



Title	in-vitro培養によるユキザサ (<i>Smilacina japonica</i> A. Gray) 茎組織からの器官形成と植物体再生
Author(s)	劉, 永立; Liu, Yong-Li; 原田, 隆 他
Citation	北海道大学農学部農場研究報告, 32, 23-28
Issue Date	2001-03-29
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/13449
Type	departmental bulletin paper
File Information	32_p23-28.pdf



In-vitro 培養によるユキザサ (*Smilacina japonica* A. Gray) 茎組織からの 器官形成と植物体再生

劉 永立・原田 隆・鈴木 卓・増田 清・大澤 勝次

(北海道大学大学院農学研究科園芸緑地学講座)

(2001年1月19日受理)

緒 言

ユキザサ属植物 (*Smilacina* SSP.) は東アジアおよび北アメリカ北部に約20種が分布しており、日本には3種が自生している。このうち、北海道の山地に自生しているユキザサ (*Smilacina japonica* A. Gray) は森林の下草の少ない、湿気の多い所に生える多年生のユリ科山菜である。北海道では、4月中旬~5月中旬の新芽と若葉が最も美味しく、人気の高い山菜である。ユキザサの繁殖は主に地下茎によるが、一度新芽を摘むと新しい芽を出すことなく、休眠してしまう習性があり、繁殖ができなくなる。近年、人間による過度の採集により、周辺の山地に自生するユキザサが年々減少の一途をたどっている。このような背景から、北方系可食性山野草のユキザサの栽培および繁殖法を明らかにし、その優良系統を増殖し栽培化することが必要となっている。そこで本研究では、ユキザサの大量増殖の基礎となる組織培養系を確立するため、茎組織片からのカルスおよび器官形成に及ぼす生長調節物質および基本培地の影響について検討した。ユキザサを用いた初の組織培養の実験結果である。

材料および方法

実験1. 野外ユキザサ茎組織片のカルスおよび器官形成に及ぼす生長調節物質の影響

1998年10月15日に北海道恵庭市の山地に自生しているユキザサ (*Smilacina japonica* A. Gray) を採取し、地下茎の先端部の芽 (長さ：20~30 mm) を切り出した後、水道水で数回洗浄した。洗浄した芽の未展開の葉を剥き、成長点と

側芽を除いた短縮茎 (節間の長さ：5~20 mm) を材料とした (第1図)。滅菌は、70%エタノールに40秒間浸漬した後、次亜塩素酸ナトリウム溶液 (有効塩素1%, Tween 20を数滴添加) に8分間浸漬する方法により行い、滅菌水で3回洗浄した。その後、この短縮茎を、長さ約5~7 mmに分割して培養した。外植片数は、容器 (100 ml エレンマイヤーフラスコ) 当たり3個、各処理区当たり24個とし、茎の軸方向が垂直となるように縦方向に置床した。

培地は、AZ培地 (Abo El-Nil, M. M. and F. W. Zettler, 1976) の無機塩とビタミン類にショ糖30 g/l, ゲルライト2 g/lを添加したものを基本と

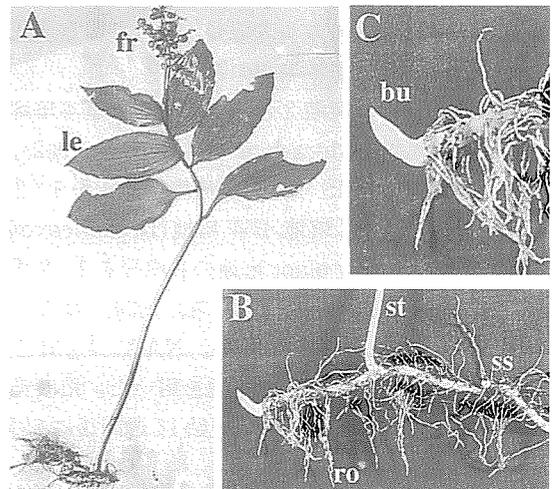


Fig. 1. The structures of a plant of *Smilacina japonica* collected on September, 2000. (A), Terrestrial regions; (B), subterranean regions; (C), apical bud of subterranean stem (zoomed figure of B). bu, Bud; fr, fruit; le, leaf; ro, root; ss, subterranean stem; st, stem.

し、以下に述べる生長調節物質を加え、pH 5.7~5.8 に調整したものをを用いた。生長調節物質については、1-naphthalene acetic acid (NAA) (0, 1 および 10 μM) と kinetin (0, 1, 10 および 100 μM) を 12 通りに組み合わせて用いた。培地量は、容器 (100 ml エレンマイヤーフラスコ) 当たり 25 ml とし、120°C, 15 分間の加圧滅菌後に用いた。培養は 25°C, 16 時間日長 (白色蛍光灯, 約 70 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$) の条件下で行った。培養開始 12 週間後にカルスおよび器官の形成について調査した。

実験 2. ユキザサのカルス培養における器官形成に及ぼす生長調節物質の影響

実験 1 の NAA 1 μM と kinetin 10 μM 添加区で形成されたカルスを 6 mm 立方程度の小塊に分割して培養した。培地は、AZ 培地にショ糖 30 g/l およびゲルライト 2 g/l を添加したものを基本とし、NAA (0, 1, 10 および 100 μM) と kinetin (0, 1, 10 μM) を組み合わせた 12 種類とした。培養条件は実験 1 と同様とし、培養開始 14 週間後に、器官形成について調査した。

実験 3. ユキザサのカルス培養における器官形成に及ぼす基本培地の影響

材料のカルスは実験 2 と同様である。基本培地には、MS 培地 (Murashige and Skoog, 1962), 1/2 MS 培地 (MS 培地の無機塩類のみを 1/2 に減じたもの), AZ 培地, BW 培地 (Broad-leaved tree 培地と Woody plant 培地の各成分を 1/2 ずつ混合したもの, Sugawara ら, 1994) および Nitsch 培地の 5 種類を用い、NAA 1 μM と kinetin 10 μM を添加した培地を用いた。培養条件は実験 1 と同様とし、培養開始 14 週間後に、器官形成について調査した。

実験 4. 再分化シュートからの発根に及ぼす生長調節物質の影響

実験 2 によって得られたフラスコ内のユキザサのシュート (長さ 15~30 mm) を基部から切り取って材料とした。基本培地は、AZ 培地を用い、

NAA (0, 1, 10 および 100 μM) と kinetin (0, 1 および 10 μM) を組み合わせて添加した 12 種類を用いた。培養条件は実験 1 と同様とし、培養開始 14 週間後に、根の形成について調査した。

結果および考察

実験 1. 野外ユキザサ茎組織片からのカルスおよび器官形成に及ぼす生長調節物質の影響

ユキザサ茎組織片を培養すると、3 週間後頃から組織片の基部が徐々に肥大し、カルスが形成され始めた。カルス形成率は、添加した生長調節物質の種類の影響を受け、kinetin 単独添加区において、kinetin 濃度が高いほどカルス形成率は高かった。しかし、NAA と組み合わせた場合その傾向は認められず、NAA 1 μM および 10 μM 添加区において、kinetin 濃度の違いによるカルス形成率の差はほとんど認められなかった (第 1 表)。

次に茎組織片からのシュート形成についてみると、シュートは外植片の表層から発生していた。この場合、培養 3 週間後頃に外植片の基部が肥大し、肥大組織の表面に隆起が形成され、その後、その隆起が成長して、5 週間後には正常なシュートとなった (第 2 図の A)。このようにシュートがユキザサの茎組織の表層から、カルスを經由せずに直接的に形成されていると観察されたので、今後の組織学および細胞学的な検討対象と考えている。

シュート形成率は NAA 無添加区では kinetin の添加濃度が高い区ほど高く、NAA との組み合わせ添加区においては、NAA 1 μM と kinetin 10 μM 添加区が高かった (第 1 表)。

根は外植片およびシュートの基部から直接分化し、発根率と切片当たりの根数は高濃度の kinetin の添加により減少し、kinetin 100 μM 添加区においては、根の形成は完全に抑制された (第 1 表)。

実験 2. ユキザサのカルスの培養における器官形成に及ぼす生長調節物質の影響

実験 1 で誘導されたカルスを移植して培養したところ、新たなシュートが形成された (第 2 図の B)。シュート形成率は、NAA 1 μM と kinetin 10

Table 1. Effects of NAA and kinetin on the formation of callus and organs from internodal segments of *Smilacina japonica*.^z

NAA (μ M)	Kinetin (μ M)	% of callus formation	% of shoot formation	Number of shoots per segment ^y	% of root formation	Number of roots per segment ^y
0	0	12.5	12.5	0.5 \pm 0.1	62.5	3.6 \pm 1.3
	1	50.0	25.0	1.2 \pm 0.3	87.5	6.7 \pm 1.4
	10	54.2	54.2	1.9 \pm 0.5	37.5	3.0 \pm 1.0
	100	70.8	58.3	2.3 \pm 0.6	0	0
1	0	41.7	16.7	1.0 \pm 0.3	70.8	6.8 \pm 1.5
	1	58.3	29.2	1.3 \pm 0.3	70.8	6.5 \pm 1.5
	10	70.8	66.7	3.0 \pm 1.1	29.2	2.5 \pm 0.8
	100	50.0	58.3	1.4 \pm 0.4	0	0
10	0	54.2	8.3	1.1 \pm 0.2	25.0	5.0 \pm 2.1
	1	58.3	16.7	1.0 \pm 0.4	50.0	5.5 \pm 1.6
	10	50.0	33.3	2.0 \pm 0.7	41.7	3.3 \pm 1.3
	100	45.8	20.8	1.0 \pm 0.3	0	0

^z Measured after 12 weeks of culture. Culture medium : AZ.

^y Mean \pm SE. Number of explants per treatment : 24.

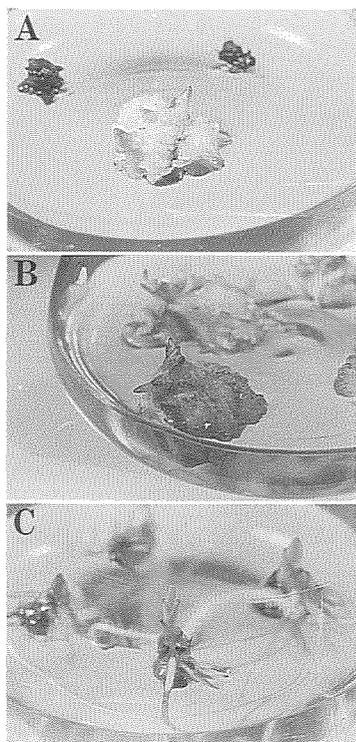


Fig. 2. Plant regeneration from stem segments of *Smilacina japonica*. (A), Formation of adventitious shoots ; (B), proliferation of shoots on a subcultured callus ; (C), formation of roots from the basal region of a subcultured shoot.

μ M の組み合わせ添加区で 75 % と最も高い値となった (第 2 表)。Kinetin 無添加区では、シュートが形成されなかった。シュート形成率およびシュート数は、kinetin の濃度が高い区ほど高く、NAA の濃度が高い区ほど低い値を示した。

根の形成は NAA 100 μ M と kinetin 10 μ M の組み合わせ添加区を除く区で認められた (第 2 表)。発根率および切片当たり根数に及ぼす生長調節物質の影響は、NAA 無添加および 1 μ M 添加区で、kinetin の添加濃度が高い区ほど高かった。これは初代培養の結果 (第 1 表) と異なったが、この違いは kinetin の添加により、シュート形成率が高くなり、シュート形成率が高いほど発根率および切片当たり根数も多くなったためと考えられる。また、NAA 10 μ M 添加区では、kinetin の影響が見られず、NAA 100 μ M 添加区では、根の形成が抑制された。

実験 3. ユキザサのカルス培養における器官形成に及ぼす基本培地の影響

シュート形成については、AZ 培地、1/2 MS 培地および Nitsch 培地の間に顕著な差は見られなかったが、BW 培地では劣り、MS 培地ではシュートの形成が全く認められなかった (第 3 表)。特に AZ 培地を用いた場合のシュート形成率は 83.3

Table 2. Effects of NAA and kinetin on the formation of organs from callus cultures of *Smilacina japonica*.^z

NAA (μM)	Kinetin (μM)	% of shoot formation	Number of shoots per callus ^y	% of root formation	Number of roots per callus ^y
0	0	0	0	12.5	2.0 \pm 0.7
	1	25.0	1.3 \pm 0.3	37.5	6.5 \pm 2.1
	10	50.0	4.2 \pm 1.1	62.5	14.0 \pm 3.8
1	0	0	0	12.5	1.8 \pm 0.5
	1	37.5	1.0 \pm 0.3	25.0	5.5 \pm 1.8
	10	75.0	2.8 \pm 1.1	37.5	11.0 \pm 4.4
10	0	4.1	1.1 \pm 0.5	33.3	11.6 \pm 2.8
	1	41.6	2.6 \pm 0.9	37.5	15.7 \pm 6.3
	10	37.5	2.0 \pm 0.6	37.5	16.1 \pm 7.1
100	0	4.1	1.2 \pm 0.5	25.0	6.0 \pm 2.4
	1	0	0	25.0	9.5 \pm 3.1
	10	12.5	1.0 \pm 0.3	0	0

^z Measured after 14 weeks of culture. Culture medium : AZ.^y Mean \pm SE. Number of explants per treatment : 24.**Table 3.** Effect of the types of culture medium on the formation of organs from callus cultures of *Smilacina japonica*.^z

Culture medium	% of shoot formation	Number of shoots per callus ^y	% of root formation	Number of roots per callus ^y
MS	0	0	37.5	5.5 \pm 2.0
1/2MS	75.0	2.0 \pm 0.5	66.7	3.5 \pm 0.8
BW	50.0	1.5 \pm 0.6	70.8	4.0 \pm 1.4
Nitsch	79.1	1.5 \pm 0.2	54.2	6.1 \pm 0.4
AZ	83.3	3.0 \pm 0.7	58.3	8.7 \pm 2.7

^z Measured after 14 weeks of culture.^y Mean \pm SE. Number of explants per treatment : 24.

%で最も高く、切片当たりのシュート数も最も多かった。各種植物を用いた組織培養中の形態形成に及ぼす基本培地の影響は多くの研究者により報告されている (Halperin and Wetherell, 1965 ; Kata and Takeuchi, 1966 ; Liu et al., 1997 ; Nadel et al., 1989 ; Tazawa and Reinert, 1969 ; Wetherell, 1984)。基本培地の性質を決める要因として、無機塩の種類、特に硝酸態窒素とアンモニア態窒素の比率、培地の浸透価などが挙げられる。ユキザサの培養では、MS培地を使用した場合、カルスからシュートが形成されず、カルスに褐変が観察されたにもかかわらず、1/2 MS培地やAZ培地を使用した場合では、カルスは正常に生長し、シュートを形成した。したがって、この差には、基本培地の無機塩類の濃度が大きく影

響したと考えられる。つまり、ユキザサのカルス培養には、無機塩類の濃度が低い培地が適していると考えられる。根の形成についても、形成率は、1/2 MS培地およびWB培地では高かったが、MS培地では低く、シュートと同様に無機塩類の濃度が低い方がよいと考えられる。

実験 4. 再分化シュートからの発根に及ぼす生長調節物質の影響

再分化したシュートを新しい培地に移植したところ、シュート基部から根が直接発生して、完全な植物体となった(第2図のC)。この場合、生長調節物質を全く添加しない区が発根率が100%と最も高く、NAAおよびkinetinの添加は発根率を低下させた。特に、NAA 100 μM 単独添加区およ

び NAA 100 μ M と kinetin 10 μ M の組み合わせ添加区では全く根が形成されなかった。Kinetin の濃度が高い区ほど、発根率が低くなった(第3図)。

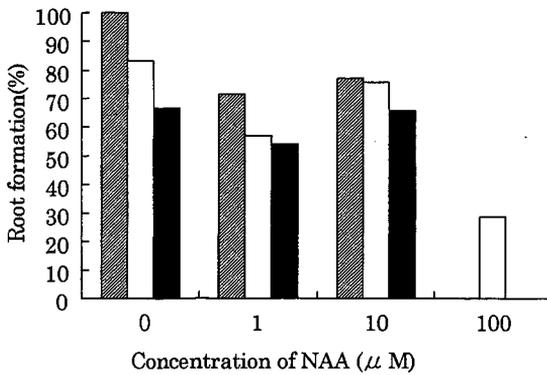


Fig. 3. Effects of NAA and kinetin on root formation from the base of a shoot derived from callus cultures of *Smilacina japonica*. Concentration of kinetin : 0 μ M (▨), 1 μ M (□), and 10 μ M (■). Culture medium : AZ.

以上のように、ユキザサの短縮茎組織およびカルスの培養により、シュートが形成され、さらに、シュートは幼植物となった。この実験で確立された培養系は、北方系可食性山野草として貴重なユキザサの繁殖に有効な手段になり得ると考える。

摘 要

ユキザサ (*Smilacina japonica* A. Gray) の栄養繁殖と形質の改良を目的として組織培養による大量繁殖系を確立した。茎組織片からのカルス形成および器官形成に及ぼす生長調節物質と基本培地の影響について検討するため、基本培地には AZ 培地を中心に用い、ショ糖 30 g/l, ゲルライト 2 g/l を添加し、NAA と kinetin とを組み合わせた 12 種類の培地を用いた。培養は 25 $^{\circ}$ C, 16 時間日長 (白色蛍光灯, 約 70 μ Em $^{-2}$ s $^{-1}$) の条件下で行った。

ユキザサの茎組織からのカルス形成は生長調節物質の添加により促進された。シュートは茎組織から直接再分化するほか、茎組織由来のカルスの

培養によっても形成され、増殖法が確立された。カルスからのシュート形成率および切片当たりのシュート数は、AZ 培地に NAA 1 μ M と kinetin 10 μ M を組み合わせて添加した培地で最大となった。

形成されたシュートを切り出し、生長調節物質を含まない AZ 培地へ移植したところ、すべてのシュートが発根し、旺盛に生長する健全な幼植物になった。本報は北方系可食性山野草として貴重なユキザサの in-vitro 培養を用いた増殖法の最初の論文である。

引用文献

- Abo El-Nil, M. M. and F. W. Zettler. 1976. Callus initiation and organ differentiation from shoot tip cultures of *Colocasia esculenta*. *Plant Sci. Lett.* 6 : 401-408.
- Halperin W. and D. F. Wetherell. 1965. Ammonium requirement for embryogenesis *in vitro*. *Nature*. 205 : 519-520.
- Kata H. and M. Takeuchi. 1966. Embryogenesis from the epidermal cells of carrot hypocotyl. *Biology*. 245-254.
- Liu Yong-Li, H. Namiki, N. Kasai and T. Harada. 1997. Organ Formation and Plant Regeneration from Internodal Segments of *Actinidia kolomikta* Maxim. in *in-vitro* Culture. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 65 : 671-676. 1997.
- Murashige, T. and F. Skoong. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*. 15 : 473-497.
- Nadel B. L., A. Altman and M. Ziv. 1989. Regulation of somatic embryogenesis in celery cell suspensions. I. Promoting effects of mannitol on somatic embryo development. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 18 : 181-189.
- 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 Culture Lett.* 11 : 14-18.
- Tazawa M. and J. Reinert. 1969. Extracellular and intracellular chemical environments in relation to embryogenesis *in vitro*. *Protoplasma*. 68 : 157-173.
- Wetherell D. F. 1984. Enhanced adventive embryogenesis resulting from plasmolysis of cultured wild carrot cells. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 3 : 221-227.

In-vitro Organ Formation and Plant Regeneration from Stem Segments of *Smilacina japonica* A. Gray

Liu Yong-Li, Takashi HARADA, Takashi SUZUKI, Kiyoshi MASUDA
and Katsuji OOSAWA

(Research Group of Horticultural Science and Landscape Architecture, Graduate School of Agriculture,
Hokkaido University, Sapporo 060-8589)

(Received January 19, 2001)

Summary

To establish an efficient method for *in-vitro* propagation of *Smilacina japonica* A. Gray, explants from stem segments were cultured on AZ medium (Abo-El-Nil and Zettler, 1976) containing 3% sucrose and 0.2% Gelrite, supplemented with 12 combinations of NAA and kinetin. They were cultured in a growth chamber at 25°C under a 16-h light and 8-h dark photoperiod with a light intensity of $70\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Adventitious shoots were regenerated from the stem segments. Callus formation from the stem segments was promoted by adding NAA and/or kinetin. Calli that had formed shoots were the largest when those were cultured on the AZ medium supplemented with $1\mu\text{M}$ NAA and $10\mu\text{M}$ kinetin.

Exogenous supply of the growth regulators was found to inhibit root formation. The shoots subcultured on fresh medium without any plant growth regulators exhibit best rooting. The plantlets grew healthily and vigorously into mature plants after transplanting to soil.

This is the first report on the tissue culture of *Smilacina japonica* A. Gray, a Japanese edible herb.