

絶滅危惧種オリヅルスミレの組織培養多芽体による大量増殖に関する研究*

尾崎健司¹⁾・近藤勝彦²⁾・橋本清美¹⁾

Micropropagation of the endangered *Viola stoloniflora* by the multiple-shoot method*

Kenji Osaki¹⁾, Katsuhiko Kondo²⁾ and Kiyoshi Hashimoto¹⁾

はじめに

オリヅルスミレは1982年に沖縄県北部の辺野喜川中流の溪流沿いで発見され、1988年に新種として記載された種である (Yokota *et al.* 1988)。発見された自生地は1984年にダムの建設により水没したため、本種は絶滅したものと思われてきた (1989年3月24日付中国新聞)。しかし、1994年になって別の自生地が発見され、絶滅は免れていたことが発表された (1994年12月9日付中国新聞夕刊)。しかし、生育場所、個体群ともに僅少であるため、依然本種が絶滅に類しており、保護、増殖を必要とする植物種であることに変わりはない。1982年の発見時に採集された株は、一時2個体にまで減少していたが、広島市植物公園で鉢植えて増殖に成功し、個体は沖縄に戻し導入した (世羅1989)。

オリヅルスミレの増殖方法としては、有性繁殖と、無性・栄養繁殖としての株分け、葉挿し、根伏せ、茎挿しが試みられた。しかし、種子の発芽率が低く、また株分け、根伏せ、茎挿しの増殖率も低かったことから、比較的効率的な増殖法は葉挿し法とされてきた (世羅1990)。

植物の栄養系大量増殖の手段として組織培養法が有効とされている (Murashige and Skoog 1962)。スミレ属植物の例では、シロバナスミレ (*Viola*

patinii DC.) を用いたカルスからの増殖及び再生法が報告されているが、系統保存及び大量増殖には至っていない (Sato *et al.* 1995)。

オリヅルスミレは、極めて絶滅に近い状態の種である上に、1994年に再発見された個体は、遺伝的に異なっている可能性のあることが指摘されている (横田未発表)。そこで本種を大量に増殖し、且つ系統保存を可能とする遺伝的に安定な組織培養系が望まれる。本研究はこのような培養系を確立することを目的として行った。

材料および方法

供試材料には、1986年に横田昌嗣博士より栽培依頼されたオリヅルスミレ (*Viola stoloniflora* Yokota *et Higa*) を実生、株分け、葉挿しによって増殖し、栽培管理してきた成株の閉鎖花 (自家受粉) からできた種子を用いた。無菌播種を行い、そこから生じた苗を用いて器官培養を行った。予備実験で、葉、花柄、根からの外植体を用いた器官培養も試みたが、地面を這うように生育するためか、雑菌汚染の問題が解決できなかった。

1) 無菌播種培地及び播種時期の検討

種子は採種後乾燥密閉した容器に入れて冷蔵庫で保管し、2週間以内の実験に使用した。播種する前

* Contribution from The Hiroshima Botanical Garden No. 59

1) : The Hiroshima Botanical Garden

2) : Laboratory of Plant Chromosome and Gene Stock, Faculty of Science, Hiroshima University

Bulletin of the Hiroshima Botanical Garden, No. 17: 1-8, 1997

表1. 無菌発芽したオリヅルスミレの NAA, kinetin 添加1/2MS 培地における初代培養60日後

NAA (mg/ℓ)	kinetin (mg/ℓ)		0		0.02		0.2		2.0	
	R	D	R	D	R	D	R	D	P	D
0	1	5	1	5	1	5	3	3	2	4
0.01	1	5	6		2	4	2	4	3	3
0.1	1	5	1	5	2	4	2	4	3	3
1.0	P+C	2	P+C	2	P	2	P	2	P+C	2
	C	2	C	1	C	2	C	2	D	4
	D	2	D	3	D	2	D	2		
5.0	C	2	C	3	P	1	P	1	P+C	2
	D	4	D	3	C+R	2	C+R	2	C	3
					D	3	D	3	D	1
10.0	C	2	C	3	C+R	3	C+R	3	P+C	3
	D	4	D	3	D	3	D	3	D	3

各区とも供試数6で培養開始後60日目のP:小植物体, C:カルス, R:根, D:枯死の個体数を示す。

に種子を1%塩化ベンザルコニウム液で5分間、有効塩素1%の次亜塩素酸ナトリウム溶液で5分間、70%エタノールに数秒間の順に浸漬して殺菌した後、滅菌水で3回洗浄した。

Murashige and Skoog (MS) 基本培地 (Murashige and Skoog 1962) に寒天 8 g/ℓ, ショ糖 15 g/ℓ 添加, pH 5.8 に調整し, 無機塩類濃度を 1/2, 1/4, 1/8 に調整したものを, 100 ml の三角フラスコに 50 ml ずつ分注し, 1 フラスコ当たり 10 粒を播種した。播種は, 1994年5月26日, 6月14日, 7月5日, 7月12日に行った。培養条件は, 22±2℃, 白色蛍光灯下 3000 lux, 24時間照明とした。

2) 無菌発芽苗からの不定芽誘導条件の検討

1) で発芽した苗はその後の生育が悪く, ほとんどの個体が褐変しはじめた。そこで, 発芽苗から直接不定芽を誘導するための条件の検討を行った。培地は 1/2MS 基本培地に寒天 8 g/ℓ, ショ糖 30 g/ℓ 添加, pH 5.8 に調整し, 生長調節物質としてナ

フトレン酢酸 (NAA) を 0~10.0 mg/ℓ, kinetin を 0~2.0 mg/ℓ の範囲で添加し, 試験管 (200 mm × 30 mm) に 20 ml ずつ分注した。1 試験管当たり 1 本, 1 試験区当たり 6 本を移植した。培養条件は, 22±2℃, 白色蛍光灯下 3000 lux, 24時間照明とした。

3) 葉, 茎頂, 根からの多芽体誘導条件の検討

2) の結果, ほとんどの個体はカルス化した。そのカルスよりまれに生じた不定芽が生長して小植物体となった。これら小植物体を葉, 茎頂, 根に分割し, これから多芽体を誘導するための培地を検討した。1/2MS 培地に, ベンジルアミノピューリン (BAP) 0~4.0 mg/ℓ, NAA 0~4.0 mg/ℓ, ジェランガム 2 g/ℓ, ショ糖 15 g/ℓ を添加, pH 5.8 に調整して, 100 ml の培養ビンに 50 ml ずつ分注し, 各ビンそれぞれ葉 10 枚, 茎頂 3 本, 根 3 本を置床した。培養条件は, 19±1℃, 白色蛍光灯下 3000 lux, 24時間照明とした。

4) 分割した多芽体からの発根条件の検討

3) の結果, 葉, 茎頂, 根のそれぞれの部位から誘導された多芽体を分割し, 新しい培地に置床して発根させるための培地条件の検討を行った。1/2MS培地に活性炭を0~4.0g/l, ジェランガム2g/l, ショ糖15g/lを添加, pH5.8に調整して, 100mlの三角フラスコに50mlずつ分注し, それぞれ3株ずつ置床した。培養条件は, 19±1℃, 白色蛍光灯下3000lux, 24時間照明とした。

5) 培養株の馴化

発根培地で十分に発根した株は, フラスコから取り出して培地を完全に洗い流し, プラントボックス(Magenta社製)に1/2の高さまでパーミキュライトを入れて植え付け, たっぷりと灌水して蓋をした。蓋は2週間はそのままにし, その後少しずつ開けていき, 徐々に外気に慣らした。馴化の条件は, 19±1℃, 白色蛍光灯下3000lux, 24時間照明とした。

フラスコから出して4週間後に, 親株と同じ培養土(パーミキュライト:赤玉土:パーライト=5:3:2)を用いて7.5cmポリポットに定植し, 最低温度13℃の温室内で栽培した。

結果及び考察

1) 無菌播種培地及び播種時期の検討

オリヅルスミレの生育は, 無菌播種後, 種皮に亀裂が入るまでに約30日, 根が出るまでに約30日, 子葉が展開するまでに約30日を必要とした(図2A)。1994年5月26日に播種したものは1/2, 1/4, 1/8MS培地において, 順に90, 89, 87%と高い発芽率を示した。これは, 鉢播きした場合の報告(世羅1990)が7~40%の発芽率を示したのに対し高い値であった。しかし, 播種(採取)時期が5月, 6月, 7月と遅くなるにしたがって, 発芽率は著しく低下し, 1994年7月12日に播種した場合には, どの培地においても10%以下となった。(図1)。この原因としては, 日長, 気温等の条件によって種子が休眠に入ったこと, 種子自体が未成熟で発芽能力が無いことなどが推測された。この実験で発芽した個体の殆どは, 子葉が展開した後, 根の先端から褐変し始め, 移植を行わなかったものはその後枯死した。

2) 無菌発芽苗からの不定芽誘導条件の検討

発芽後に褐変し始めた苗を生長調節物質(NAA, kinetin)を添加した培地に移植した結果, NAAの濃度が1.0mg/l以上でどの区においてもカルスが形成された(図2B)。植物体形成後の生育はkinetin 2.0mg/l添加した区において良好であり, 分化した植物体も濃い緑色を呈した。NAA 0.1mg/l以下, kinetin 0.02mg/l以下の区では根のみが伸長し, 培養60日後には褐変, 枯死が多かった。NAA 5.0mg/l, kinetin 2.0mg/lを添加した区で最も枯死数が少なく, カルス形成が盛んであり, そのカルスから分化してくる植物体も他の区の2倍程度と比較的大きくしっかりとしたものであったので, 以後の実験において, 器官培養の材料として用いるには最適であった(表1)。この実験において, 分化した植物体は数も少なく, 大量増殖という観点から見れば, 不十分な結果であった。また, 生育不良の原因として高い培養温度が考えられたため, 以後の実験からは培養温度を19±1℃に設定したインキュベーターを用いて培養を行った。

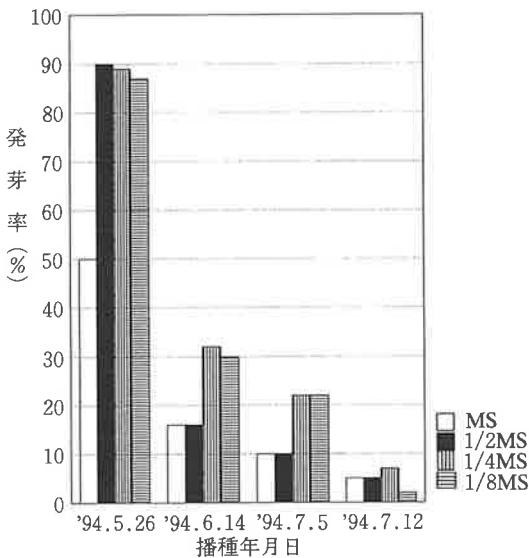


図1. オリヅルスミレの無菌播種90日後における発芽率

表2. 1/2MS 培地において生長調節物質が葉からの培養物分化に及ぼす影響 (60日後)

NAA mg/ℓ	BAP mg/ℓ		0		0.02		0.2		2.0		4.0	
	R	D	P	D	MS	D	MS	D	MS	D	MS+C	D
0	2	8	1	6	3	4	3	7	3	7	2	8
0.02	7	3	1	6	5	5	3	7	3	7	5	5
0.2	5	5	1	6	5	2	1	9	1	9	6	4
2.0	7	3	10	3	3	3	3	7	3	7	10	10
4.0	8	2	10	5	3	5	10	10	10	10	10	10

各区とも置床数10で、培養開始後60日目のMS：多芽体、P：小植物体、C：カルス、R：根、D：枯死の数を示す。

3) 葉、茎頂、根からの多芽体誘導条件の検討

①葉外植体からの器官形成

NAA を0.2mg/ℓ以上添加したほとんどの区において、培地に接した葉柄の切り口よりカルスが形成された(表2)。またBAP を0.2mg/ℓ以上、NAA を0~0.2mg/ℓ添加したほとんどの区において、盛んに多芽体が形成された(表2)。NAA 0.02mg/ℓ以下、BAP 0.02mg/ℓ以下の区では根が分化したが、その後の伸長が悪く、枯死する個体が多かった。NAA 0.2mg/ℓ、BAP 4.0mg/ℓ添加した区においてはカルスが形成され、そこから多芽体が盛んに形成されたが、展開した葉は縮れており、その後正常に生育しなかった。多芽体の高い増殖率と葉外植体からの多芽体誘導には、その後の良好な生育から、BAP 0.2mg/ℓを添加した区が最適であると考えられた(表2)。

②茎頂外植体からの器官形成

NAA を2.0mg/ℓ以上添加した区においてカル

スが形成された。多芽体は広い範囲の区で形成されたが、BAP を0.2mg/ℓ以上添加した区のほうが、生育が良好であり、その後の多芽体の増殖も盛んであった。BAP 添加0.02mg/ℓ以下の区で形成された多芽体は、シュート数も少なく、貧弱なものであった。茎頂外植体からの多芽体誘導にはBAP 0.2mg/ℓを添加した区が最適であると考えられた(表3、図2C)。

③根外植体からの器官形成

NAA を0.2mg/ℓ以上添加した区において根の切り口からカルスが、BAP を0.2mg/ℓ以上添加した区において同所から多芽体が形成された。NAA 0.02mg/ℓ以下、BAP 0.02mg/ℓ以下添加した区においては、1~2木の小植物体が形成されたが、どの区においても弱々しかった。また、NAA 0.2mg/ℓ以上及びBAP 0.2mg/ℓ以上添加した区において特にカルスの増殖が旺盛であったが、そこから分化する小植物体は黄化していた。根外植体からの

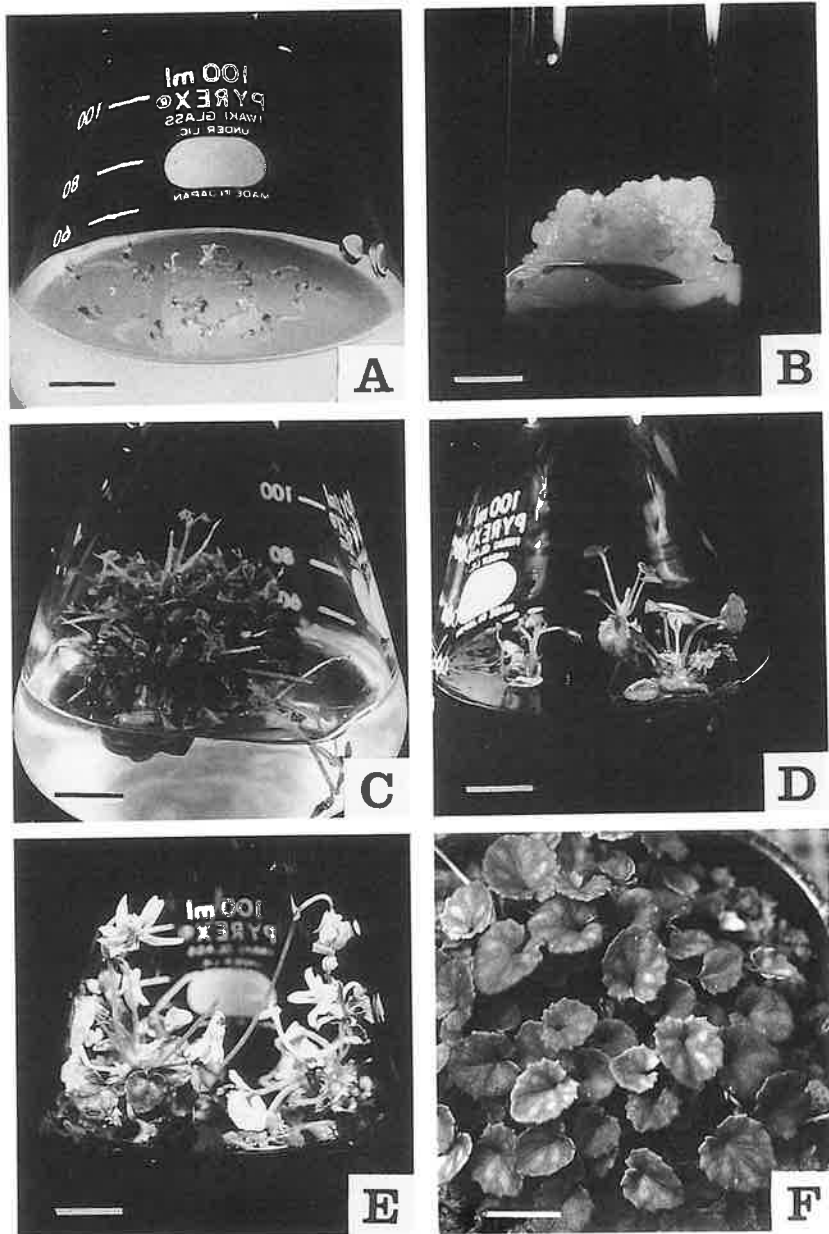


図2. オリヅルスミレ無菌培養.

A. 無菌発芽苗 (1/4MS, 播種60日後)

B. カルス化した発芽苗 (1/2MS に NAA 5 mg/l, kinetin 2 mg/l 添加, 継代60日後)

C. 茎頂外植体より形成された多芽体 (1/2MS に BAP 0.2 mg/l 添加, 置床50日後)

D. 多芽体より分割した苗 (1/2MS に活性炭 2 g/l 添加, 継代20日後)

E. フラスコ内で開花した苗 (1/2MS に活性炭 2 g/l 添加, 継代50日後)

F. 馴化後生育中の株

図中の横棒は 1 cm を示す.

表 3. 1/2MS 培地において生長調節物質が茎頂からの培養物分化に及ぼす影響 (60日後)

NAA mg/ℓ	BAP mg/ℓ		0		0.02		0.2		2.0		4.0	
0	MS+R	2	MS	2	MS	3	MS	3	MS	1		
	D	1	D	1							P	1
											D	1
0.02	MS+R	2	P	3	MS+R	3	MS	2	MS	1		
	D	1					D	1	D	2		
0.2	P	2	MS	3	MS	3	MS	2	MS	3		
	D	1					D	1				
2.0	C+R	2	P+C+R	3	MS+R	2	P+C	2	MS+C	3		
	D	1			D	1	D	1				
4.0	P+C	3	C	3	P+C+R	3	P+C	3	MS+C	3		

各区とも置床数3で、培養開始後60日目のMS：多芽体，P：小植物体，C：カルス，R：根，D：枯死の数を示す。

多芽体誘導にはBAPを0.2mg/ℓ添加した区が多芽体の増殖も旺盛で、その後の生育も良好であったので、最適であると考えられた(表4)。

葉、茎頂、根いづれの外植体からもNAAは無添加で、BAPのみを0.2mg/ℓ添加することによって、多芽体は盛んに形成された。この多芽体を分割し増殖を繰り返すことで、大量増殖が可能となった(図2D, 図3)。しかし多芽体の増殖速度が早く、40~50日に1回の間隔で継代移植を行わないと無菌的に維持できなかった。

4) 分割した多芽体からの発根条件の検討

活性炭を添加することによって平均根長の値は大きくなり、t検定の結果、無添加(コントロール)と2.0g/ℓ活性炭添加培地で培養した区、そして無添加と4.0g/ℓ添加した区に有意水準1%以下で有意差がみられた(表5)。一方、2.0g/ℓと4.0g/ℓ添加した区に有意差はみられなかった。また、平均発根数においては有意差はみら

れなかった。したがって、根の伸長には活性炭を2.0g/ℓ以上添加した場合が最も適することがわかった(表5)。この現象は、Anagnostakis(1974)によれば、活性炭によって、培養体より排出されるフェノール性物質等の生長阻害物質が吸着されることや、根が暗い方向に対して伸長する習性が強いためではないからと言われている。また、茎頂を外植体とし、NAA 0.02mg/ℓ、BAP 0.02mg/ℓ添加した区において形成された小植物体は、発根培地に置床50日後にフラスコ内で開花した(図2E)。この時期は親株の開花時期と一致しており、親株と異なる24時間照明という日長条件下で同様に開花したということは非常に興味深い。

5) 培養株の馴化

フラスコから出して、徐々に外気に慣らした培養株は、外部の環境に馴化し順調に生育したが、現在のところ、開花には至っていない(図2F)。

表4. 1/2MS 培地において生長調節物質が根からの培養物分化に及ぼす影響 (60日後)

NAA mg/ℓ	BAP mg/ℓ		0		0.02		0.2		2.0		4.0	
	0	0.02	0	0.02	0	0.02	0	0.02	0	0.02	0	0.02
0	P	2	P	2	MS	2	MS	1	MS	2	D	1
	D	1	D	1	D	1	D	2	D	1	D	1
0.02	P	1	P	3	P	1	MS	1	MS	1	MS	2
	D	2			MS	1	D	2	D	1	D	1
0.2	C+R	3	P	1	C+R	1	P+C	1	MS+R	3		
			R	1	MS	2	D	2				
2.0	C+R	3	P+C+R	1	P+C	2	C	3	C	3		
			C+R	2	D	1						
4.0	C+R	3	C	3	C	3	P+C	2	C	3		
							D	1				

各区とも置床数3で、培養開始後60日目のMS：多芽体、P：小植物体、C：カルス、R：根、D：枯死の数を示す。

表5. 活性炭の添加が発根生育に及ぼす影響 (50日後)

活性炭 (g/ℓ)	平均発根数 (本)	平均根長 (mm)
0	4.9	9.3 *
2.0	6.5	16.1 **
4.0	7.8	15.4 **

各区とも供試数10とした

*と**の間に有意水準1%以下で有意差がみられた

今後はさらに苗条原基のような増殖体を經由した培養系を確立し、系統保存に役立てたい。

を添加した場合、根の伸長が盛んであった。

謝 辞

本研究は、広島市植物公園および、広島大学理学部附属植物遺伝子保管実験施設の方々の協力で行われました。ここに厚くお礼申し上げます。

摘 要

多芽体を用いたオリヅルスミレの大量増殖系が確立された。多芽体は無菌発芽苗を葉、茎頂、根に分割し、植物ホルモンとしてBAPを0.2mg/ℓ添加した1/2MS培地に置床することによって容易に得られた。発根培地は1/2MS培地に活性炭2.0g/ℓ

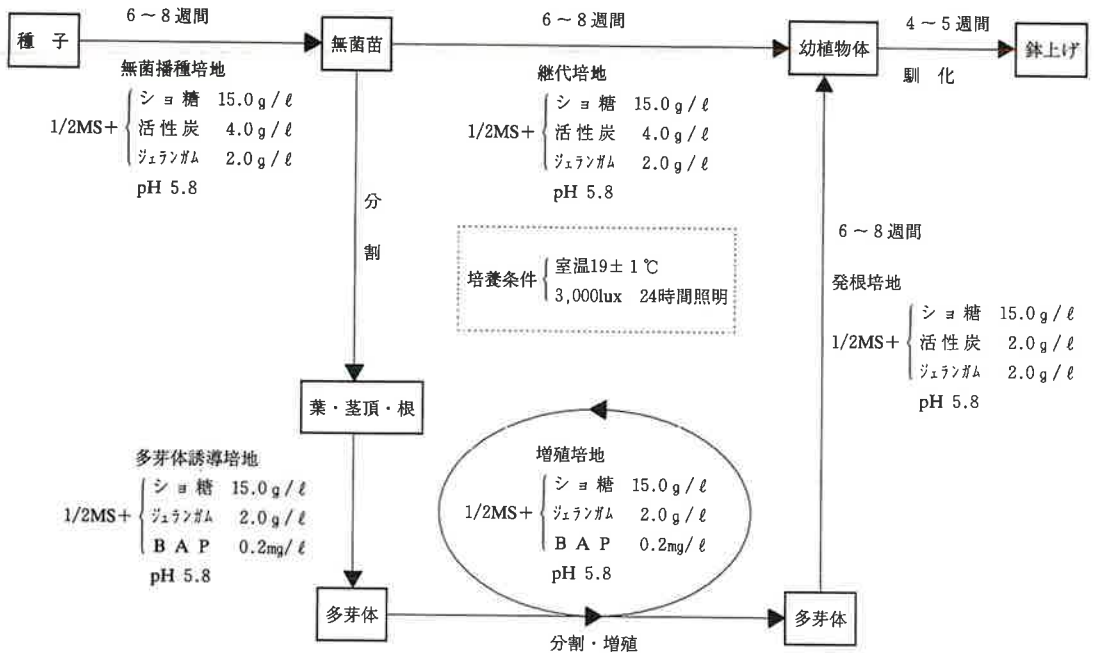


図3. 多芽体を利用したオリヅルスミレの大量増殖プロセス

Summary

Rapid-micropropagation line of *Viola stoloniflora* by multiple-shoots was here established. The multiple-shoots were induced in 1/2MS gelrite medium supplemented with 0.2mg/l BAP from the explants of leaves, shoot-meristems and roots from axenic seedlings grown on 1/2MS agar medium with 15g/l sucrose at pH5.8 at 22 ± 2°C. Root formation was most efficiently induced in 1/2MS gelrite medium with 15g/l sucrose and 2.0mg/l charcoal.

参考文献

Anagnostakis, S.L. 1974. Haploid plants from anthers of tobacco-enhancement with charcoal. *Planta* 115:281-283.

Murashige, T. and F. Skoog 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15:473-497.

Sato, T., C. K. Oh, H. Miyake, and T. Taniguchi 1995. Regeneration of plantlets from petiole callus of wild viola (*Viola patrinii* DC.). *Plant Cell Rep.* 14: 768-772.

世羅徹哉1989。オリヅルスミレの栽培記録。広島市植物公園栽培記録第10号。10-11。

世羅徹哉1990。オリヅルスミレの増殖について広島市植物公園栽培記録第11号。7-8。

Yokota, M., S.Higa, H.Yoshioka and K.Shimabuku 1988. *Viola stoloniflora* (Violaceae), a new species from the Ryukyus. *Bot. Mag. Tokyo* 101:1-8.