

# シオデの組織培養による大量増殖

## (第2報)

### 不定芽および不定根の形成に及ぼすショ糖濃度の影響\*

川村泰史

Mass propagation of *Smilax oldhami* Miq.  
by tissue culture II

Effects of sucrose concentrations on the formation of adventitious shoot and root.  
Hirofumi KAWAMURA

#### 要約

川村泰史(1992):シオデの組織培養による大量増殖(第2報)不定芽および不定根の形成に及ぼすショ糖濃度の影響. 徳島農試研報, (28):30~34.

組織培養によるシオデの大量増殖法を開発するために, 茎頂培養で得た多芽体から芽を取り除き, 40mg程度の重さに切断した組織を用いて, MS培地にNAAとBAを添加した寒天培地にショ糖0, 15, 30, 45, 60, 75, 90g/lを添加した培地でショ糖濃度が不定芽および不定根の形成に及ぼす影響について検討し, 次の結果を得た。

不定芽の形成はショ糖15g/lで促進され, 不定根の形成は60g/lで促進されることが明らかになった。

キーワード: シオデ, 組織培養, ショ糖濃度, 不定芽, 不定根

#### はじめに

筆者ら<sup>8)</sup>はシオデの冬芽の茎頂から多芽体を形成させるとともに, 前報<sup>7)</sup>では冬芽の茎頂以外の組織切片から直接不定芽を形成させることも明らかにした。また, 多芽体からの苗条を用いて不定根の形成条件についても検討し<sup>6)</sup>, 組織培養により植物体を得ることを可能にした。

シオデの組織培養については大量増殖を目的として<sup>3), 10), 13), 16), 17), 18), 19)</sup>, また, 育種を目的としてプロトプラストの単離<sup>14)</sup>, 薬培養<sup>15)</sup>の報告があった。

植物の組織培養では一般に炭素源を供給するため, 糖としてショ糖の濃度を20~30g/lとした培地が使用されている。しかし, カンキツの不定胚分化<sup>4)</sup>, カンキツの胚の生育<sup>12)</sup>, アサガオのカルスの形成や不定芽分化<sup>5)</sup>, チャの不定芽分化と腋芽の生育<sup>11)</sup>に糖の種類と濃度が大きく影響すること, また, 培養する植物組織の違いにより利用できる糖の種類が異なること<sup>1), 2), 5), 20)</sup>等が報告されている。

しかし, シオデの多芽体を継代培養する際の条件, 特に培地に添加するショ糖濃度についての報告はない。

そこで本報告では多芽体から芽を取り除いた組織切片を用いてショ糖濃度が不定芽および不定根の形成に及ぼす影響について検討した。

なお, 本研究を遂行するに当たって御尽力下さった徳島県農業大学校福岡省二助教授に対して深甚なる謝意を表す。

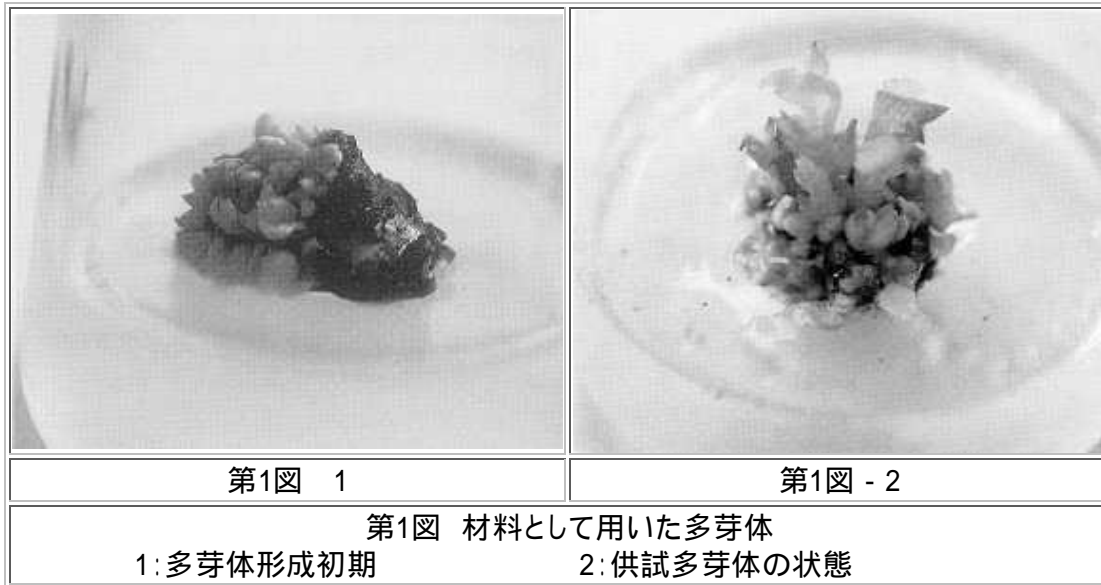
\*本報告の概要は平成2年度園芸学会中四国支部大会において発表した。

#### 材料および方法

##### 1 材料

供試材料は徳島県三好郡東祖谷山村で1986年に採取したシオデを1987年3月に池田分場の圃場に播種して得た苗を用いた。それから長さ約1cmの大きさの冬芽を採取し, 前報<sup>7)</sup>同様に殺菌して, 約0.5mmの茎頂組

織を切り取り、MS培地<sup>9)</sup>にショ糖30g/lと寒天7g/lを加え、さらに植物生長調節物質としてNAA( - naphthalene acetic acid)0.5mg/l, BA(6-benzyl aminopurine)0.5mg/lを加えpH5.8に調整し、高压滅菌(120℃, 15min)した培地に1988年11月11日に置床した。これから得られた多芽体(第1図)をMS培地にNAA0.05mg/l, BA0.5mg/l, ショ糖30g/l, 寒天7g/l加えてpH5.8とした培地で継代培養して維持した。この組織から芽を取り除き、約40mgの重さに切断した組織を材料とした。



第1図 1

第1図 - 2

第1図 材料として用いた多芽体  
1:多芽体形成初期 2:供試多芽体の状態

## 2 培養

試験条件はショ糖濃度を0, 15, 30, 45, 60, 75, 90g/lとし、1区当たり10切片置床し、照度約2,400lx, 日長16時間, 温度25℃で培養した。

基本培地としてはMS培地を用い、寒天7g/lを加えて固体培地とした。培地は全てpH5.8に調整後、湯煎で寒天を溶かして分注してから高压滅菌(120℃, 15min)し、第1表に示す条件で継代培養を行った。

第1表 継代培養期間の条件

培養期間	置床～ 3週間後	3～7 週間後	7～14 週間後	14～21 週間後
NAA(mg/l)	0.05	0.05	0.05	0.05
BA(mg/l)	0.5	0.25	0.25	0.5
1切片当たりの培地量(ml)	10	20	20	20

注) 置床:1989年11月1日

## 3 調査

調査は1区当たり10切片を1989年11月1日(置床時), 12月20日(7週間後)に生体重, 2月7日(14週間後)に生体重, 不定芽の本数と長さ, 不定根の本数と長さ, 3月28日(21週間後)に不定根の本数と長さを測定した。

## 結果および考察

ショ糖濃度を0～90g/lと変えた培地で培養した結果、供試切片の生体重の増加率は第2表に示すように3週間後では15g/l区が最も高く、次いで30g/l区, 45g/l区が高くなり、7週間後では30g/l区が最も高く、次いで15g/l区, 45g/l区が高くなり、14週間後では30g/l区が最も高く、次いで45g/l区, 60g/l区が高くなり、これらの区が他区より生体重が重くなった。

第2表 シオデの置床時に対する生体重の増加

ショ糖	置床時	3週間後	7週間後	14週間後
0	51	72(1.4)	78 (1.5)	86 (1.7)
15	45	167(3.7)	1,024(22.7)	4,150 (92.0)

30	44	153(3.5)	1,090(24.9)	4,930(112.8)
45	37	122(3.3)	675(18.3)	3,573 (97.1)
60	42	111(2.7)	736(17.5)	3,788 (89.0)
75	38	85(2.3)	470(12.5)	2,289 (60.7)
90	39	84(2.2)	259 (6.7)	1,113 (28.9)

注) 単位 ショ糖濃度:g/l, 生体重:mg(倍数)



第2図 不定芽および不定根形成(14週間後)  
左からショ糖90, 75, 60, 45, 30, 15, 0g/l

置床から14週間後の組織切片からの不定芽および不定根の形成に及ぼすショ糖濃度の影響について第3表および第2図に示した。不定芽の総数は30g/l区が10切片当たり174本と最も多く、次いで15g/l区が162本であった。しかし、苗条を切って発根培地に移すのに操作性の良い10mm以上の長い不定芽数については15g/l区が10切片当たり96本と最も多く、次いで30g/l区が47本であった。

第3表 14週間後の不定芽および不定根の形成状況

ショ糖 (g/l)	長さ別不定芽数					長さ別不定根数				発根率 (%)
	~5 mm	5~ 10mm	10~ 20mm	20~ 30mm	計	~5 mm	5~ 10mm	10~ 20mm	計	
0	5	0	0	0	5	0	0	0	0	0
15	50	16	69	27	162	0	0	0	0	0
30	86	41	18	29	174	0	0	0	0	0
45	55	16	5	2	78	1	3	5	9	50
60	76	12	5	0	93	7	4	11	22	70
75	40	3	0	0	43	4	3	1	8	30
90	21	2	0	0	23	0	1	1	2	20

注) 10切片当たり

長さ区分は5~10mm:5mm以上, 10mm未満を示し, 他も同様である。

発根率 = (発根切片数/置床切片数) × 100

不定根の総数は60g/l区が10切片当たり22本と最も多く、次いで45g/l区が9本であった。また、10~20mmの不定根数は60g/l区が11本と最も多く、次いで45g/l区が5本であった。発根率は60g/l区が70%と最も高く、次いで45g/l区が50%であった。



第3図 - 1



第3図 - 2

第3図 不定根形成(21週間後)

1: 左からシヨ糖90, 75, 60, 45g/l

2: シヨ糖60g/l

置床から21週間後の不定根の形成に及ぼすシヨ糖濃度の影響について第4表および第3図に示した。不定根の総数は60g/l区が10切片当たり141本と最も多く、次いで75g/l区が60本であった。また、20～30mmの不定根数は60g/l区が84本と最も多く、次いで75g/l区の16本に比べて著しく多くなった。発根率は60g/l区が100%と最も高く、次いで45g/l区が90%であった。

植物組織培養においてはカルス形成、不定芽分化、不定胚分化に糖の種類と濃度が影響すること等<sup>4), 5), 11)</sup>が報告されている。

チャの茎切片を用いたシヨ糖濃度の影響について不定根分化は30～50g/l添加区が優れ、不定芽分化は濃度の高い150～70g/l添加区が優れていると中村<sup>11)</sup>が報告している。

しかし、深井<sup>2)</sup>はキクの葉切片培養によるカルスの生長と器官形成に及ぼす糖の影響について、シュートの形成はシヨ糖20g/l区、40g/l区でみられるが、シヨ糖濃度が高い80g/l区、160g/l区で根の形成率、数ともに増加したとしている。

本研究で使用したシオデについてはシヨ糖濃度が低濃度(15g/l)で不定芽の形成が促進され、高濃度(60g/l)で不定根の形成が促進され、キクの葉片培養<sup>2)</sup>と同様の傾向がみられた。

第4表 21週間後の不定根の形成状況

シヨ糖 (g/l)	長さ別不定根数					発根率 (%)
	～5 mm	5～10 mm	10～20 mm	20～30 mm	計	
0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0
30	1	3	2	0	6	40
45	0	6	10	13	29	90
60	6	23	28	84	141	100
75	13	19	12	16	60	60
90	4	4	3	4	15	20

注) 第3表と同じである。

以上のようにシオデの多芽体組織切片からの不定芽および不定根形成についてはシヨ糖濃度の影響が明らかになった。シオデを組織培養する際には植物生長調節物質だけでなく、シヨ糖濃度が器官形成に影響を及ぼすことから、今後は他の組織切片を用いた場合においてもシヨ糖濃度を考慮した培養系を確立する必要がある。

## 摘要

組織培養によるシオデの大量増殖を確立するために、茎頂培養で得た多芽体から芽を取り除き、約40mgの重さに切断した組織を材料としてMS培地にNAAとBAを添加した寒天培地でシヨ糖濃度が不定芽および不定根の形成に及ぼす影響を検討した。

- 1 シヨ糖濃度が低濃度(15g/l)で不定芽の形成が促進された。
- 2 シヨ糖濃度が高濃度(60g/l)で不定根の形成が促進された。

## 引用文献

- 1) CHONG, C. and C. D. TAPER(1972): Malus tissue cultures. I. Sorbitol (D - Glucitol) as a carbon source for callus initiation and growth. Can. J. Bot., 50: 1399 ~ 1404.
- 2) 深井誠一(1986): キクの葉切片培養におけるカルスの生長と器官形成に及ぼす糖の影響. 植物組織培養, 3(2): 71 ~ 77.
- 3) 福田陽一・藤田栄紀・山本友英(1990): 組織培養によるシオデの苗の大量増殖に関する研究(第2報) シュートの発根に及ぼす発根促進剤の影響. 日作紀, 59(別1): 116 ~ 117.
- 4) HIDAKA, T. and M. OMURA (1989): Control of embryogenesis in *Citrus* cell culture: Regeneration from protoplasts and attempts to callus bank. Bull. Fruit Tree Res. Stn. B, (16): 1 ~ 17.
- 5) HISAJIMA, S. and T. A. THORPE(1985): Carbohydrate Utilization and Activities of Various Glycosidases in Cultured Japanese Morning -Glory Callus. Plant Tissue Culture Letters, 2(1): 14 ~ 21.
- 6) 川村泰史・黒田秧(1990): シオデ苗条からの不定根形成条件. 育種四国談話会報, (24): 3 ~ 5.
- 7) 菅原健夫 (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. 徳島農試研報, (27): 39 ~ 43.
- 8) 黒田秧・川村泰史(1989): シオデの茎頂培養による大量増殖. 育雑, 39(別2): 62 ~ 63.
- 9) MURASHIGE, T. and F. SKOOG(1962): A revise medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant, 15: 473 ~ 497.
- 10) 村山徹・井沢弘一(1988): シオデの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.
- 11) 中村順行(1990): チャの組織培養における不定芽形成と腋芽の生育に及ぼす糖の影響. 静岡茶試研報, (15): 1 ~ 5.
- 12) 高柳りか・三浦泰昌・北浦健生・日高哲志(1991): 胚培養によるカンキツの新品種育成試験(第1報)培養胚の生育に及ぼす糖類の影響. 神奈川農総研報(133): 75 ~ 81.
- 13) 田沢一二・菅原健夫(1988): 組織培養によるシオデの繁殖系の確立. 育雑, 38(別1): 34 ~ 35.
- 14) 菅原健夫・阿部利徳・菅原健夫(1989): アスパラガスおよびシオデのプロトプラストの単離および培養. 育雑, 39(別2): 26 ~ 27.
- 15) 菅原健夫 (1990): シオデの薬培養における植物体再生. 育雑, 40(別1): 138 ~ 139.
- 16) 菅原健夫 (1990): シオデの液体振盪培養によるPLB増殖と植物体再生. 育雑, 40(別2): 74 ~ 75.
- 17) 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.
- 18) 山本友英・福里和朗(1989): 組織培養によるシオデの苗の大量増殖に関する研究. 日作紀, 58(別1): 236 ~ 237.
- 19) 菅原健夫・坂井孝雄・桜井俊朗(1990): 組織培養によるシオデの大量増殖に関する研究(第3報)葉柄からの個体再生. 日作紀, 59(別1): 118 ~ 119.
- 20) YATAZAWA, M., K. FURUHASHI and M. SHIMIZU(1967): Growth of callus tissue from rice-root in vitro. Plant Cell Physiol., 8: 363 ~ 373.

## Summary

The multiple shoot which had been induced on the shoot apex of *Smilax oldhami* winter bud by the action of 0.5mg/l NAA and 0.5mg/l BA was cultured on MS medium supplemented with 0.05mg/l NAA, 0.5mg/l BA, 30g/l sucrose and 7g/l agar for a year.

For this experiment the multiple shoot was cut into about 40mg segments, and shoots which had grown were removed.

The formation of adventitious shoot and root from these materials was studied in sucrose concentrations (0 ~ 90g/l) in the MS medium supplemented with 0.05mg/l NAA, 0.25 ~ 0.5mg/l BA and 7g/l agar.

The results obtained are as follows;

- 1 The formation of adventitious shoot was observed mainly in the medium containing lower sucrose concentration(15g/l).

2 The formation of adventitious root was observed mainly in the medium containing higher sucrose concentration(60g/l) .