.

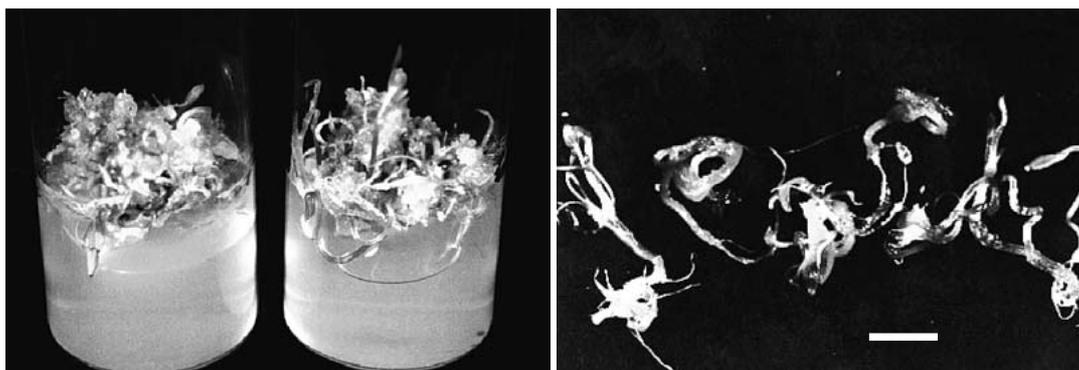


図34 不定胚の継代培養(フリー培地)

左: 不定胚

右: 不定胚から生育した幼植物 (Bar: 1 cm)

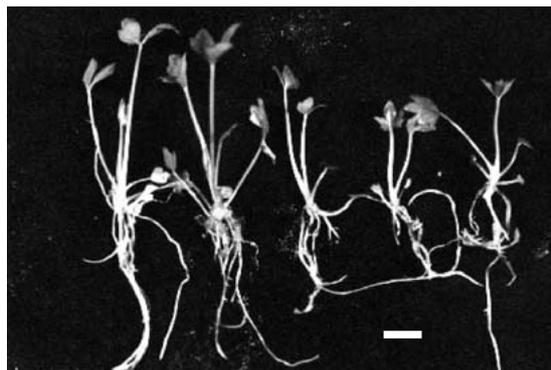


図35 根組織切片からの再生植物(Bar: 1 cm)

表27 2,4-D と BA の添加濃度がセリ茎頂培養再生植物根組織切片からの不定胚形成と植物体再生に及ぼす影響

2,4-D (mg/l)	BA (mg/l)	不定胚形成率 ^z (%)	培養体生体重 ^{z,y} (%)	再生植物体数 ^z (本/外植体)
0	0	0	—	—
0.05	0	23.3	489±159 ^x	10.1±3.7 ^x
0.05	0.01	40.0	386± 61	5.3±1.5
0.05	0.1	20.0	653±136	10.2±1.4
0.1	0	63.3	658± 51	12.6±1.4
0.1	0.01	63.3	617±109	13.7±2.4
0.1	0.1	76.7	688± 65	10.4±0.7

^z フリー培地へ移植し, 30日間継代培養後に調査

^y 不定胚から発育した培養体の生体重(カルス, 不定胚および再生植物体を含む)

^x 平均値±SE.

形成率に大差はみられなかった。しかし, 2,4-D 1.0mg/l 添加区での BA 併用添加は不定胚形成を抑制した。1 外植体から形成したカルスおよび不定胚を含めた培養体の生育(生体重)は, 2,4-D 添加培地間では0.05mg/l 区と0.1mg/l 区の間には大差はなかったが, 1.0mg/l 区は劣った。フリー培地に移植した培養体は, 不定胚から発育した幼植物体(図34)が認められ, 継代培養を続けると多数の再生植物に生育した(図35)。外植体当たりの再生植物体数は, 0.1mg/l 2,4-D 添加区と0.1mg/l 2,4-D と0.01mg/l BA 併用添加区が12.6~13.7本と多かった(表27)。

セリの不定胚誘導に関しては既に以下の報告がある。遠藤・庄子(1994)は, 展開第1~2葉の葉柄から0.1mg/l 2,4-D 添加培地でECを誘導している。Lee and Lee(1993)および Kim and Lee(1995)は, 小花から1 mg/l 2,4-D 添加液体培地で EC を誘導している。これらの報告では, 2,4-D と BA の併用添加ではカルスは増殖するが EC の形成は抑制されている。本実験においては, BA の添加濃度が0.01~0.1mg/l と低いために, 併用添加の影響は見られなかったものと思われる。ウコギ科のウドでは, 葉切片および未成熟種子からの不定胚誘導の報告があり, 野口(1997)は, 葉切片から0.5mg/l 2,4-D 添加 1/2 MS培地でカルスを誘導し, そのカルスを2,4-D を含まない培地で継代培

養して不定胚を誘導している。西平ら(1998)も、葉片および未成熟種子から0.5～1 mg/l 2,4-D 添加MS培地で誘導したカルスから100%の不定胚形成を得ている。これらの報告では、外植体から不定胚を誘導するには、いずれも2,4-D 添加培地が用いられており、その添加濃度は、植物および外植体の種類と培養方法により異なっている。本実験では、外植体からの不定胚形成は0.1mg/l 2,4-D 添加培地で認められ、1 mg/l 2,4-D 添加培地でカルスは高率に形成されるが不定胚の形成は劣り、上記の報告とは異なる結果であった。このことから、セリの根組織からの不定胚形成のホルモン要求量は少ないものと考えられた。

なお、茎頂培養においてBA, NAA 添加培地では茎頂からのカルス形成は高率に認められたが、再生植物は得られなかった。NAAの代わりに2,4-Dを用いてBAとの併用添加培地で茎頂培養を行ってカルス形成を図り、形成したカルスをフリー培地に移植して継代培養すればECが誘導できるかもしれない。しかし、*in vitro*培養幼植物体の根組織切片は取り扱いが容易であることから外植体として適している。また、培養苗の順化時に組織切片の一部を利用して再度培養すれば、種苗の計画的安定供給が可能となるので、効率的な増殖法であると考えられる。

3. *in vitro* 増殖

根組織切片から得た*in vitro* 再生植物を供試し、その葉柄および根組織切片を外植体として用いて再度培養を行った。その結果、葉柄および根組織切片からのカルス形成は、2,4-D 無添加区は0%であったが、2,4-D 添加区では、葉柄切片は75～90%、根組織切片は100%であった。なお、2,4-D 無添加区では葉柄切片で10%、根組織切片で5%の外植体から直接シュートの形成が認められた。

2,4-D 添加培地に置床した根組織切片は、外植体置床30日後には45～65%の外植体にカルス経由の不定胚が認められた。不定胚の色は黄色でカルスの表面から突起し、盛り上がった状態に形成していた。2,4-D 添加培地で形成したカルスをフリー培地に移植し、継代培養を行うと30日後にはほとんどの外植体から再生植物が得られた。すなわち、葉柄切片では、2,4-D 添加培地上ではカルスからの不定胚形成は見られなかったが、カルスをフリー培地に移植して継代培養すると不定胚が誘

表28 2,4-D 添加濃度がセリの葉柄および根組織切片からの植物体再生に及ぼす影響

外植体	2,4-D (mg/l)	カルス形成率 (%)	不定芽形成率 (%)	不定胚形成率 (%)	植物体再生率 (%)	再生植物体数 (本/外植体)
葉柄	0	0	10	0	10	3.7
	0.05	75	0	0	80	33.3±1.9 ^x
	0.1	90	0	0	90	29.4±2.6
根	0	0	5	0	5	12.5
	0.05	100	0	45	100	40.9±5.3
	0.1	100	0	65	100	42.0±4.1

^z 外植体置床30日後に調査

^y フリー培地へ移植し、30日間継代培養後に調査 ^x 平均値±SE.

導でき、80~90%の外植体から再生植物が得られた。外植体当たりの幼植物体数は、葉柄切片が29.4~33.3、根組織切片は40.9~42.0で、培養部位では根組織切片の方が多い傾向にあった。なお、2,4-Dの添加濃度について0.05mg/l区と0.1mg/l区の間にはほとんど差はなかった(表28)。

入谷ら(1980)は、セリ科のニンジン根肥大部の形成層を含む柔組織からのカルス誘導および器官形成には 10^{-5} M NAAが効果的であると報告している。また、Furukawaら(1989)は、ニンジンの無菌植物の幼根から植物ホルモンを用いることなく不定胚を形成することを認め、Wetherell(1984)は、浸透圧のストレスによってニンジンの不定胚形成が高まることを報告している。本実験では、根組織切片から再生した培養幼植物体の葉柄および根組織切片を再度外植体として用いて培養した結果、外植体から多数の再生植物が安定して得られた。このことから、セリの*in vitro*培養体の組織切片からの不定胚誘導には2,4-Dが適していることが確認できた。これは、培養体の組織は若いので細胞分裂や植物体を再生する能力(再分化能)が高いためと考えられる。

野菜における不定胚誘導の培養材料には、細胞分裂の盛んな茎頂、実生、若い葉、未熟胚および胚軸等が用いられている(田部井, 1990)。また、実生の根組織からの不定胚誘導の報告は、ニンジン(入谷ら, 1980)、*Brassica napus*(Lazzeri and Dunwell, 1984)、ホウレンソウ(Komaiら, 1996)などで見られるが、*in vitro*培養体の根組織切片を用いた不定胚誘導の報告例は少ない。ハマボウフウの種子胚を無菌培養により発育させて得た実生の各種組織切片を外植体として培養した結果、葉柄および根組織は子葉組織および種子胚組織よりカルス形成率が高いことを報告している(平井ら, 1995)。

本実験でも、根および葉柄組織からの植物体再生は容易であり、根組織は葉柄組織よりもカルス形成率および不定胚形成率が高かったことから、培養幼植物体の根組織は再分化能の高い細胞であることが推察される。

次に、不定胚誘導による大量増殖を図るためには、誘導したECの維持・増殖のための培養条件の検討が必要である(西村ら, 1990)。セリでは、小花から誘導したECの維持・増殖には2,4-D 0.5 mg/l添加培地が適するという報告(Kim and Lee, 1995; Yong and Lee, 2000)があるが、本実験では検討しなかった。その理由は、*in vitro*培養体の根組織切片からの不定胚誘導法は他の組織部位に比べて効率的である。すなわち、簡単な操作で無菌の大量切片が容易にしかも安定して得られることから計画生産という点では非常に実用的な増殖法である。

なお、再生植物は、バーミキュライトで順化後、市販の育苗用土を用いてポット植えで順調に生育することを認めた。今後、本手法がセリの周年栽培、水耕栽培等の新作型へ活用されることを期待し、得られた再生植物について簡易な順化法を検討すると共に、セル成型育苗法についての検討が必要である。また、外植体の採取部位の違いや葉柄・根組織切片を繰り返し培養に供した際の形態的・遺伝的変異についても調査する必要がある、今後の課題である。

第IV章 サクラソウの根組織培養による種苗生産技術の確立

— 培養体由来根組織培養による *in vitro* 繁殖 —

サクラソウは河川敷や草原など明るい湿地に生育するわが国原産の多年生草本であるが、全国的には野生状態での自生地が多くは開発のため消失し、山野草愛好家による採集もあって保護地以外には絶滅寸前となっている(井上, 1993)。また、江戸時代に作出された約200品種の園芸品種(大垣, 1979; 鳥居, 1980)も現在は少数の趣味園芸家により株分けで増殖・維持されている状況にある。近年、中国地方の中山間地域では、サクラソウの自生地の復元を目指して、また、希少園芸品種の鉢花生産を推進するために種苗増殖に取り組んでいる自治体がある。種苗の大量増殖には組織培養技術の利用が考えられるが、操作が簡単で増殖率が高く、短期間で安定して育苗できなければ実用化が難しい。

サクラソウ類(*Primula* spp.)の組織培養による大量増殖に関する報告は、既に、Coumansら(1979)、松本ら(1986)、神田・古川(1987)、Shimadaら(1997)、滝平ら(1998)およびYamamotoら(1999)と多くあり、そのほとんどが野生種の葉切片を外植体に用いた方法である。*in vitro* で生育した小植物体は滅菌することなくその組織切片を外植体として利用することが可能である。中でも、根組織切片は細根をメスで切るだけで一度に多数の外植体を取り扱える点で優れている。

根組織切片から再生植物体を得られたという報告は、セイヨウアブラナ(Lazzeriら, 1984)、シンビジウム(Yasugiら, 1994)、シロバナストケシア(Hosokiら, 1995)、シオデ(山本, 1995)、シラカンバ(Vaarioら, 1995)、ハウレンソウ(Komaiら, 1996)、ミヤマタタビ(劉ら, 1998)等にみられる。ここで使用される植物生長調節物質は、6-benzyladenine (BA), kinetin, zeatin, α -naphthaleneacetic acid (NAA), indole-3-acetic acid (IAA), 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)など種によって異なる。そこで、サクラソウ園芸品種の葉切片からの植物体再生における品種間差異を調査するとともに、*in vitro* 再生植物の根組織切片を利用した大量増殖法の確立を目的として実験を行った。

材料および方法

1. 葉切片からの植物体再生における品種間差異

供試材料は、園芸品種36品種と広島県内の自生種2系統を供試した(表29)。鉢植え株の萌芽時新葉を採取し、水道水で洗い70%エタノールに数秒間浸漬後、次亜塩素酸ナトリウム溶液(有効塩素0.5%, Tween20添加)に15分間浸漬して滅菌した。その後、クリーンベンチ内において滅菌水で3回洗浄した後、葉切片(1×1 cm 角)を作出して外植体に用いた。外植体は容器(高さ90mm, 径20mm 試験管)当たり1個, 品種当たり各20個とし、水平に置床した。

培地は、MS培地を2倍に希釈したものを基本に用いた。3%ショ糖と植物生長調節物質として 4.44×10^{-6} M BA と 5.37×10^{-7} M NAA とを添加後、pH5.7に調整して0.8%寒天を加え溶解したものを容器当たり6 ml注入し、オートクレーブで滅菌(1.2 kg cm^{-2} , 121°C, 15分間)して作成した。外植体置床後は、25°C, 3,000 lx(白色蛍光灯), 16時間照明条件下で60日間培養を行った後、外植体からの植物体再生率を調査した。

2. 培養体由来根組織切片からの植物体再生

1で得られた *in vitro* 再生植物の根組織を供試し、クリーンベンチ内で切り取った細根切片(長さ約1.5cm)を外植体に用い、以下の実験を行った。

1) BA と NAA 添加濃度の影響

品種‘三国紅’を供試した。試験区は、MS培地(3%ショ糖)を基本に0, 10^{-6} , 10^{-5} M BA と0, 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} M NAA とを組み合わせて添加した12区を設けた。培地は、pH5.7に調整後、0.8%寒天を加えて溶解し、培養容器(高さ90mm, 径25mm試験管)当たり10mlを注入し、オートクレーブで滅菌(1.2kg cm^{-2} , 121°C , 15分間)して作成した。

試験規模は、容器当たり外植体3個, 区当たり10容器(外植体30個)を用い2反復で行った。培養は、1の実験と同様の条件下で行い、外植体置床30日後に外植体からのカルス形成率を調査し、その後、植物生長調節物質を添加しないMS培地(フリー培地)に移植して30日間継代培養した。培養終了後に培養体の新鮮重、カルスからの不定芽形成率、外植体当たりの伸長シュート数および伸長シュートからの発根率を調査した。なお、シュート数は長さ1cm以上に伸長したものを数えた。

2) 培養温度の影響

品種‘乙女の袖’を供試し、 10^{-6} M BA添加MS培地(3%ショ糖, 0.8%寒天)に外植体を置床後、光条件3,000 lx(白色蛍光灯), 16時間照明の温度勾配人工気象器内で15, 20, 25, 30°C の4区を設けて培養した。その他の試験方法、試験規模および調査は1の実験と同様に行った。

3) 光の影響

品種‘車白’と‘乙女の袖’を供試し、2)の実験と同一の培地に外植体を置床した。試験は、 25°C の培養室内で光条件について、照明(3,000 lx, 白色蛍光灯16時間照明)区と暗黒(無照明)区を設けて30日間培養し、その後は、両区とも照明下で培養した。その他の試験方法、試験規模および調査は1の実験と同様に行った。

4) 品種間差異

園芸品種10品種と自生株(広島県芸北町産)を供試し(表33), 10^{-6} M BA添加MS培地(3%ショ糖, 0.8%寒天)に外植体を置床後、 25°C , 3,000 lx(白色蛍光灯), 16時間日長条件下で培養した。試験規模は、培養容器(高さ90mm, 径25mm 試験管; 培地量10ml)当たり外植体2個, 区当たり10容器(外植体20個)の2反復で行った。その他の試験方法および調査は1の実験と同様に行った。

なお、再生植物は、バーミキュライトを詰めた育苗箱(長さ345mm×幅265mm×深さ70mm)に仮植し、ポリプロピレン樹脂容器(長さ450mm×幅315mm×深さ165mm)内に入れてかん水後、アクリル樹脂の蓋(高さ55mm)をして3週間順化した。その後、市販の赤玉土と腐葉土を混合した用土(培養土)でポット植えし、ガラス室内で育苗した。

結 果

1. 葉切片からの植物体再生における品種間差異

供試した38品種・系統の葉片培養の結果を表29に示した。植物体再生率は、品種間差異が大きく認められた。すなわち、‘紫光梅’、‘喰裂紙’、‘神代冠’、‘人丸’、‘富の春’5品種の植物体再生率は85～100%と非常に高かった。次に、‘酒中玉’、‘狂獅子’、‘駄路の鈴’他10品種と自生株2系統の植物体再生率は50～72%の間にあった。その他の供試品種では、植物体再生率40%台が2品種、30%台が5品種、20%台が4品種、10%台が3品種であり、残りの7品種は再生植物が得られなかった(図36, 図37)。

表29 サクラソウ葉切片からの植物体再生における品種間差異^z

品種・系統	植物体再生率 ^y (%)	品種・系統	植物体再生率 ^y (%)
紫光梅	100	秋風楽	33
喰裂紙	94	戦勝	32
神代冠	89	北斗星	30
人丸	85	墨染川	29
富の春	85	桃園	25
酒中玉	72	竜田の夕	21
狂獅子	70	竹取姫	20
駄路の鈴	69	無礼講	18
南京小桜	61	桜川	18
関の戸	60	墨田の花火	16
羅生門	60	須磨の渚	0
三国紅	60	検光	0
乙女の袖	58	苔漏の月	0
銀世界	56	福包	0
車白	55	翁の友	0
枝珊瑚	45	白鷺	0
絞竜田	41	朝日の匂	0
赤蜻蛉	33	自生株 ^x A	76
砧	33	自生株 ^x B	68

^z 外植体を 4.44×10^{-6} M BA および 5.37×10^{-7} M NAA 添加1/2MS培地へ置床し、60日間培養後に調査

^y 培養したすべての外植体に対する再生植物体の得られた外植体の割合を植物体再生率(%)とした

^x A: 広島県比婆郡西城町(現在庄原市)

B: 広島県山県郡芸北町(現在北広島町)

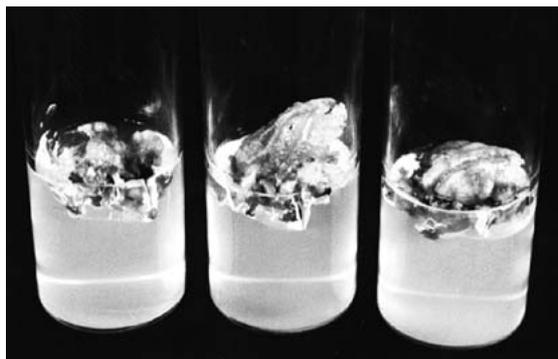


図36 葉切片からの不定胚形成

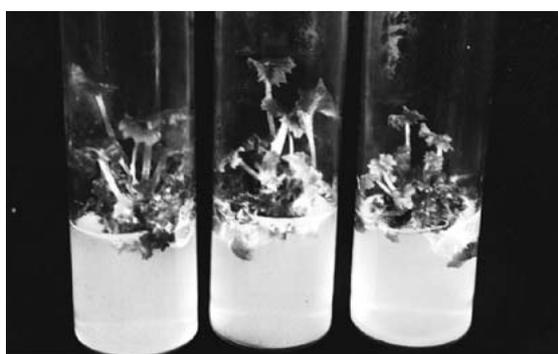


図37 不定芽の伸長(植物体再生)

2. 培養体由来根組織切片からの植物体再生

1) BA と NAA 添加濃度の影響

BA および NAA 無添加(0 M BA, 0 M NAA)区と BA 無添加の 10^{-7} M NAA 添加区では, 外植体から直接不定芽形成が25~37%認められた(図38)。これに対し BA を添加した区では, 外植体の切断面に緑色で球状のカルスが盛り上がり形成された(図39)。カルス形成率は, 10^{-6} M BA 添加培地では NAA 無添加区および 10^{-7} M NAA 添加区が100%で, カルスからの不定芽形成率も87~100%と高かった。 10^{-6} ~ 10^{-5} M NAA 添加区では, カルス形成率は43~61%, 不定芽形成率は13~57%と, NAA の添加濃度が高くなるにつれ低くなった。 10^{-5} M BA 添加培地では 10^{-7} ~ 10^{-5} M NAA 添加区でいずれもカルス形成率は100%であったが, カルスからの不定芽形成率は 10^{-6} M NAA 添加区が97%と高く, 次いで 10^{-7} M NAA 添加区の87%であった。形成した不定芽(図40)は, フリー培地に継代培養するとシュートが伸長するとともに発根し, 再生植物に生育した(図41)。シュートからの発根率は, 10^{-6} M BA 添加培地の NAA 無添加区および 10^{-7} ~ 10^{-6} M NAA 添加区が70~84%と他の試験区に比べて高かった(表30)。

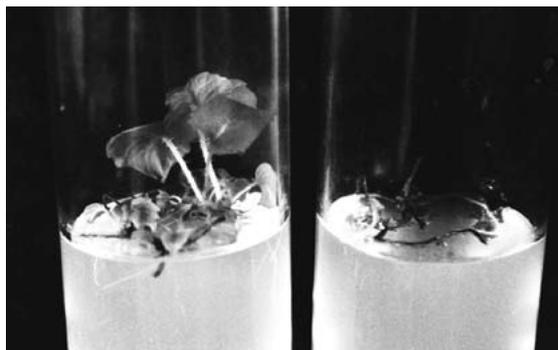


図38 根組織切片からの不定芽形成(BA および NAA 無添加区)

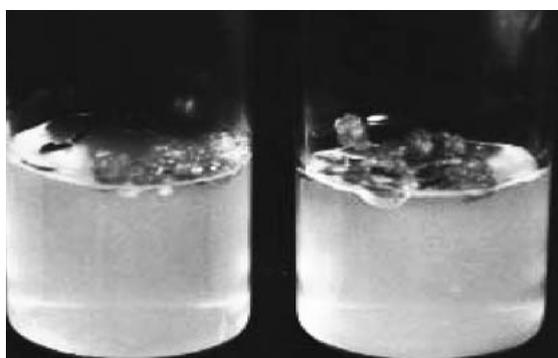


図39 根組織切片からのカルス形成(BA 添加区)

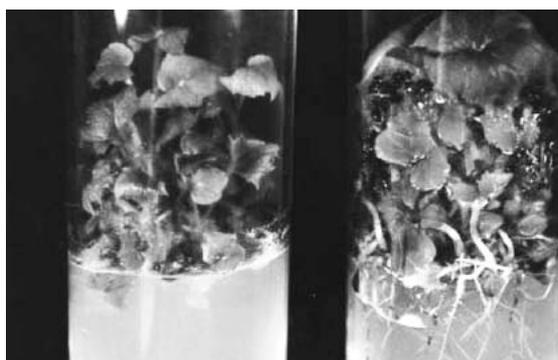


図40 根組織切片カルスからの不定芽形成



図41 根組織切片から形成したカルスを，フリー培地へ移植して得た再生植物

表30 BA と NAA の添加濃度がサクラソウ根切片からのカルスおよび不定芽形成に及ぼす影響

植物生長調節物質		カルス 形成率 ^z (%)	培養体 新鮮重 ^y (mg/外植体)	不定芽 形成率 ^y (%)	伸長シュ ート数 ^y (本/外植体)	発根率 ^x (%)
BA (M)	NAA (M)					
0	0	0	34	37	1.5±0.3 ^w	68
0	10 ⁻⁷	0	24	25	1.0±0	50
0	10 ⁻⁶	0	—	0	—	—
0	10 ⁻⁵	0	—	0	—	—
10 ⁻⁶	0	100	433	100	6.4±0.6	84
10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	100	133	87	3.4±0.4	69
10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	61	181	57	2.8±0.3	71
10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	43	78	13	1.0±0	25
10 ⁻⁵	0	56	180	52	3.0±0.5	9
10 ⁻⁵	10 ⁻⁷	100	166	87	4.2±0.4	23
10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	100	196	97	4.9±0.5	10
10 ⁻⁵	10 ⁻⁵	100	129	48	2.1±0.3	50

供試品種：‘三国紅’

^z 植物生長調節物質添加培地で30日培養後に調査

^y フリー培地へ移植し，30日間継代培養後に調査

^x シュートの伸長した培養体の発根率

^w 平均値±SE. (n=30)

2) 培養温度の影響

外植体からのカルス形成率は，15℃区，20℃区，25℃区ではいずれも100%であったが，30℃区では30%と低かった(表31)。形成したカルスの大きさは，20℃および25℃区が15℃区よりも大きかった。カルスからの不定芽形成率は，15℃区，20℃区，25℃区ではいずれも100%であったが，30℃区では23%と劣った。外植体当たりの伸長シュート数は，20℃区と25℃区が5.7～5.9本と多く，15℃区と30℃区はともに少なかった。培養体新鮮重も伸長シュート数と同様の傾向にあった。発根率

表31 培養温度がサクラソウの不定芽形成および培養体の生育に及ぼす影響

温度 (℃)	カルス 形成率 ^z (%)	培養体 新鮮重 ^y (mg/外植体)	不定芽 形成率 ^y (%)	伸長 シュート数 ^y (本/外植体)	発根率 ^x (%)	根数 (本)
15	100	169±15 ^w	100	2.9±0.2 ^w	63	3.7±0.4 ^w
20	100	428±32	100	5.9±0.4	93	6.6±0.8
25	100	337±40	100	5.7±0.4	60	4.2±2.0
30	30	24±2	23	2.4±0.4	0	—

供試品種：‘乙女の袖’

^{z,y,x,w} 表30と同様

表32 光の有無がサクラソウの不定芽形成および培養体の生育に及ぼす影響

品種	光条件	カルス 形成率 ^z (%)	培養体 新鮮重 ^y (mg/外植体)	不定芽 形成率 ^y (%)	伸長 シュート数 ^y (本/外植体)	発根率 ^x (%)	根数 (本)
車白	照明	100	750±55 ^w	100	7.9±0.4 ^w	100	10.0±0.5 ^w
	暗黒	100	282±27	100	4.3±0.3	83	6.5±0.7
乙女の袖	照明	100	333±28	100	5.0±0.3	90	5.1±0.6
	暗黒	100	155±17	100	2.7±0.2	55	2.2±0.3

^{z,y,x,w} 表30と同様

は20℃区が93%と高く、根数も6.6本と多かった。30℃区では培養体の生育が劣り、発根も認められなかった(表31)。

3) 光の影響

外植体置床後30日間の光条件について検討した結果、カルス形成率には差は見られなかったが(表32)、形成したカルスの大きさは照明区の方が大きい傾向にあった。不定芽形成率はどちらも100%で差がなかったが、培養体新鮮重、外植体当たりの伸長シュート数、発根率および根数についてはいずれも照明区が勝っていた。この傾向は供試した2品種とも同様であった(表32)。

4) 品種間差異

供試した品種・系統すべてが100%のカルス形成率を示した(表33)。カルスからの不定芽形成率は、供試10品種中、7品種で93~100%と非常に高かった。その他3品種も70~80%で自生株の78%と同等であった。外植体当たりの伸長シュート数は、‘狂獅子’が8.9本で一番多く、‘富の春’と‘羅生門’が2.8~3.1本と少なかった。他の品種・系統は4.2~6.0本とほぼ同数であった。培養体新鮮重も伸長シュート数とほぼ同様の傾向にあった。発根率は‘車白’と‘乙女の袖’が94~88%と高く、他の品種・系統は52~80%であった。根数は、供試品種の多くで4~6本とほぼ同数であ

表33 サクラソウ根切片からの不定芽形成における品種間差異

品種・系統	カルス 形成率 ^z (%)	培養体 新鮮重 ^y (mg/外植体)	不定芽 形成率 ^y (%)	伸長 シュート数 ^y (本/外植体)	発根率 ^x (%)	根数 (本)
車白	100	572±45 ^w	100	6.0±0.3 ^w	94	6.6±0.5 ^w
駅路の鈴	100	244±23	100	4.2±0.3	80	2.6±0.5
竹取姫	100	329±43	100	5.8±0.7	65	4.9±1.0
人丸	100	369±30	100	5.3±0.4	75	4.5±0.6
乙女の袖	100	333±28	98	5.0±0.3	88	5.1±0.6
秋風楽	100	397±36	98	4.4±0.3	63	2.5±0.5
富の春	100	176±22	93	3.1±0.4	72	1.7±0.4
枝珊瑚	100	260±33	80	4.2±0.4	52	3.8±1.0
狂獅子	100	402±35	70	8.9±0.8	63	4.8±0.8
羅生門	100	163±33	70	2.8±0.3	65	4.0±1.5
自生株(芸北)	100	485±65	78	5.8±0.4	70	4.7±0.4

^{z,y,x,w} 表30と同様

ったが、‘駅路の鈴’、‘秋風楽’および‘富の春’では1.7~2.6本と少なかった(表33)。再生植物(培養苗)は、パーミキュライトを詰めた育苗容器内に仮植し、透明なアクリル樹脂製の蓋をして湿度を保ち3週間順化した後、培養土を用いてポット植えしたところすべての品種で90%以上の個体が活着した。

考 察

組織培養による大量増殖を行う場合には、入手の容易な葉片や葉柄が初代培養の外植体として利用されることが多く、サクラソウ属(*Primula*)では、*P. sieboldii*(松本ら, 1986; Yamamotoら, 1999; 強瀬・松本, 1992), *P. obconica*(Coumansら, 1979; 神田・古川, 1987)および*P. nutans*(滝平ら, 1998)の報告がある。これらはいずれも、MSあるいは1/2MS培地を用い、添加する植物生長調節物質にはBAとNAAが組み合わせて使用されており、その添加濃度はそれぞれ0.1~1mg/lである。本試験においても、自生株では $4.44 \times 10^{-6}M$ (1mg/l)BAと $5.37 \times 10^{-7}M$ (0.1mg/l)NAAを添加した1/2MS培地で葉切片の68~76%から再生植物が得られた。しかし、供試した36園芸品種について再生率に品種間差が大きく認められ、3品種が90%以上の再生率であったのに対し、7品種については全く再生植物が得られなかった。

貴志ら(1994a)は、バイカカラマツの葉柄培養において花色や一重・八重咲きにより不定胚形成数が異なることを、また、古川・重松(1991)は、ニンジンの分果からの不定胚形成能は品種間で大きく異なり、それは遺伝的要因によると報告している。本実験に供試したサクラソウの園芸品種は、大垣(1979)、鳥居(1980)によると、江戸時代に交配実生から作出されたものが多く、花色、花形、花の咲き方等の形質変化に富んでいることから、不定芽形成能の品種間差は遺伝的要因による

ことは十分に推察される。

一方、Shimada ら (1997) は *P. cuneifolia* var. *hakusanensis* で、滝平ら (1998) は *P. nutans* で葉片からの再分化に及ぼすサイトカイニンの種類の影響を検討し、BA を含む培地で不定芽形成を、また、zeatin および thidiazuron (TDZ) は不定芽と不定胚の形成を促進することを認めている。そこで、本実験でも zeatin (10^{-6} , 10^{-5} M) および TDZ (10^{-6} , 5×10^{-6} M) の添加効果についてサクラソウ園芸品種 ‘北斗星’ と ‘秋風楽’ の 2 品種を供試して検討した。その結果、葉切片からのカルス形成は、zeatin, TDZ とともに 100% 認められたが、フリー培地に移植後のカルスからの不定芽形成率は、zeatin 10^{-6} M 添加培地で 68%, 10^{-5} M 添加培地で 50% であった。しかし、TDZ 添加培地で形成したカルスは肥大するだけで不定芽、不定胚の形成は全く認められなかった(データ省略)。

以上のように、*Primula* 属植物では、葉片からの植物体再生は、種・品種とともに培地に添加するサイトカイニンの種類の両方に依存していることが明らかとなった。今後、植物生長調節物質の種類と添加濃度についてさらに検討を加えれば、本試験で再生植物が得られなかった品種についても増殖が可能になるものと思われる。

次に、培養容器内で大量の種苗生産を効率的に行うには、外植体から得られた再生植物の組織切片を利用した継代培養系の確立と増殖期間の短縮を図ることが重要である。サクラソウの *in vitro* 植物由来の葉切片は容器外栽培由来の葉切片に比べてシュート形成能力が大きいことが報告 (Yamamoto ら, 1999) されている。本試験では、葉よりも切片の切断が容易でしかも多数の外植体が一度に得られる根組織を供試した。その結果、BA 10^{-6} ~ 10^{-5} M 添加培地に置床した細根切片からは葉切片と同様に切断面に緑色のカルスが高率で形成し、その後、カルスから不定芽が形成した。フリー培地に移植した不定芽は、継代培養によりシュートが伸長するとともに発根して再生植物となった。

根組織切片からの不定芽および不定胚形成の例は、緒言に述べた以外にもあり、ミヤコグサ (Rybczynski・Badzian, 1987), トルコギギョウ (Furukawa ら, 1990), セイヨウオトギリソウ (Ishimaru・Shimomura, 1992) の報告があるが、これらの種では植物生長調節物質を添加しない培地で再生植物が得られている。なお、外植体には実生あるいは本実験と同様に再生植物の細断した根が利用されており、根培養は大量増殖に有効であることが明らかにされている。

ところで、一般に植物組織培養は 25℃, 3,000 lx の培養条件下で行われる。そこで、根組織切片培養における温度と光の影響を検討した結果、外植体からのカルス形成およびシュート伸長の適温は 20~25℃ 付近にあり、発根も促進される傾向にあった。なお、15℃ 区, 20℃ 区および 25℃ 区のカルス形成率はいずれも 100% であったが、30℃ 区では 30% と非常に抑制された。これは、シラネアオイで鈴木ら (1999) が、葉片からのシュート形成は 15~20℃ が 25℃ よりも良く、バイカカラマツで貴志ら (1994a) が、茎切片からのカルス形成率は 25℃ より 20℃ で高かったと報告していることと一致し、山野草類の培養温度は 25℃ よりも幾分低い方が良いものと思われる。

サクラソウの葉切片培養では、培養開始後 2 週間の暗黒処理がシュート形成を促進する (Yamamoto ら, 1999)。一方、セイヨウオトギリソウの根からのシュート形成 (Ishimaru・Shimomura, 1992), シンビジウムの根からの PLB 誘導および植物体再生 (Yasugi ら, 1994), アスパラガスの茎頂培養におけるシュートの発生 (Hasegawa ら, 1973) は、いずれも照明下で促進されることが報告されている。本実験でも、根からのカルス形成率は照明の有無による差はみられなかったが、カル

スからの伸長シュート数は照明下の方が暗黒下よりも多くなる傾向が認められ、発根率も高かった。このことから、組織切片からのカルスおよび不定芽形成に及ぼす光の影響は、外植体に用いる組織切片の種類や暗黒処理条件により異なるが、根組織切片は外植体置床後から概ね照明下で培養を行う方が好ましいと思われる。

以上により、葉切片からの再生植物を利用した根組織切片培養はサクラソウ園芸品種の *in vitro* 繁殖法として有効であることが認められた。なお、サクラソウ葉切片からの再生植物には培養変異は認められないという報告(Yamamoto ら, 1999)はあるが、根組織切片からの再生植物を鉢花として利用するためには、培養変異について検討する必要があるだろう。

総合考察

組織培養による種苗増殖を行うためには、外植体として用いる組織切片から確実に多数の培養体が得られ、安定して再生植物に育成できる培養系の確立が必要である。また、その技術をもちいて実際に農業生産を行うためには、省力・低コストで、簡易な手法で行える必要がある。低コスト化は、増殖率の向上と共に、確立した手法を誰が何処で行うかということにも関わる問題であり、それを解決しなければ地域農業の現場に組織培養技術を導入することはできない。

本研究は、組織培養を利用して山菜・観賞用野草等の未利用植物資源を地域振興に役立てることを目的に行った。これまで数多くの植物種について組織培養技術に関する報告がなされてきたが、組織培養を利用した種苗生産技術が一般農家までなかなか普及しない。その理由は専門的な知識に加えて専用の施設・機器類が必要であり、また経済的にも採算がとれないことが大きく影響している。確立した組織培養技術を生産者へ技術移転する場合には、高度な培養技術よりもより簡便な方法で、しかも簡単な器具を用いて生産者自らが大量増殖を行うようになることが必要であると考えられる。そこで、タラノキ、アシタバ、セリおよびサクラソウについて *in vitro* 培養体の根組織切片を用いた器内大量増殖と簡易育苗システムの開発を行った。確立した培養苗生産システムの概略を図42に示す。

山菜・観賞用野草の繁殖と種苗生産について

植物の種苗生産の方法は種子繁殖と栄養繁殖に大別される。種子繁殖は簡便で、確実に多数の株をつくることができ、大量増殖に適しているが、遺伝的に固定されていないと形質の分離がみられる。葉、茎、根など植物体の一部を用いて増やす栄養繁殖は、植物体の器官再生能力を利用した増殖法で、親と同じ形質をもつ個体を得ることができる(今西, 1997)。山菜類は一般的には、種類により異なるがほとんどは種子繁殖あるいは株分けによる増殖が行われている。例として、ウドは、親株からの株分けが一般的であるが、その他、種子による実生、軟化茎によるさし芽法がある(沢池, 1989)。しかし、株分けでは一つの種株から数株しか増やせないため繁殖率が低く、また土壌病害などに汚染されやすく健全な種苗確保が難しい等の問題がある(井田, 1989)。シオデは実生繁殖では発芽率が低く、発芽までに約1年、収穫までに4年以上の栽培期間を必要とすることと、ウイルス病の発生率が高いためにフリー苗の確保とともに、強健・多収系統の育成が望まれている(黒田・川村, 1994)。本研究で取り上げたタラノキは、根伏せ繁殖で容易に繁殖できるが増殖率が低く、断根による母株への立ち枯れ病菌の伝染が問題である(内田ら, 1984)。

組織培養による種苗増殖の利点としては、①ウイルスフリー苗が増殖でき、その栽培により品質・収量が高まる、②従来の栄養繁殖法が適応できない植物の増殖が可能、③有用な表現型の選抜個体のクローン化による品種化が可能、④培養により誘導された有用なソマクローナル変異の個体が可能、培養室内で繰り返し増殖ができ、計画的周年生産が可能、等があげられる(田中, 1997)。この組織培養による大量増殖に関する山菜類についての報告は多くあり、中でもウド(山元, 1997; 野口, 1997; Leeら, 2002; 西平ら, 1998)とシオデ(村山・井澤, 1988; 田沢・笹原, 1988; 田沢ら, 1990; 渡部ら, 1990; 川村・黒田, 1990; 吉野ら, 1991; 山本, 1995; 川村・久島, 1995)について多い。本研究で取り上げたタラノキは、雨宮ら(1992)、貝守(1986)、Yoshizawaら(1994)、

Amamiya・Mochizuki(2002), アシタバは, 中原ら(1991a, b), 遠藤・庄子(1994), セリは, 遠藤ら(1987), 遠藤・庄子(1994)といずれも報告例は少ない。そこで, 本研究では, これら山菜類を新たに導入するにあたって栽培する種苗の増殖を, 組織培養を利用して行うことを前提に検討した。すなわち, 茎頂培養あるいは葉柄切片培養で得た *in vitro* 培養体の根組織切片を外植体に用い, 容器内で短期間に大量の培養幼植物体を増殖して育苗するという種苗生産体系の確立を目的に試験した。

開発した組織培養法は, 今までに報告例の無い新しい手法であり, タラノキのトゲなし系統やサクラソウの園芸品種等, 突然変異体や希少植物・品種の急速大量増殖手法として有効であり, 短期間に大量のセル成型苗が生産できるシステムである。また, 既存の組織培養施設があれば, 生産者自らが行える簡易で実用的な手法である(図43, 図44)。

根組織切片からのカルス形成

開発した一連の技術の体系化は, 植物細胞の有する全形成能(分化全能性)を利用したものである。すなわち, 一度分化した体細胞が再び若返って細胞分裂能力を回復し, 分化全能性をもつようになる脱分化と再び分化して組織を形成する原理に基づいている(竹内, 1972)。組織培養の歴史は Haberlandt(1902)がムラサキツユクサの葉肉や表皮細胞の培養を試みたことから始まる。その後, Gautheret(1939)らは, タバコ, ニンジン, ポプラ, カエデなどの形成層の培養に成功し, 現在の組織培養の基礎を築いた。1950年代に入り, Muirら(1954)がタバコの単細胞の培養に成功し, Stewardら(1958)は, ニンジンの単細胞から個体の再生を成し遂げ, 植物細胞の分化全能性を証明した(細木, 1997)。

組織培養による大量増殖を行う場合には, まず, 植物体のどの組織・器官のどの部位を切り取り外植体として用いるかが問題である。一般に, 植物の茎頂はもとより若い葉や茎, 根などから容易に植物体が再生し得ることは広く知られている。この植物細胞の分化全能性に基づく植物の器官分化は, 植物生長調節物質のオーキシンとサイトカイニンの量比によって決定される。タバコ茎切片の培養時にみられるオーキシンとサイトカイニンによる反応では, オーキシン高濃度下では不定根が, またサイトカイニン高濃度の場合には不定芽が形成され, その中間の量比ではカルス形成がみられる(Skoog・Miller, 1957)。本研究では, タラノキ, アシタバおよびセリでは 2,4-D を, サクラソウは BA を添加した培地を用いると, 根組織切片からカルスが高率に形成されることが認められた。不定根の原基は維管束と維管束の間の柔組織の細胞を起源としている(谷本, 1986)ことから, 外植体に用いた *in vitro* 培養体の根組織は, 初代培養の組織切片から形成したカルス(若い細胞)から発生した組織であり分化全能性に優れているためにカルスおよび不定胚形成能が高いものと考えられる。Wernicke・Brettell(1980)によると, モロコシの若い実生の葉片培養では頂端分裂組織に近いほど不定胚形成率が高く, 頂端分裂組織から離れるほど, また葉の先端に近いほど不定胚形成率は低下する。組織分化が進むにつれて体を構成している細胞はしだいに分化全能性が抑えられ, 分裂組織を除いては細胞分裂を行うことは無くなる(竹内, 1972)ことから, 外植体には若い組織を用いる必要がある。本研究において, 植物体再生後長期間培養している *in vitro* 培養体の根組織切片を外植体とした場合でも, カルスおよび不定胚形成率が低下する傾向が認められたことから, 外植体には若い根組織から採取した切片を用いることが確認された。

根組織培養の有効性

一般に組織培養は、細胞分裂の盛んな組織切片を外植体として用い、植物生長調節物質を添加した培地で培養することにより可能となる。その手法は、大きく二つに分けられ、一つはオーキシシンとサイトカイニンの種類および量比を適宜選択することで再分化が可能となるのに対し、他はオーキシシン処理により得られたカルスを植物生長調節物質の含まない培地に移植することで不定胚を経て再分化個体が得られる(高柳, 1988; 原田・駒嶺, 1989; 西村ら, 1990)。

本研究では、タラノキ、アシタバ、セリおよびサクラソウの4種類とも、根組織切片を植物生長調節物質を添加した培地でカルスを誘導し、そのカルスをフリー培地に移植して継代培養後に不定芽あるいは不定胚が形成され再生個体が得られた。根組織切片から直接不定胚が形成された例としては、ツバキ(Kato, 1986; Plata・Vieitez, 1990; Vieitez・Barciela, 1990)、ヒマワリ(Finer, J. J., 1987; Freyssientら, 1988)、コーヒー(Hatanakaら, 1993)、ニンジン(入谷ら, 1980; 古川ら, 1989; Kiyosueら, 1989)、タバコ(Stolarzら, 1991)等に見られる。しかし、一般的に不定胚は、2,4-D添加培地でカルスを形成させた後、フリー培地に移植して継代培養することでカルスから形成する。山菜や薬用植物の例では、ウド(野口, 1997; 西平ら, 1998)では葉片および未成熟種子から、ハマボウフウ(平井ら, 1995)は種子胚、トウキおよびウイキョウ(大賀ら, 1989)は子葉及び胚軸、カラトウキ(Tsay・Huang, 1998)は未熟胚からそれぞれ不定胚形成の報告がある。これらの報告では、培地へ添加する植物生長調節物質はオーキシシンとして2,4-Dが用いられており、その添加濃度は0.5~1 mg/lであることから、本研究の試験結果とほぼ同様であった。

同様に野菜類の不定胚誘導のための培養材料には、細胞分裂の盛んな茎頂、実生、若い葉、未熟胚および胚軸等が用いられており(田部井, 1990)。実生の根組織からの不定胚誘導の報告例も、ニンジン(入谷ら, 1980)、*Brassica napus* (Lazzeri・Dunwell, 1984)、ホウレンソウ(Komaiら, 1996)などで見られる。なお、上記以外の種類では、ミヤコグサ(Rybczynski・Badzian, 1987)、トルコギキョウ(Furukawaら, 1990)、セイヨウオトギリソウ(Ishimaru・Shimomura, 1992)等で根組織切片からの不定芽および不定胚形成の報告があが、*in vitro* 培養体の根組織切片を用いた不定胚誘導の報告例は少ない。

本研究で開発したシステムは、無菌状態で取り扱いが容易で、しかも一度に多数の外植体を得られると共に種苗生産と、その苗を用いた栽培を考えた場合に再生植物(培養苗)の順化時の根組織の一部を用いて次期作型の種苗生産ができという画期的な方法である。従って、計画的な栽培が可能となる等の利点があり非常に効率的なシステムであることから、実際栽培に有効な手法を提供するものと考えられる。

本研究に供試した4種類の植物は、いずれも *in vitro* 培養体の根組織切片からの植物体再生が容易であったことから、培養幼植物体の根組織は再分化能の高い細胞であることが確認された。従って、*in vitro* 培養体の根組織(不定根)からの不定胚誘導という興味ある知見が得られたので、今後は他の種類についての応用が期待される。

培養体の *in vitro* 増殖

大量増殖を目的とした組織培養技術は、大きく分類すると茎頂培養および腋芽形成法、不定芽・不定根誘導法および不定胚誘導法などがあるが、この中で一番効率の良い増殖法は不定胚誘導法で

ある(高柳, 1988)。本研究において、タラノキ、アシタバおよびセリの根組織切片からの不定胚形成率は高く、増殖効率の良い培養手法となることが確認できた。なお、セリでは、莖頂培養再生植物の根組織切片は葉柄切片よりもカルス形成率および不定胚形成率が高いことが証明された(第Ⅲ章)。

シオデでは莖頂培養と不定芽・不定根誘導を組み合わせた連続多芽体培養による種苗大量増殖法が確立(黒田・川村, 1994)されているが、本研究で確立した不定胚経由の培養体はピンセットで分割し新しい培地に移植を繰り返すだけで不定胚の増殖と幼植物体の生育が同時に行われるので培養の簡素化・効率化の点では多芽体の分割増殖よりも勝っている。また、連続腋芽培養による増殖率は、奥野ら(1994a)のハカラシナの報告では2週間で4倍、3か月で約3,000倍である。これに比べて、第Ⅰ章の第2節(タラノキ)で述べたように本手法による増殖率は、根組織切片(外植体)置床後、9か月で40,000個体の幼植物体を得られるほど非常に増殖率は高い。しかも、培養方法はたいへん簡単で、外植体を2,4-D添加培地に置床してカルス形成させた後、植物生長調節物質を添加しない培地で継代培養を繰り返して行うだけである。

古在(1987)によると、明期における培養器内の炭酸ガス濃度と光放射強度を高めれば、培養小植物体の純光合成速度は増大し、生長が促進される。本研究ではほとんどの実験を25℃、3,000 lx、16時間照明下で行った。タラノキの根組織切片から誘導した培養体(カルス、不定胚)の増殖は、MS寒天(またはゲランガム)培地を、また、ある程度生育した培養幼植物体からの植物体再生は固体支持材と養液栽培用液肥による簡易培地を用いて行ったが、この場合には培地へのショ糖添加が必須であった。無糖培養が可能な植物片の大きさは、葉緑素を含んだ緑色の葉の面積が約20mm²程度あれば十分であるという(古在, 1998)。しかし、本研究で無糖培養を試みたが無糖培地では培養幼植物体の生育は進まなかった(第Ⅰ章・第2節, 第3節)。今後、無糖培養が可能となる培養幼植物体の大きさについて検討を加えることにより、更に培養の簡略化が図られれば生産コストの軽減にもなり、開発した種苗生産システムの実用(普及)性も高まるものと考えられる。

培養苗の実用性と生産コスト

in vitro 培養体由来根組織切片からの不定胚誘導による培養法は増殖率が非常に高いことが証明できた。しかし、確立した培養手法を実際に使用して苗生産をし、培養苗による栽培を行うためには、順化・育苗、培養変異および培養苗の実用性、生産コスト等についての検討が必要である。第Ⅰ章のタラノキについて、第3節で培養苗の直接順化・育苗法を確立し、第4節で品種間差異と培養苗の圃場栽培における実用性を検討した。また、培養苗の価格は、一般に、挿し木苗の2倍、実生苗の4倍程度と高価であると云われている(古在, 2002)。そこで、第5節では既存の培養施設を利用した培養苗の生産コストを試算した。その結果、培養苗には形態的変異は認められず、実際の圃場栽培における生育も従来の根伏せ繁殖苗と同様に生育し、タラノメの促成に利用できる親株の養成が1年で可能であった。また、既存の培養施設を利用して1.5haの圃場に栽植する苗(約10,000本)を増殖する場合の経費は348千円で、培養苗1本当たり約32円となり、資材費と人件費の割合は37.5:62.5であり、培養苗生産にかかる資材費は約12円と非常に低額である。これは、シュートが伸長したタラノキ培養幼植物体は、パーミキュライトを詰めたセル成型トレイに移植して密閉容器内で管理するだけでセル成型苗に養成できるためである。マタタビ(Sugawaraら, 1994)、サルナシ

(劉ら, 1995), ミヤマタタビ(劉ら, 1998), シオデ(川村・久島, 1995)等で報告のあるように, 組織切片から形成した不定芽の発根処理を経る必要はなく非常に簡単な方法である。

この培養苗の直接順化育苗法は, 培養の簡易化とともに現地圃場に近い場所でも実施できる方法であり, 生産コストの低減にも有効な方法である。上記のように人件費の占める割合が高いことから, 生産者みずからが組織培養ができる体制作りが必要である。本研究で開発したシステムが既存の培養施設の有効利用の糸口となり, そのことが地域農業の振興に役立つものと考ええる。

本研究で得られた成果の利用法

古在(2002, 2003)は, 21世紀には世界の熱帯林面積の減少から植林用の樹木苗の必要性和, 山野で略奪的に採取してきた薬草が枯渇してきていることから薬用植物栽培の需要が増すことに注目し, これらの培養苗生産の必要性について述べている。近年, 国内においても植物の有する機能性成分が注目され, それぞれの地域で, 長い間利用されてきた地域固有の特産野菜や山菜の栽培を推進する地域が全国的に見られる(中西・土井, 1997; 鈴木, 2003)。これらの植物資源を地域の財産として見直し, 植物組織培養の得意とする種苗増殖技術を活かせば, 未利用植物資源を積極的に地域農業の活性化に役立てることができると考える。

本研究で開発した *in vitro* 培養体由来根組織切片培養は, 短期間に目的とする数の種苗生産が可能である。この種苗生産システムは, 地域内にある山菜・観賞用野草等の未利用植物資源を有効利用するといった小規模生産に適しており, 地域の特徴や個性を生かした村興しの一方法としても活用できる技術である。組織培養を利用した種苗生産による地域の活性化に利用されることを期待している。

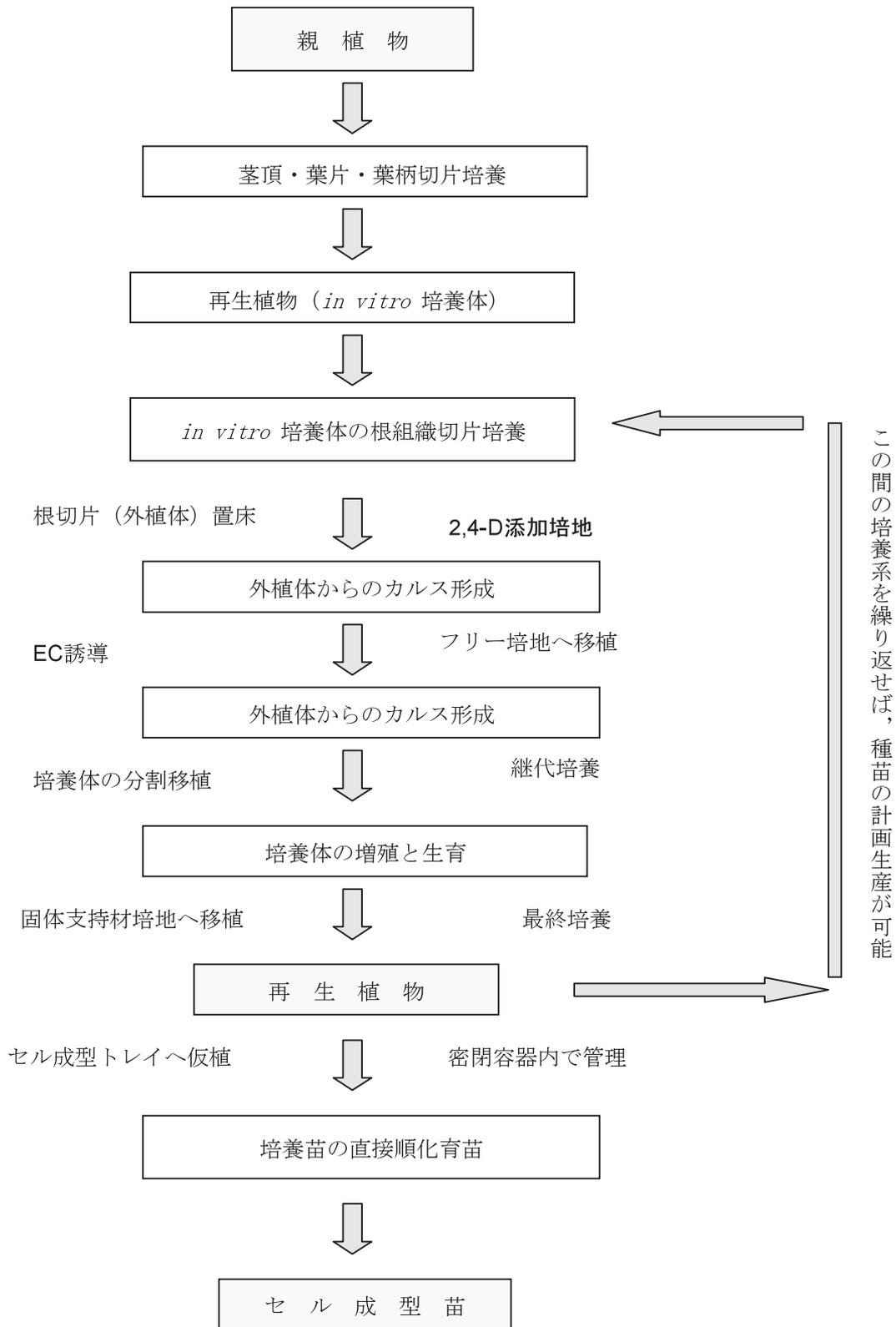
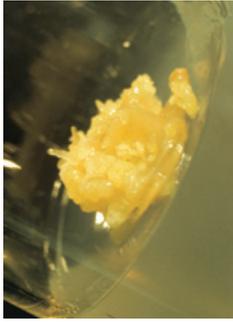


図42 山菜・観賞用野草の大量増殖と簡易育苗システム

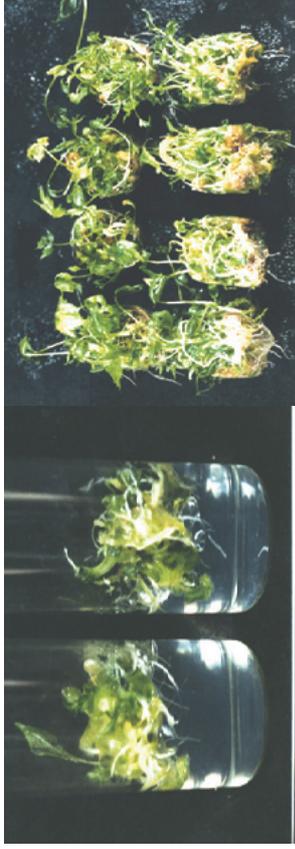


外植体からのカルス
経路による不定胚形成



培養幼植物体集塊
の分割移植

継代培養による培養体の生育と増殖

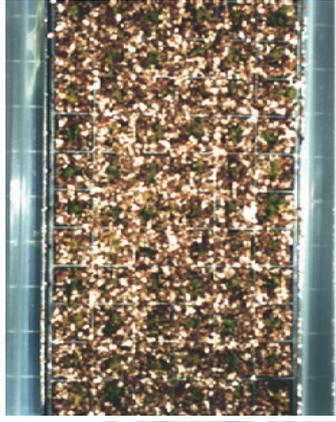


MSフリー培地に分割移植を繰り返す

セル成型トレイによる簡易育苗



継代培養により養成した
培養幼植物体



バーミキュライトを詰めた
セル成型トレイに仮植



温度と光の有る条件下の密閉容器内で管理



セル成型型苗



最終培養での植物体再生

図43 *in vitro* 培養体由来根組織培養による種苗生産体系の確立（タラノキを例に）



図44 組織培養技術を利用した地域農業振興（タラノキを例に）

摘 要

中国地方の中山間や瀬戸内島嶼部地域の活性化に役立てるため、山菜・観賞用野草の組織培養による種苗増殖技術の開発を目的に試験を行った。組織培養手法の簡易化・安定化・低コスト化を図るために、タラノキ、アシタバ、セリおよびサクラソウの4種類を供試し、*in vitro* 培養体根組織培養による大量増殖と簡易育苗システムの開発を行った。

1. タラノキの種苗生産技術の確立

培養体由来根組織からの不定芽、不定胚形成および植物体再生

タラノキにおいて安定した不定胚経由の植物体再生系を確立するため、*in vitro* 幼植物体由来根組織切片からのカルス、不定芽および不定胚形成に及ぼす2,4-Dの影響について検討した。MS培地を基本とし、2,4-Dを添加した培地に根組織切片を外植体として置床した。25℃、暗黒下で30日間培養後、形成したカルスをフリー培地に移植し、その後は3,000 lx、16時間日長下で継代培養し、以下の結果が得られた。

- 1) 外植体からのカルス形成は、2,4-Dを0.05mg/l以上添加した区で80%以上、カルスからの不定胚形成は0.5mg/l以上添加した区で45~100%認められた。
- 2) 高率に不定胚を誘導するためには、外植体の2,4-D添加培地での培養期間は25日間以上必要であった。
- 3) 形成したカルスを、フリー培地に移植して20~30日間隔で継代培養を行うと、不定芽および不定胚が形成され、多数の再生植物が得られた。
- 4) フリー培地で継代培養後に誘導したECを、2,4-D 0.01~0.05mg/l添加培地に移植すると幼植物体に発育するとともにその表面に不定胚が形成され、幼植物体は増加した。
- 5) 再生した幼植物体は、バーミキュライトで順化後、花崗岩風化土壌とバーク堆肥混合用土に鉢上げすると、45日後には圃場へ定植可能な苗木となった。

培養体の*in vitro*増殖ならびに植物体再生

組織培養によるタラノキの簡易種苗生産システムを確立するため、根組織切片から誘導した培養体の*in vitro*増殖と効率的な植物体再生法について検討した。その結果、

- 1) 培養体は、分割・移植して継代培養を行えば不定芽、不定胚の生育と共に幼植物体上に二次不定胚を形成し、30日後には移植時の4倍の生体重に増殖した。
- 2) 継代培養培地には、植物生長調節物質を添加しないMS培地に3%ショ糖を添加し、固形化剤として0.2%ゲランガムを加えたものを用いる。
- 3) 25℃、3,000lx、16時間照明の培養条件下で培養すると増殖率が高く、外植体置床9か月後には1外植体から40,000個以上の幼植物体を得られた。
- 4) シュートが伸長した幼植物体集塊は、100ml広口フラスコまたはポリカーボネイト製培養容器に移植して最終培養を行うと順化可能な再生植物に養成できた。
- 5) 最終培養時に、GA 5 mg/l添加培地を用いると幼植物体の生育が著しく促進され培養体からの再生植物体数が増加した。

固体支持材・培養液の種類が培養幼植物体の生長および順化に及ぼす影響

タラノキ *in vitro* 培養体根組織切片から不定胚を誘導し、継代培養により増殖養成した培養幼植物体の固体支持材培地と培養液が生育に及ぼす影響、およびセル成型トレイによる直接順化育苗について検討した。

- 1) バーミキュライトにパーライトまたは水苔を混合した培地を用いると培養幼植物体の生育が進み、効率良く再生植物体が得られた。
- 2) 固体支持材培地に施用する培養液は、ハイポネックスまたは市販の養液栽培用液肥を用いるとMS液体培地よりも生育が良かった。この場合、培養液にショ糖を添加しないと再生植物体数は劣った。
- 3) バーミキュライトを充填したセル成型トレイに培養幼植物体を分割置床し、灌水後密閉容器内で2か月間管理するとセル成型苗に育苗できた。
- 4) バーミキュライトの代わりに市販のセル成型用育苗培土を用いると充実した苗が得られるが育苗率は低下した。

品種間差異および培養苗の実用性

タラノキ *in vitro* 培養体根組織切片からの不定胚誘導および植物体再生の品種間差異について試験し、増殖した培養苗の変異調査と圃場栽培での生育を検討した。

- 1) 根組織切片からのカルス形成率は90%以上と非常に高く、カルスからの不定胚形成および植物体再生の品種間差はみられなかった。
- 2) 培養容器への通気は不定胚から発育した幼植物体の生育を促進した。
- 3) フローサイトメーターによる培養苗幼葉の核DNA量の変異は認められなかった。
- 4) 圃場へ定植後の培養苗の生育は、従来の根伏せ繁殖苗と同等で形態変異も観察されず、落葉後にはふかし用穂木として利用できる大きさとなった。
- 5) 以上により、タラノキ品種・系統の根組織切片から増殖した培養苗はタラノメ生産用の種苗として利用可能である。

根組織培養苗の生産コスト試算

タラノキの *in vitro* 培養体根組織培養による種苗生産を行う場合、既存の組織培養施設を利用し、新規に1.5haの圃場に定植する種苗(約10,000本)の生産コストを試算した。すなわち、外植体置床の初代培養、形成したカルスの移植、培養幼植物体の分割移植による継代培養、最終培養における植物体再生および培養幼植物体のセル成型育苗までの必要経費を計算した。

- 1) 組織培養の過程で必要な資材費は合計50.5千円で、その総作業量は、初代培養から最終培養まで延べ12人役、その人件費は81.6千円である。
- 2) セル成型トレイによる直接順化育苗に必要な資材費は合計80千円で、その作業量は20人役で人件費は136千円である。
- 3) セル成型苗育苗までに要する経費は合計約348千円となり、その内訳は、資材費37.5%、人件費62.5%である。従って、既存の組織培養施設を利用すれば培養苗1本当たりに係る経費は約32円で、セル成型トレイ(72穴)1個当たり約2,000円となる。

- 4) 組織培養過程で必要な高額機器類の固定経費と光熱費を加えた培養苗の生産コストは約104円となり、既存の組織培養施設を利用する場合の3倍となる。
- 5) 以上により、根組織培養による種苗生産システムは、既存の培養施設を生産者自らが利用して行えば経営的にも実用可能であることが判明した。

2. アシタバの根組織培養による種苗生産技術の確立

組織培養によるアシタバの増殖技術を確立するために、葉柄切片およびその再生植物の根組織切片からの不定芽、不定胚誘導および植物体再生について検討した。

葉柄培養は、未展開葉基部の横断切片を外植体として用い、1～2 mg/l 2,4-Dと0, 0.01および0.1 mg/l BAを組み合わせて添加したMS培地に置床し、25℃, 3,000 lx, 16時間照明下で行った。外植体から形成したカルスは、植物生長調節物質を添加しないMS培地へ移植して継代培養を行うと不定芽が形成し、外植体あたり4～10個の再生植物が得られた。

次に、再生植物の根組織切片を外植体として用い、2,4-DとBAを添加したMS培地に置床し、25℃の暗黒条件下で培養した。外植体からの不定胚誘導は2,4-Dを0.5 mg/l以上添加した区で認められ、1～2 mg/l 2,4-D単独添加区および0.01, 0.1 mg/l BA併用添加区ではいずれも100%の不定胚形成率であった。従って、不定胚形成にはBAの影響は少ないものと推察された。不定胚は、植物生長調節物質を添加しないMS培地に移植して継代培養を行えば幼植物体に生育した。なお、順化後、ポット植えした再生植物は、45日後には新葉が現れ生育は旺盛であった。このことから、アシタバの組織培養による増殖は、葉柄培養による不定芽形成よりも*in vitro*培養体の根組織切片培養による不定胚誘導の方が増殖効率が良いことが明らかとなった。

3. セリの根組織培養による種苗生産技術の確立

セリの*in vitro*培養体の根組織切片を利用した効率的な種苗増殖体系の確立を目的に根組織切片からの不定胚誘導について試験した。

*in vitro*培養体を得るため、頂芽または側芽の茎頂を、1/2 MS(3%シヨ糖)にNAA 0.1 mg/lとBA 0～0.1 mg/l添加またはNAA 0.2 mg/lとBA 0.2 mg/l添加した寒天培地に置床し、25℃, 3,000 lx, 16時間照明下で培養した。次ぎに再生植物の根組織切片を、MS培地(3%シヨ糖)に2,4-D 0.05～1.0 mg/lとBA 0～0.1 mg/lを添加した寒天培地に置床して、25℃, 暗黒条件下で培養すると、カルスが形成した。形成したカルスをフリー培地に移植するとECが誘導され、その後不定胚が形成した。不定胚は、フリー培地で継代培養すれば幼根および幼芽は発育し、完全な再生植物体となった。

根組織切片から得た再生植物の葉柄および根組織切片を外植体に用い、再度同様の条件下で培養を繰り返せば、外植体から効率的に再生植物が得られた。この方法は、従来の株分け繁殖に比べ、非常に効率的な増殖法である。

4. サクラソウの根組織培養による種苗生産技術の確立

サクラソウの組織培養による種苗増殖技術を確立するため、葉および根組織切片からの植物体再生による*in vitro*繁殖について検討した。

- 1) 園芸品種の葉切片を、 $4.44 \times 10^{-6} \text{M}$ BA と $5.3 \times 10^{-7} \text{M}$ NAA を添加した 1/2 MS 培地に置床して培養すると再生植物が得られたが再生率の品種間差が大きかった。
- 2) 葉切片から得た *in vitro* 再生植物の根組織切片を外植体とし、 10^{-6}M BA を添加した MS 培地に置床して培養すると高率にカルスが得られた。
- 3) 形成した不定芽は、植物生長調節物質を添加しない培地に移植して継代培養すると 5～6 本のシュートの伸長とともに発根が認められ再生植物となった。
- 4) 培養条件は、20～25℃が適温で、暗黒下より照明下の方がカルスから形成した不定芽の伸長が良かった。
- 5) 培養苗は、バーミキュライトを詰めた育苗器内に仮植した後、培養土を用いてポット植えすることにより効率良く順化できた。

謝 辞

本研究のとりまとめにあたっては、島根大学生物資源学部教授・細木高志博士にご指導，ご助言を賜った。ここに謹んで深甚なる感謝の意を表します。また，島根大学名誉教授・安達一明博士および元島根大学生物資源学部教授・今木 正博士には，鳥取大学大学院連合農学研究科での本研究のとりまとめを進めて頂くと共に暖かい激励を賜った。さらに，本論文の作成にご配慮と激励を賜った元広島県立農業技術センター所長・前重道雅博士にここに心から厚く御礼を申し上げる。

本研究は，広島県立農業技術センターにおいて2000～2003年の間に行い，鳥取大学大学院連合農学研究科においてとりまとめを行ったものである。研究遂行にあたっては，広島県立農業技術センター生物工学研究部の池田好伸主任研究員および金好純子副主任研究員にはご協力をいただいた。また，培養作業ならびに調査には福永やす子専任技術員および舩永昌子技術員のご援助をいただいた。さらに，とりまとめにあたっては，生物工学研究部の職員各位，並びに妻恵子にはご理解とご協力を頂いた。

ここに，記して関係各位に深く感謝いたします。

引用文献

- 阿部 清・大木 淳・川村啓造. 1999. タラノキの品種特性. 東北農業研究. 52 : 225-226.
- 雨宮圭一・藤木俊也・日向 進. 1992. タラノキの組織培養による大量増殖. 山梨総農試研報. 5 : 11-22.
- 雨宮圭一・阿部 健・中村あや子. 1996. ナス台木における組織培養苗の成苗化条件. 山梨総農試研報. 7 : 25-33.
- Amamiya K. and T. Mochizuki. 2002. Somatic Embryo Formation and Plant Regeneration in Zaoh line No. 2 of Japanese Angelica Tree (*Aralia elata* seem.). Plant Biotechnology. 19 : 383-387.
- Ammirato, P. V., 1982. Handbook of plant cell culture, vol. 1, (Evans, D. A.ら). 82-113. Macmillan Publishing Company, New York.
- Andrew, R. V. and E. F. Smith. 1990. The preparation in vitro of chrysanthemum for transplantation to soil. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 21 : 129-132.
- 浅見逸夫・伊藤(小川)理恵・犬塚 満・朱宮昭男. 1999. フキ無菌植物の葉柄切片からの不定芽誘導. 愛知農総試研報. 31 : 65-70.
- 浅見逸夫・伊藤(小川)理恵・犬塚 満・朱宮昭男. 2000. フキの葉柄切片から誘導した不定芽のセル成形トレイを用いた発根培養方法. 愛知農総試研報. 32 : 53-60.
- Caplin S. M. and F. C. Steward. 1948. Effect of coconut milk on the growth of explants from carrot root. Science. 108 : 655-657.
- 近重克幸・名古洋治. 1999. 山野植物イワギリソウの組織培養による大量増殖. 近畿中国農研. 98 : 38-40.
- Coumans, M., M. F. Coumans-Giles, J. Delhez and T. Gaspar. 1979. Mass propagation of *Primula obconica*. Acta Horticulturae 91 : 287-293.
- 遠藤柳子・亀谷寿昭・庄子孝一. 1987. セリのカルスからの不定胚形成. 第10回植物組織培養シンポジウム講演要旨集 : 162.
- 遠藤柳子・庄子孝一. 1994. セリ, セルリー及びアシタバの体細胞不定胚形成. 宮城農セ報. 60 : 65-75.
- Finer, J. J.. 1987. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of hybrid sunflower (*Helianthus annuus* L.) on a high sucrose-containing medium. Plant Cell Rep. 6 : 372-374.
- Freyssient. M. and G. Freyssient. 1988. Fertile plant regeneration from sunflower (*Helianthus annuus* L.) immature embryos. Plant Sci. 56 : 177-181.
- 藤木俊也・雨宮圭一・関 宏夫. 1994. 組織培養によるカタクリの増殖. 山梨総農試研報. 6 : 49-57.
- 藤嶋 勇. 1988. 農業技術体系野菜編. 野菜園芸大百科14. p.217-228. 農文協. 東京.
- 藤嶋 勇. 1997. 特産シリーズ タラノメふかし栽培と調整・販売の実際. p.44-53. 農文協. 東京.
- 藤野守弘. 1990. 花きの組織培養における変異の発生. バイオホルティ 4. 農耕と園芸編集部編 : p.15-18. 誠文堂新光社. 東京.

- Fukai, S., M. Goi, M. Tanaka and H. Furukawa. 1991. Multiple shoot regeneration from root cultures of prairie gentian (*Eustoma grandiflorum*). Tech. Bull. Fac. Agr. Kagawa Univ. 43(1) : 31-34.
- 古川 一・松原千尋・重松典宏. 1989. 植物生長調節物質を用いないニンジンの不定胚形成. 植物組織培養. 6 : 92-94.
- Furukawa, H., C. Matsubara and N. Shigematsu. 1989. Somatic embryogenesis in carrot without plant growth regulators. Plant Tissue Culture Letters. 6(2) : 92-94.
- Furukawa, H., C. Matsubara and N. Shigematsu. 1990. Shoot regeneration from the roots of prairie gentian (*Eustoma grandiflorum* (Griseb.) Schinners). Plant Tissue Culture Letters. 7 : 11-13.
- 古川 一・重松典宏. 1991. 植物生長調節物質を含まない培地におけるニンジン分果からの不定胚形成能の品種間差異. 植物組織培養. 8 : 94-97.
- 古谷 博. 1992. マーガレットの蕾・花梗培養. 図解花のバイオ技術. p.58-59. 新美芳二編著. 誠文堂新光社. 東京.
- 古谷 博・池田好伸. 1993. 組織培養によるエヒメアヤメの大量増殖. 近畿中国農研. 86 : 49-53.
- 古谷 博. 1995. 組織培養によるカタクリの増殖について. 園学中四国支部要旨. 34 : 49.
- 古谷 博. 1997. リクニス属 (*Lychnis* L.) の組織培養による増殖. 近畿中国農研. 94 : 34-39.
- 古谷 博. 2001. 茎頂培養による秋ギク '秀芳の力' 優良母株の急速増殖技術 第2報 多芽体増殖苗の養成と切り花栽培における生育開花. 広島農技セ研報. 9 : 55-62.
- 古谷 博・細木高志. 2003. セリ茎頂培養再生植物の不定根切片からの不定胚誘導および植物体再生. 園学雑. 72(別2) : 552.
- 古谷 博・表崎崇樹. 2003. 組織培養によるサクラソウ園芸品種の種苗生産について. 園学中四国支部要旨. 42 : 43.
- Gamborg, O. L., R. A. Miller and K. Ojima. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell. Res. 50 : 151-158.
- Gautheret, R. J. 1939. Sur la possibilite de realiser la culture indefinite des tissue de tubercules de carotte. C. r. Acad. Sci. Paris. 208 : 118-120.
- 浜田守彦・細木高志・草開康弘. 1990. 節培養によるヤーコンの大量増殖. 植物組織培養. 7 : 35-37.
- 春木和久・山田員人・松本敏一. 1988. 組織培養によるワサビの不定胚形成と植物体再生. 近畿中国農研. 75 : 66-70.
- Haberlandt, G. 1902. Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. S. B. Akad. Wiss. Wien. 111 : 69-92.
- Hasegawa, P. M., T. Murashige and F. H. Takatori. 1973. Propagation of asparagus through shoot apex culture. II. Light and temperature requirements, transplantability of plants, and cytological characteristics. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 98 : 143-148.
- 橋本聖一・田中考幸・松村 正. 1989. ゼンマイの試験管内増殖に関する研究. 園学雑. 58(別1) : 214-215.
- 原田 宏・駒嶺 穆. 1989. 植物細胞組織培養. p.36-38. 理工学社. 東京.
- 原田牧人・野澤典子・庄子孝一・遊佐吉雄. 1993. 組織培養によるゼンマイ (*Osmunda japonica*) の大量増殖. 宮城農セ報. 59 : 12-19.

- Hatanaka T., O. Arakawa, T. Yasuda, N. Uchida and T. Yamaguchi. 1993. Effect of plant growth regulators on somatic embryogenesis in leaf culture of *Coffea canephora*. *Plant Cell Rep.* 10 : 179-182.
- 平井 剛・笠井 登・原田 隆. 1995. ハマボウフウの組織培養におけるカルス誘導および不定胚形成. *園学雑.* 64(別2) : 278-279.
- 平佐聡尚・山田員人. 1994. ハマボウフウの不定芽形成によるクローン増殖. *園学中四国支部要旨.* 33 : 60.
- 樋浦 巖・山崎英優・鈴木 洋・今西 茂. 1993. イワタバコ (*Conandron ramondioides*) の葉片培養. *山形大学紀要(農学).* 4 : 717-725.
- 本間勝夫. 1998. オオミスミソウ大群落の危機と園芸品種化への試み. *園学平成10年秋季大会シンポジウム講演要旨.* 8-9.
- 星 洋介・近藤正剛・宮沢寛和・池田真紀子・橋本憲明・小林 仁. 2000. タラノキ優良個体からの組織培養による母株の育成および RAPD 分析による従来系統との比較. *新潟農総研報.* 2 : 67-68.
- 細木高志・角田和美・浜田守彦・瀬尾光広. 1986. ワサビの組織培養による増殖. *農及園.* 61 : 995-996.
- Hosoki, T. and M. Mochida, T. Sakamoto and K. Ohta. 1995. In vitro propagation of white stokesia (*Stokesia laevis* Greene var. *alba hort.*) by leaf and root culture. *J. Japan. Hort. Sci.* 64 : 375-380.
- Hosoki, T. and M. Mochida. 1995. Mass propagation of balloon flower (*Platycodon grandiflorum* A. DC.) by repeated shoot-sectioning and separation of axillary shoot. *Environ. Control in Biol.* 33 : 213-216.
- Hosoki, T. and T. Sakamoto. 1995. Mass propagation of patrinia (*Patrinia scabiosaefolia* Fisch. ex Link.) by repeated shoot-sectioning and division of axillary shoots. *Environ. Control in Biol.* 33 : 299-303.
- Hosoki, T. and S. Nishimoto. 1997. In vitro propagation of toad lily (*Tricyrtis hirta* Hook.) by repeated shoot-sectioning and division of axillary shoots. *Environ. Control in Biol.* 35 : 77-81.
- 細木高志. 1997. マイクロプロパゲーション 4. 1 歴史・施設・器材・準備. p.82-91. 今西英雄・矢澤 進・榊田正治・長村智司・弦間 洋・林 孝洋・小田雅行・大久保 敬・細木高志・梁川 正・田中道男・三位正洋・大石 惇・大井美知男・雨木若慶. *園芸種苗生産学.* 朝倉書店. 東京.
- 井田昭典. 1989. ウド—栽培の基礎—. p.367-385. *野菜園芸大百科* 11. 農文協. 東京.
- Iguchi, M., N. Kikutani, K. Monma, T. Kasahara, T. Tomomatsu, Y. Murakami and M. Urano. 1992. Tocopherol, carotene and water-soluble vitamin contents and seasonal differences in the different parts of asitaba (*Angelica keiskei*). *Annual Report of the Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health.* 43 : 166-170.
- 池田 洋・中里 博・小泉丈晴・田中伸子・山田文典・栗原則雄. 1991. 不定胚から得られたウドの特性. *園学雑.* 60(別2) : 240-241.
- 今西英雄. 1997. 園芸種苗生産の方法. p.3-4. 今西英雄・矢澤 進・榊田正治・長村智司・弦間 洋・林 孝洋・小田雅行・大久保 敬・細木高志・梁川 正・田中道男・三位正洋・大石 惇・大井美知男・雨木若慶. *園芸種苗生産学.* 朝倉書店. 東京.

- 稲葉幸司・吉川正巳. 1993. タラノキの大量増殖. p.9-12. 中国農業試験場作物開発部育種工学研究室編. 組織培養による種苗の大量増殖マニュアル. 近畿中国農業試験研究推進会議. 福山.
- 井上 健. 1993. サクラソウ. p.15. 日本植物分類学会編著. レッド・データブック 日本の絶滅危惧植物. 農村文化社. 東京.
- 石井克明・佐々木 仁・上野晴子. 2003. シラネアオイの未熟種子からの不定胚誘導による増殖と細胞遺伝的な安定性. 植物工場学会誌. 15:191-194.
- Ishimaru, K. and K. Shimomura. 1992. Shoot regeneration in root and callus cultures of *Hypericum perforatum*. Plant Tissue Cult. Lett. 9:39-42.
- 入谷正樹・原田 隆・八鍬利郎. 1980. 園芸作物の栄養繁殖に関する基礎研究. 第3報. ニンジンの組織培養におけるカルスならびに器官形成. 北大農邦文紀要. 12:281-291.
- 井内美砂・後藤昭文・川村泰史. 1999. クサソテツの組織培養による増殖(第2報)多芽球体の誘導および植物体再生. 徳島農試研報. 35:14-19.
- 城守 寛・高原直人・佐藤孝太郎・石原愛也. 1989. モミジガサの葉片カルスからの植物体再生. 園学雑. 58(別1):210-211.
- 貝守 昇. 1986. バイオテクノロジー利用による「タラノキ」の大量増殖. 農及園. 61:433-435.
- 加古舜治. 1985. 組織培養とその園芸への応用. 加古舜治編著. 園芸植物の器官と組織の培養. p.2-5. 誠文堂新光社. 東京.
- 鎌田 博・原田 宏. 1989. 細胞, 組織, 器官培養. 原田 宏・駒嶺 穆編集. 植物細胞組織培養. p.65-104. 理工学社. 東京.
- Kamada H., K. Ishikawa, H. Saga and H. Harada. 1993. Induction of somatic embryogenesis in carrot by osmotic stress. Plant Tissue Cult. Lett. 10:38-44.
- Kamada H., Y. Tachikawa, T. Saitou and H. Harada. 1994. Heat stress induction of carrot somatic embryogenesis. Plant Tissue Cult. Lett. 11:229-232.
- 神田美知枝・古川正樹. 1987. プリムラ・オブコニカ変異株の組織培養による増殖. 園学要旨. 昭62春:424-425.
- 霞 正一・高津康正・友常秀彦・佐久間文雄. 1997. キキョウ葉片からの不定芽形成と植物体再生. 園学雑. 66別2:616-617.
- Kato M. 1986. Micropropagation through cotyledon culture in *Camellia japonica* L. and *C. sinensis* L. Japan J. Breed. 36:31-38.
- 加藤辰己. 1998. 蝕まれる日本の植物相—園芸ブームの光と影—. 園学平成10年秋季大会シンポジウム講演要旨. 2-3.
- 川村泰史・黒田 秧. 1990. シオデの組織培養による大量増殖(第1報)組織培養による冬芽からの不定芽形成. 徳島農試報. 27:39-43.
- 川村泰史. 1992. モミジガサの葉切片からの植物体再生. 園学雑. 61(別1):224-225.
- 川村泰史・久島 繁. 1995. 組織培養の地域農業振興への適用—シオデ多芽体の誘導及び増殖と不定根形成における培養条件の検討—. 筑波大農林研報. 8:33-43.
- 川村泰史・久島 繁. 1996. 植物組織培養の生産コストシミュレーションによる技術改良の方向付け. 筑波大農林研報. 9:47-62.

- 川村泰史・吉村健二. 2002. ノカンゾウの組織培養による大量増殖. 園学中四国支部要旨. 41:58.
- Kim, H. S and B. Y. Lee. 1995. In vitro production system of Somatic embryos in *Oenanthe stolonifera* DC. J. Korean Soc. Hort. Sci. 36:38-45.
- 貴志文昭・鏡 勇吉・小山征男. 1994a. 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, 茎切片と葉柄からのカルス形成条件および茎切片由来カルスからの植物体再生. 植物組織培養. 11:96-102.
- 貴志文昭・鏡 勇吉・小山征男. 1994b. 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. 植物組織培養. 11:103-111.
- Kiyosue, T., H. Kamata and H. Harada. 1989. Induction of somatic embryogenesis by salt stress in carrot. Plant Tissue Cult. Lett. 6:162-164.
- 小寺孝治. 1991. アシタバの種子発芽に関する研究. 東京農試研報. 23:9-20.
- 甲村浩之・井本征史. 1994. アスパラガスの不定胚形成による簡易で効率的な苗生産法. 広島農技セ研報. 60:55-63.
- Kohmura, H., T. Ito, N. Shigemoto, M. Imoto and H. Yoshikawa. 1996. Comparison of growth, yield, and flowering characteristics between micropropagated asparagus clones derived by somatic embryogenesis and seed-propagated progenies. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 65(2):311-319.
- Komai, F., I. Okuse and T. Harada. 1996. Effective Combinations of plant growth regulators for somatic embryogenesis from spinach root segments. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 65:559-564.
- 近藤正剛・小林 仁. 2000. シラネアオイの葉片培養によるカルス誘導とカルスからの不定胚形成. 園学雑. 69(別2):436.
- 河野 信. 2002. 東京都. アシタバ. p.87-88. 芦澤正和監修. 都道府県別地方野菜大全. 農文協. 東京.
- 古在豊樹. 1987. 培養植物の生長促進と順化. 細胞. 19:263-268.
- Kozai, T., C. Kubota and I. Watanabe. 1988. Effects of basal medium composition of the growth of carnation plantlets in auto- and mixo-trophic tissue culture. Acta Hort. 230:121-127.
- Kozai, T. and I. Iwanami. 1988. Effects of CO₂ enrichment and sucrose concentration under high photon fluxes on plantlet growth of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) in tissue culture during the preparation stage. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 57:279-288.
- 古在豊樹・久保田智恵利・渡部一郎. 1990. 異なる培地基礎成分を用いて光独立栄養培養および混合栄養培養したカーネーション小植物体の生長. 生物環境調節. 28:21-27.
- 古在豊樹. 1993. 植物組織培養における環境調節. p.103, 125-133. 橋本 康・高辻正基・野並浩・高山眞策・古在豊樹・北宅善昭・星 岳彦著. 植物種苗工場. 川島書店. 東京.
- 古在豊樹. 1998. 植物組織培養の新段階. p.10-32, 64-79. 農文協. 東京.
- 古在豊樹. 2002. 優良樹木の大量生産. p.223-240. 駒嶺 穆編. 植物が未来を拓く. 共立出版. 東京.
- 古在豊樹. 2003. 閉鎖型植物種苗工場の実用化に関する課題と展望. 平成14年度最先端施設園芸技術実証推進指導事業報告書. p.86-94. 日本施設園芸協会.

- 黒田 秧・川村泰史. 1994. 連続多芽体培養によるシオデの大量増殖. 四国農試報. 58 : 69-83.
- Lazzeri, P. A. and J. M. Dunwell. 1984. *In vitro* shoot regeneration from seeding root segments of *Brassica napus* cultivars. Ann. Bot. 54 : 341-350.
- Lee, J. W. and B. Y. Lee. 1993. Development of mass production systems by somatic embryogenesis in *Oenanthe stolonifera* DC. I. The induction and morphological characteristics of somatic embryogenesis. J. Korean Soc. Hort. Sci. 34 : 108-114.
- Lee, K. S., J. C. Lee and W. Y. Soh. 2002. High frequency plant regeneration *Aralia cordata* somatic embryos. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 68 : 241-246.
- Linsmaier, E. M. and F. Skoog. 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 18 : 100-127.
- Lloyd, G. and McCown, B. 1981. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel *Kalmia latifolia* by use of shoot tip culture. Com. Proc. Intl. Plant. Soc. 30 : 421-427.
- Loo, S. W.. 1945. Cultivation of excised stem tips of asparagus *in vitro*. Aner. J. Bot. 32 : 13-17.
- 劉 永立・笠井 登・原田 隆. 1995. サルナシ (*Actinidia arguta* Planch.) 組織の *in vitro* 培養における器官形成および個体再生. 園学雑. 64 : 261-265.
- 劉 永立・増田 清・原田 隆. 1998. ミヤママタタビ (*Actinidia kolomikta*) 培養体由来根組織からの器官形成, 不定胚誘導ならびに植物体再生. 園学雑. 67 : 734-738.
- 劉 永立・原田 隆・鈴木 卓・増田 清・大澤勝次. 2000. 可食性山野草ユキザサ茎組織の *in vitro* 培養における器官形成および植物体再生. 園学雑. 69(別2) : 339.
- 牧野富太郎. 1969. 牧野新日本植物図鑑. p.444. 北隆館. 東京.
- 松本達夫・強瀬道男・伊丹 清. 1986. サクラソウの大量増殖(第1報)葉及び花蕾からのシュートの分化と増殖. 園学要旨. 昭61春 : 410-411.
- 宮本芳城・藤田政良・藤岡唯志. 1991. スターチスの通気性フィルター利用による培養器内発根同時順化法. 園学雑. 60(別1) : 434-435.
- 宮本芳城. 1998. ササユリ利用の現状と今後の展開方向. p.43-57. 平成10年度農林水産業近畿中国地域研究成果発表会発表要旨. 中国農業試験場.
- Morel, G. and C. Martin. 1952. Guerison de dahlias atteints d'une maladie a virus. Compt. Rend. 235 : 1324-1325.
- Morel, G.. 1960. Producing virus-free cymbidiums. Amer. Orchid. Soc. Bull. 29 : 495-497.
- 森下正博・嘉儀 隆・山田貴義. 1980. フキの花茎および葉柄組織からのウイルスフリー株大量増殖. 大阪農技セ研報. 17 : 1-6.
- 元岡茂治・小西 耕・小西昌子・澤 慶子・佐竹美保・小西国義. 1992. 固体支持体を充填したセル成型トレー培地によるミヤコワスレの組織培養. 園学雑. 60 : 971-979.
- Muir, W. H., A. C. Hilderbrandt and A. J. Riker. 1954. Plant tissue cultures produced from single isolated cells. Science. 119 : 877-878.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15 : 473-497.
- 村山 齊・三位正洋. 1981. オオミスミソウの組織培養による栄養繁殖. 園学要旨. 昭56春 : 320-321.

- 村山 徹・井澤弘一. 1988. シオデ大量増殖のための組織培養技術の確立—好適培養部位及び NAA,BA 濃度—. 東北農業研究. 41:305-306.
- 中原隆夫・能塚一徳・野田政春. 1991a. アシタバ及びミシマサイコの体細胞胚の形成. 九州農研. 53:23.
- 中原隆夫・能塚一徳・野田政春. 1991b. 薬用植物アシタバの大量増殖のための体細胞胚形成法. 福岡農総試研報. A-11:55-58.
- 中西建夫・土井芳憲. 1997. 地域特産作物の栽培状況と用途開発—四国地域—. 農業技術. 52:438-442.
- 中山茂則. 1980. 有利な野菜タラノメの栽培法. 農及園. 55:1509-1515.
- 西平隆彦・林 義明・松本恭子. 1998. ウドの葉片および未成熟種子からの不定胚形成. 園学雑. 67:81-86.
- 西村繁夫・斉藤猛雄・山口真美子. 1990. 不定胚形成の現状と誘導技術. p.9-15. 農耕と園芸編集部編. バイオホルテイ 5 不定胚誘導と大量増殖. 誠文堂新光社. 東京.
- 野口 貴. 1997. ウド(*Aralia cordata* Thumb.)の効率的な不定胚形成. 東京農試研報. 27. 1-8.
- Nomizu, T. Y. Nimi, and S. Kasahara. 2003. In vitro micropropagation of 'Yukiwariso' (*Hepatica nobilis* Schreber var. *japonica* f. *magna*) by leaf segment culture. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 72:205-211.
- 奥野耕太郎・久島 繁・石塚皓造. 1994a. 地域農業振興への組織培養の利用について. 1. ハカラシナの実験室的手法による試験管内大量迅速育苗について. 筑波大農林研報. 7:7-21.
- 奥野耕太郎・久島 繁・石塚皓造. 1994b. 地域農業振興への組織培養の利用について. 2. ハカラシナの試験管内大量迅速育苗系の簡易化について. 筑波大農林研報. 7:23-36.
- 奥野耕太郎・久島 繁・石塚皓造. 1994c. 地域農業振興への組織培養の利用について. 3. 生産費コスト解析の例. 筑波大農林研報. 7:37-56.
- 大賀康之・小野正則・古野久美. 1989. 組織培養による薬用植物の増殖について—体細胞胚形成と植物体再分化—. 福岡農総試研報. A-9:75-78.
- 大垣晃一. 1979. グリーンブックス48. サクラソウ. p.54-89. ニュー・サイエンス社. 東京.
- 大川勝徳. 2002. ササユリの子球発育に及ぼす配合土の影響. 生物環境調節. 40:223-227.
- 大澤勝次・栗山尚志・菅原祐幸. 1981. 組織培養による栄養繁殖性野菜の大量増殖と利用に関する研究 I 植物体の大量誘導に及ぼす培養部位及び培地組成の影響. 野菜試験場報告. A9:1-46.
- 大澤勝次. 1994. 植物バイテクの基礎知識. p.31-61. 農文協. 東京.
- 太田和子・野呂朱美・山田真紀子・香川 彰. 1993. 組織培養によるカンアオイの増殖. 園学雑. 62(別1):428-429.
- 小野 一:1979. 染色体の変異. 新植物組織培養. 竹内正幸・中島哲夫・古谷 力編. p.84-88. 朝倉書店. 東京.
- 小沢 貢・森田伸子・馬場きみ江・秦 清之. 1978. アシタバ根の成分. 第2報. カルコン誘導体の構造について. 薬学雑誌. 98:210-214.
- Plata E. and A.Vieitez. 1990. In vitro regeneration of *Camellia reticulata* by somatic embryogenesis. J. Horti. Sci. 65(6):707-714.

- Prathanturarug S., N. Soonthornchareonnon, W. Chuakul, Y. Phaidee and P. Saralamp. 2003. High-frequency shoot multiplication in *Curcuma longa* L. using thidiazuron. *Plant Cell Repot.* 21 : 1054-1059.
- Reinert, J.. 1958. Untersuchungen uber die morphogenesis an gewebekulturen. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 71 : 15.
- Rybczynski, J. J. and T. Badzian. 1987. High regeneration potential of root segments of *Lotus corniculatus* L. seedling on hormone-free medium. *Plant Sci.* 51 : 239-244.
- 坂本 浩・永井輝行. 1994. シンテッポウユリ組織培養球の栽培. *福井園試報.* 8 : 1-14.
- 斉藤猛雄・西村繁夫・西沢秀次. 1988. 通気性膜の使用による非密閉培養がアスパラガスの体細胞胚の発達に及ぼす効果. *育雑.* 38(別2) : 26-27.
- 斉藤猛雄. 1990. 茎頂培養法. *最新バイオテクノロジー全書2 : 野菜の組織・細胞培養と増殖.* 農業図書. 東京. p.41-48.
- 佐竹義輔(編). 1989. 日本の野生植物木本Ⅱ. p.305. 平凡社. 東京.
- 佐藤光子. 1992. 組織培養によるヒメサユリの子球増殖とその利用技術の確立に関する研究 第2報 培養子球植え付け後の生育と開花特性. *福島農試研報.* 31 : 35-43.
- Sathyanarayana, B. N. and J. Blake. 1994. The effect of nitrogen sources and initial pH of the media with or without buffer on in vitro rooting of jack-Fruit(*Artocarpus heterophyllus* Lam.). p.77-82. P. J. Lumsden, J. R. Nicholas and W. J. Davies eds. *Physiology, Growth and Development of Plants in Culture.* Kluwer Academic Publishers. London.
- 沢池信康. 1989. ウド —軟化栽培の実際— . p.40-50. 農文協. 東京.
- 嶋津光鑑・蔵田憲次. 2002. 不定胚培養による大量苗生産とその環境制御. *生物環境調節.* 40 : 133-146.
- Shimada, T., T. Matsushita and M. Otani. 1997. Plant regeneration from leaf explants of *Primula cuneifolia* var. *hakusanensis*, 'Hakusan-kozakura'. *Plant Biotechnology.* 4 : 47-50.
- 下村講一郎・鎌田 博. 1986. 植物組織培養における培地固型化剤の役割. *植物組織培養.* 3 : 38-41.
- Skoog F. and C. O. Miller. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 11 : 118-130.
- Steward F. C., S. M. Caplin and K. Mears. 1958. Growth and organized development of culture cells. I . Growth and division of freely suspended cells. *Amer. J. Bot.* 45 : 693-703.
- Stolarz, A., J. Macewicz and H. Lorz. 1991. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants of *Nicotiana tabacum* L. *J. Plant Physiol.* 137 : 347-357.
- Sugawara, F., N. Yamamoto and O. Tanaka. 1994. Plant regeneration in *in vitro* culture of leaf, stem and petiole segments of *Actinidia polygama* Miq. *Plant Tissue Cult. Lett.* 11 : 14-18.
- 鈴木 洋・大下聡美・菅井大輔. 1999. シラネアオイの葉片培養. *園学雑.* 69(別1) : 432.
- 鈴木 洋・菅井大輔・工藤幹生・小笠原宣好. 2000. シラネアオイ (*Glaucidium palmatum* Sieb. et Zucc.)の葉片培養. *山形大学紀要(農学).* 13 : 191-198.
- 鈴木正一. 2003. 石川の味を創る. *石川農短大報.* 32 : 13-17.

- 田部井 豊. 1990. 不定胚誘導. p.60-64. 最新バイオテクノロジー全書2：野菜の組織・細胞培養と増殖. 農業図書. 東京.
- 高橋英明・小松知子. 1995. ギボウシの組織培養による増殖. 園学雑. 64(別1)：204-205.
- 高橋英明・今村香織・滑川あずさ. 2000. 数種のユリ科山菜の *in vitro* 増殖(第1報)不定芽誘導によるオオナルコユリの増殖. 園学雑. 69(別2)：338.
- 高柳謙治. 1988. 野菜の組織培養技術の意義. p.1-12. 高柳謙治ほか編. 実用野菜組織培養技術マニュアル. 日本種苗協会. 東京.
- 高澤明子・古在豊樹. 1992. 培養器・支持材の種類がカーネーション培養小植物体の生長に及ぼす影響. 生物環境調節. 30：65-70.
- 竹内正幸. 1972. 脱分化, 分化, 馴化. p.195-225. 竹内正幸・石原愛也・古谷 力編集. 植物組織培養. 朝倉書店. 東京.
- 滝平路明・大谷基泰・島田多喜子. 1998. 中国に自生する *Primula nutans* の葉片からの再分化に及ぼす植物生長調節物質の影響. 園学雑. 68(別1)：387.
- 田中道男. 1997. マイクロプロパゲーション 4. クローン苗生産. p.102-126. 今西英雄・矢澤進・榊田正治・長村智司・弦間 洋・林 孝洋・小田雅行・大久保 敬・細木高志・梁川 正・田中道男・三位正洋・大石 惇・大井美知男・雨木若慶. 園芸種苗生産学. 朝倉書店. 東京.
- 谷本静史. 1986. 高等植物の器官分化. 化学と生物. 24：334-341, 655-657.
- 田沢一二・笹原健夫. 1988. 組織培養によるシオデの繁殖系の確立. 育学雑. 38(別1)：34-35.
- 田沢一二・阿部利徳・笹原健夫. 1990. 山菜「シオデ」の組織培養による増殖. 農及園. 65：423-425.
- 鳥居恒夫. 1980. サクラソウの現状. 新花き. 108：14-19.
- 鶴島久男. 2003. 切り花用栄養繁殖系花き苗の生産・流通・利用の現状と技術課題(6)—組織培養繁殖による花き苗の生産と技術的課題一. 農及園. 78(9)：1037-1044.
- 強瀬道男・松本達夫. 1992. サクラソウの花茎, 葉柄培養. 図解花のバイオ技術. p.86-87. 新美芳二編著. 誠文堂新光社. 東京.
- Tsay H. S. and H. L. Huang. 1998. Somatic embryo formation and germination from immature embryo-der suspension-cultured cells of *Angelica sinensis* (Oliv.)Diels. *Plant Cell Report*. 17：670-674.
- 露木美英・清水慈史・中島哲夫. 1989. ミスミソウの葉片培養による不定胚形成と増殖. 玉川大農学研報. 29：111-123.
- 内田 勉・浅利 覚・赤池良久・宮田善雄. 1984. タラノキの立枯疫病. 日植病報. 50：392-393.
- Vaario L., Y. Otomo, R. Soda and Y. Ide. 1995. Plant Regeneration from root tissue and establishment of root culture of japanese white birch (*Betula platyphylla* var. *japonica*). *Plant Tissue Cult. Lett.* 12：251-258.
- Vieitez, A. M., and J. Barciela. 1990. Somatic embryogenesis and plant regeneration from embryonic tissues of *Camellia japonica* L. *Plant Cell Tissue Org. Cult.* 21：267-274.
- 和田 仁・石井初男. 2000. 培地の種類がサガミシヨウロウホトトギスの *in vitro* 培養に及ぼす影響. 園学雑. 69(別1)：336.
- 渡辺 久・松本英紀・今井健三. 1995. 天然記念物「エヒメアヤメ」の大量増殖技術. 愛媛農試研報. 33：62-63.

- 渡部 仁・大越 聡・佐藤光子・武田敏昭. 1990. 組織培養によるシオデ(*Smilax oldhami* Miq.)の幼植物育成. 福島農試研報. 29 : 73-78.
- Wareing P. F. and I. D. J. Phillips. 1985. Growth and differentiation in plants. 古谷雅樹監訳. 植物の生長と分化(上). p.161-170. 学会出版センター. 東京.
- Wetherell, D. F. 1984. Enhanced adventive embryogenesis resulting from plasmolysis of cultured wild carrot cells. *Plant Cell, Tissue Organ Culture*. 3 : 221-227.
- Wernicke W. and R. Brettell. 1980. Somatic embryogenesis from *Sorghum bicolor* leaves. *Nature*. 287 : 138-139.
- White, P. R. 1934. Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in a liquid medium. *Plant Physiol*. 8 : 489.
- White, P. R. 1936. Plant tissue cultures. *Bot. Rev.* 2 : 419.
- White, P. R. 1939. Potentially unlimited growth of excised plant callus in an artificial nutrient. *Amer. J. Bot.* 26 : 59-64.
- Williams, E. G., Maheswaran, G. 1986. Somatic embryogenesis : Factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. *Ann. Bot.* 57 : 443-462.
- 矢部和則・桜井雍三・飯田孝則・鷺田純彦. 1986. 葉身及び葉柄培養によるフキ(*Petasites japonicus* Fr. Schmidt)無病苗の作出. 愛知農総試研報. 18 : 102-109.
- 山本友英. 1995. 組織培養によるシオデの大量増殖に関する研究. 南九州大研報. 25(A) : 11-29.
- 山本友英・青屋孝士郎・深谷裕一・松田 清. 1999. ツワブキの*in vitro*株分け及び葉柄切片培養による増殖. 園学雑. 68(別1) : 284.
- 山本友英・大熊 剛・出崎 誠. 2000. 胚軸および子葉からの不定芽形成によるツワブキの増殖. 園学雑. 69(別1) : 337.
- Yamamoto, T. and H. Oda. 1992. Various methods for seedlings production of *Smilax oldhami* Miq. By tissue culture. *Acta Horticulturae*. 319 : 143-148.
- Yamamoto, T., Y. Magaya and Y. Maruyama. 1999. Mass propagation of *Primula sieboldii* E. Morr. through leaf segment culture. *Bull. Minami-Kyushu Univ.* 29(A) : 9-14.
- 山元義久. 1997. ウドの組織培養による大量増殖. 兵庫農技研報(農業). 45 : 1-4.
- Yasugi, S., K. Sakamoto, K. Onodera and M. Tamashiro. 1994. Plantlet regeneration in root segment culture of cymbidium Kenny Wine Color. *Plant Tissue Cult. Lett.* 11 : 150-152.
- Yong, N. G., Lee, B. Y. 2000. In vitro mass production of somatic embryos and anatomical study in *Oenathe stolonifera* DC. *J. Korean Soc. Hort. Sci.* 41 : 569-575.
- 吉野圭寿・中條博也・山本友英. 1991. 組織培養によるシオデの苗の大量増殖に関する研究. 第4報. 根切片培養による個体再生. 日作紀. 60(別1) : 282-283.
- Yoshizawa N., H. Shimizu, Y. Wakita, S. Yokota and T. Idei. 1994. Formation of adventitious roots from callus cultures of taranoki(*Aralia elata* Seem.). *Bull. Utsunomiya Univ. For.* 30 : 19-26.

Summary

Development of nursery plant production systems by tissue culture on wild edible plants and a wild ornamental plant, Japanese angelica tree (*Aralia elata*), ashitaba (*Angelica keiskei*), seri (*Oenanthe javanica*) and primrose (*Primula sieboldii*) were established.

1. Japanese angelica tree (*Aralia elata* Seemann)

1 – 1. Adventitious shoot formation, somatic embryogenesis and plantlet regeneration from *in vitro*-cultured root tissue

Root segments of plantlets grown by *in vitro* culture, were used as explants and cultured in the dark at 25°C on MS medium supplemented with growth regulators. About 80-100% of root segments formed calli on MS medium supplemented with 0.05-4.0mg/l 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). After 30 days of culture, calli formed on MS medium containing 0.05mg/l 2,4-D, were transferred on hormone-free MS medium and cultured at 25°C in 16hr light (3,000lx). Somatic embryogenesis was also observed from the calli formed on medium supplemented with more than 0.5mg/l 2,4-D. Many somatic embryos and adventitious buds were induced from the calli and developed into small plantlets by subcultures of 20-30 day intervals. After acclimatization on vermiculite, regenerated plantlets were transplanted to a mixture of sandy masa soil / bark compost (3 : 1, v/v). Nearly all plants were established and grew into nursery stocks after 45 days.

1 – 2. *In vitro* propagation and plantlet regeneration of *in vitro* culture of root segments

To establish a plant-regeneration system through *in vitro*-cultured plantlets from root section of *Aralia elata*. The results were as follows :

1. *In vitro*-cultured plantlets induced the calli and secondary somatic embryo. These small plantlets were multiplied several times, every 30 day subculture.
2. Subculture medium consisted of growth regulator-free MS medium supplemented with 3 % sucrose and 0.2% Gelan gum.
3. Best results for inducing culture plantlets were obtained using MS medium under 25°C in 16hr light (3,000lx).
4. After 9 months in the culture, forty thousand young plantlets were obtained from one explant.
5. The young plantlets developed into mature shoots which originated from vigorous plants at the last-stage in the flask or polycarbonate-box.
6. When the matured young plantlets were transferred to the MS medium containing 5 mg/l GA.

1 – 3. Effect of types of solid supporting materials and culture media on the growth and acclimatization of plantlets from *in vitro* culture

Experiments were conducted to determine the effect of solid supporting materials and culture media on the growth of regenerated plantlets from root segments of *Aralia elata* in *in vitro* culture. The

plantlets, subcultured on MS medium, were taken from a culture tube and transplanted aseptically into four kinds of solid supporting materials. They were cultured on these materials for 2 months at 25°C in a 16 hr light (3,000 lx) condition. A mixture of equivalent volumes of vermiculite and perlite or sphagnum was the most effective material for raising high-quality plants, among four kinds of solid supporting materials.

Hydroponics with 3 % sucrose supported better growth of the plantlets than MS liquid medium with 3 % sucrose. The plantlets directly transplanted to vermiculite in a planting cell tray also easily grew into young plants after 2 months in a closed culture container. These results indicate that the use of solid supporting materials and culture media are effective for promoting the growth of plantlets from *in vitro* culture.

1 – 4. **Cultivar difference in the plantlet regeneration and practicability of micropropagated plantlets through adventitious embryogenesis from *in vitro*-cultured root tissue**

Root segment cultures in three cultivars of *Aralia elata* were established *in vitro*. These plants were successful cultivated in the field. The results were as follows :

- 1 . Segments of *in vitro*-cultured roots were cultured in the MS medium supplemented with 1 mg/l 2,4-D.
- 2 . Somatic embryos and plant regeneration were accomplished on the plant growth regulator-free MS medium.
- 3 . Cultural condition for growing regenerated-plantlets was in an aerated culture vessel with membrane filter.
- 4 . Regenerated plantlets were the same as field-grown root cutting young plants for growth characteristics.
- 5 . *In vitro* propagation with root section is more efficient than the conventional root-cutting.

1 – 5. **Cost analysis of nursery plant production systems by tissue culture**

Cost analysis of nursery plant production of *Aralia elata* was carried out by root tissue culture. The costs at 10,000 plantlets necessary for laboratory culture room and culture equipment were ¥32. The production cost by root tissue culture, the ratio of labor to the total cost theoretically were 62.5% of the production of ¥348,000. Thus, mass propagation and seedling production by root tissue culture was simple and low cost procedure methods.

2. **Asitaba (*Angerica keiskei* (Miq.) Koidz)**

Adventitious shoot formation, somatic embryogenesis and plantlet regeneration from *in vitro*-cultured root tissue

An efficient mass propagation system using the petiole and root culture were established in *Angerica keiskei*. In petiole culture, the basal portion was cultured on MS medium supplemented with 1-2mg/l 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 0 , 0.01 and 0.1mg/l 6 -benzyladenine (BA) at 25°C in

the light. Callus formation was observed on all media tested and these calli were transferred on MS hormone-free medium. Adventitious buds were induced and developed into normal plantlets. In petiole culture, the number of regenerated plants per petiole section ranged from four to ten. In root culture, root sections from aseptically generated plants, were used as explants and cultured on MS medium supplemented with 0, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 and 2.0mg/l 2,4-D at 25°C in the dark. Embryogenic calli were induced on medium supplemented with more than 0.05mg/l 2,4-D. Furthermore, many embryos were observed on the calli which were formed on medium supplemented with more than 0.5mg/l 2,4-D, irrespective of BA addition. These embryogenic calli and embryos were transferred onto MS hormone-free medium at 25°C in 16hr light. Many embryos and adventitious shoots formed vigorously, then developed into normal plants by subculture on the same medium. After acclimatization, regenerated plants were transplanted to soil and nearly all plants rooted and developed to young plants 45 days later.

3. Seri (*Oenanthe javanica* DC.)

Micropropagation of *Oenanthe javanica* by somatic embryogenesis from root segments of *in vitro* culture

An efficient micropropagation system using the root culture were established in *Oenanthe javanica*. In the shoot tip culture, the tip portion of terminal bud or lateral bud was excised and cultured on the half strength Murashige and Skoog medium supplemented with 0.1mg/l α -naphthalene acetic acid (NAA) or combination of 0.2mg/l NAA and 0.2mg/l 6-benzyladenine (BA) under continuous light of 3,000 lx at 25°C. In root segment culture, root explants which were excised from whole roots approximately 1.5cm length from aseptically generated plantlets were used and cultured on MS medium supplemented with 0.05, 0.1 or 1 mg/l 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) and 0, 0.01 or 0.1mg/l BA at 25°C in the dark. Embryogenic calli were induced on medium supplemented with 0.1mg/l 2,4-D and 0, 0.01 or 0.1mg/l BA. Plant regeneration was successful on the MS hormone-free medium. Many embryos were developed into normal plants by subculture on the same medium. *In vitro* propagation with root and petiole sections of aseptically generated plants *in vitro* culture is more efficient than conventional shoot division *ex vitro*. The results indicate that the micropropagation procedure can be applied to an efficient propagation of *Oenanthe javanica*.

4. Primrose (*Primula sieboldii* E. Morr.)

***In vitro* propagation of *Primula sieboldii* through root segment culture**

The procedures for tissue culture to establish a mass propagation method for *Primula sieboldii*, were examined. Young expanding leaves were taken from potted plants. After sterilization, leaf segments were cultured on 1/2MS medium (Murashige · Skoog, 1962) supplemented with 4.44×10^{-6} M 6-benzyladenine (BA), 5.37×10^{-7} M α -naphthalene acetic acid (NAA), 3 % sucrose and 0.8% agar. There cultivars were different in the high potential of leaf segments to induce calli and adventitious shoots among the tested thirty eight cultivars. To obtain a number of clones, root segments excised from a donor plant *in vitro* were used as explants. Calli from the root segments were easily induced on MS medium

supplemented with BA and NAA. Adventitious shoots were induced easily only on BA supplement medium and then transferred to hormone-free MS medium for 30 days. These adventitious shoots successfully developed into plantlets. The best results for inducing calli in root segment culture were obtained using MS medium with 10^{-6} M BA incubated under 3,000 lx, a 16 hr photoperiod at 20 or 25°C. Thus, plantlets were easily regenerated from calli. The regenerated plantlets were incubated on vermiculite, and growing plants were then transferred to soil and successfully acclimated.

広島県立農業技術センター研究報告 第79号

平成17年11月7日 印刷
平成17年11月7日 発行

編集 広島県立農業技術センター
発行

〒739-0151 広島県東広島市八本松町原
☎ (082) 429-0521

印刷所 (株) 中 本 本 店

〒730-0004 広島市中区東白島町13-15
☎ (082) 221-9181
