

ハナスベリヒユの組織培養

森 屋 一

神奈川県立逗子高等学校

Tissue culture of *Portulaca oleracea* var. *gigantes*

Kazu MORIYA

KANAGAWA PREFECTURAL ZUSHI SENIOR HIGH SCHOOL

SUMMARY

The stems and the leaves of *Portulaca oleracea* var. *gigantes* were cultured on MS medium containing NAA and/or BA. They formed calli in such a short period as four days.

Adventitious root formation was observed when the stems were cultured on MS medium with high NAA and low BA concentration. Callus formation was seen on MS medium with high concentration of both phytohormones.

MS medium with 10mg/l NAA was suitable for adventitious root formation. MS medium with 10mg/l NAA+1mg/l BA or 10mg/l NAA+10mg/l BA was suitable for callus formation.

The utilization of this plant as teaching materials for plant tissue culture was studied.

はじめに

近年、植物組織培養の実験、観察を高校生物に取り入れようという試みは多く、キク^{1,2)}、ヨモギ³⁾、ニンジン^{4,5)}、ムラサキツユクサ⁶⁾、シロイヌナズナ⁷⁾、タンポポ⁸⁾など、教材としてすぐれた性質をもつ植物が紹介されている。

植物組織培養実験の面白さは、植物体の一部分が培地上で生存し続けること、そして培地中の植物ホルモンの種類により、ダイナミックに変化することであろうと考えられる。また、カルスという細胞の塊りを形成し、増殖する様子を観察することにより、植物の生命力の強さ、あるいは生命の神秘すら感じられるのではないだろうか。しかも、それらを、自分の手を使って実現させたのであれば、感動は大きいものと思われる。

しかし、培養植物体にカルスが形成されるには、かなりの期間を要する植物が多い。キク⁹⁾、ニンジン¹⁰⁾などは1カ月、ムラサキツユクサは3~4週間かかる⁶⁾、比較的早いシロイヌナズナでも、2週間で要するといわれている⁷⁾。生徒実験に使用したときに、このように期間がかかるのでは、感動が薄れてしまうのではないかという危惧を抱く。

そこで、多数の植物種について検討してみたところ、ハナスベリヒユ(*Portulaca oleracea* var. *gigantes*)の茎、葉に培養4日間で、肉眼ではっきりと見られるカルスが形成されることが確かめられた。本論文で、ハナスベリヒユの組織培養の結果、およびその教材としての利用について報告する。

材料および方法

プランターで育てたハナスベリヒユの枝を必要量

だけハサミで切り取り、あらかじめ加熱融解してあったパラフィンに茎の切り口をつけてふさぐ。これを70%エタノールに約30秒間浸してから20%ビューラックス(または7%さらし粉水溶液のろ液)中に15分間浸けた後、無菌箱中に移し、滅菌水中で3回洗浄した。このあと、茎は7~8mmの長さの切片にし、各区の培地に90片ずつ置床した。葉は1枚を2~3片に切り、各区に10片ずつ置床した。

なお、培地はショ糖30g/lを加えた Murashige-Skoog 培地¹¹⁾(MS培地)を基本培地とし、0~10mg/lの各種濃度の植物ホルモン、すなわち、ナフタレン酢酸(NAA)とベンジルアデニン(BA)、NAAとカイネチン(Ki)を第1表~第5表のように組み合わせそれぞれ16区を作り、pH5.75とした。寒天は9g/l加えた。

また、茎を、NAA 10mg/l+BA 1mg/lを含んだMS培地で脱分化させて、カルスを形成させた。このカルスを同じ成分の培地で1カ月ごとに継代培養し、約4カ月間増殖させたものを、径3~7mmの大きさにして、第4、5表の16区の培地に置床した。

茎、葉、カルスの培養は、20~30℃、100~600luxの、蛍光灯連続照明下で行った。

結果と考察

1) 茎の培養

(1) カルスの形成(第1表)

茎を培地上に寝かせて置いておくと、片側のあるいは両側の切り口に鉄垂鈴状にカルスが形成されてきた。しかも、培養を開始して4日後にほとんどすべての区において、カルスの形成されている様子が肉眼で観察できた。特にNAA 10mg/l+BA 1mg/lの区では57%という高率のカルス形成が見られた。

BA濃度が0mg/lの4区と他のいくつかの区では、早い時期でカルスを生じても後になって小さいカルスのままか、あるいはカルスと認められないほど小さくなってしまった。特にNAA 10mg/l+BA 0mg/lの区では切片が溶けたようになり、カスルもほとんど消失してしまった。

それに対し、NAA、BAとも1mg/l以上を含む4区などでは培養の日数が増加するにつれて、カルス形成率もカルスの大きさも増大していった。特にNAA 10mg/l+BA 1mg/lと、NAA 10mg/l+BA 10mg/lの2区では、著しいカルスの増殖が見られた。第

1表には、3週間後までの結果しか示していないが、3週間後において増殖しつつあったカルスは8週間後にも増殖を続けていた。

第1表 茎のカルス形成。

NAA mg/l BA mg/l	0	0.1	1	10
0	8 19 26 21 I I I I	33 88 80 66 I I I I	5 95 93 70 I I I I	2 54 10 18 O I I O
0.1	38 56 50 45 I I I I	23 86 84 83 I I I I	23 76 66 91 I I I I	47 78 81 94 I I I I
1	12 52 45 43 I I I I	17 71 67 69 I I I I	30 96 97 99 I I I I	57 95 95 100 I I I I
10	2 11 6 6 O I I I	0 14 18 17 O I I I	23 22 75 81 I I I I	2 90 100 100 I I I I

各区の試料の総切片数は90個であった。

各区において上段の数字は、カルス形成率を示す。

$$\text{カルス形成率} = \frac{\text{カルスを生じた切片数}}{\text{総切片数}} \times 100(\%)$$

下段の数字はカルスの平均の大きさを示す。

O: 微小, I: 厚さ0~1mm, II: 厚さ1~3mm,

III: 厚さ3~5mm, IV: 厚さ5mm以上

各区の数字の第1列は、4日後、第2列は1週間後

第3列は、2週間後、第4列は3週間後の結果を示す。

(2) 不定根の形成(第2表)

茎からの不定根形成はBAを含まない4区でよく見られた。その場合、NAAが0→0.1→1→10mg/lと増加するにつれ、不定根形成は早まっていき、不定根形成率も高くなっていった。培養期間が3週間以上を過ぎると、BAを0.1mg/l含む区でも不定根形成が見られるようになった。

不定根形成は、培地中にBAが多くなると起りにくくなり、NAAが多くなると起こりやすくなるという関係が見られた。コマツナの子葉の場合にも、不定根形成は、BA 10mg/lを含んだ培地では見られず、BAが1mg/l以下で、NAAが多くなると顕著になることが示されており¹²⁾、両植物ホルモンの働きを考えると興味深い。

以上、茎の培養において、カルス形成と不定根の形成について報告したが、芽も多くの区において出現した。しかしこれらの芽が、培地中の植物ホルモンの作用により生じたのか、もともと茎に存在していたものであったのかは、判定し難かった。

第2表 茎の不定根形成率.

NAA BA mg/l	0	0.1	1	10
0	0 0 8 4	0 1 5 6	0 1 15 37	0 3 47 67
0.1	0 0 0 0	0 0 0 4	0 0 0 0	0 0 1 4
1	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 2
10	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0

各区の試料の総切片数は90個であった。
 不定根を生じた切片数
 不定根形成率 = $\frac{\text{不定根を生じた切片数}}{\text{総切片数}} \times 100(\%)$
 各区の4つの数字は、左から4日後、1週間後、2週間後、3週間後の結果を示す。

2) 葉の培養(第3表)

葉の場合もカルスは、切り口の部分によく形成された。茎と同じく培養して4日後に、カルス形成が見られた。また、NAA, BAともに1mg/l以上含んでいる区でカルスの増殖が著しいことなど、茎とおおよそ共通の傾向を示した。

しかし、すべて同じというわけではない。つまり、葉の場合にはBAを含まない区では、カルスを作らず、比較的早く枯死してしまった。また葉からの不定根形成は、4週間程度まではほとんど見られず、7,8週間かかってから、はっきりと見られるようになった。

第3表 葉のカルス形成.

NAA BA mg/l	0	0.1	1	10
0	0 0 0 0 - - - -	0 0 0 0 - - - -	0 0 0 0 - - - -	0 0 0 0 - - - -
0.1	0 0 0 0 - - - -	80 80 80 100 I I I I	80 100 100 100 I I I II	80 100 100 100 0 I I II
1	0 0 20 20 - - 0 0	40 40 40 80 I I I I	0 0 80 100 - - 0 I	80 80 100 100 I I II III
10	0 0 20 20 - - 0 I	0 0 60 80 - - 0 I	100 100 100 100 I I I II	100 100 100 100 I II III III

各区の試料の総切片数は10個であった。
 各区において上段の数字は、カルス形成率を示す。
 $\text{カルス形成率} = \frac{\text{カルスを生じた切片数}}{\text{総切片数}} \times 100(\%)$
 下段の数字はカルスの平均の大きさを示す。
 0 : 微小, I : 厚さ0~1mm, II : 厚さ1~3mm,
 III : 厚さ3~5mm, M : 厚さ5mm以上
 各区の数字の第1列は、4日後、第2列は1週間後
 第3列は、2週間後、第4列は3週間後の結果を示す。

3) カルスの培養(第4,5表)

第4,5表に培養4,8週間後の結果を示す。第4表はNAAとBAの組合せ、第5表はNAAとKiの組合せの結果である。いずれの場合も、茎、葉よりカルスを形成させるときの様子に似ている。カルスの増殖は、オーキシン、サイトカイニン濃度の低い区で不振であり、両ホルモンとも1mg/l以上の区で良好であった。さらに、NAA 10mg/l+サイトカイニン 1mg/l, NAA 10mg/l+サイトカイニン 10mg/lの区において最も良かった(第1図)。



第1図 カルスの増殖. NAA 10mg/l+BA 1mg/lの区で約11週間培養したもの.

第4表でNAA 0mg/l+BA 1mg/l, NAA 0.1mg/l+BA 1mg/l, NAA 1mg/l+BA 1mg/lの区では、カルスの生存率は比較的低い値であるが、生存していたカルスは十分な増殖を示した。カルスからの不定根の再分化は、3週間くらいまでは見られなかったが、4週間後くらいからNAA 10mg/l+サイトカイニン 0~0.1mg/lの区で見られるようになった。6,7週間後では、さらにNAA 1mg/l+Ki 1mg/lの区でも見られるようになった。しかし、サイトカイニン10mg/lの区では、カルスのみで、不定根の再分化は見られなかった。

カルスを培養することにより、不定芽を再生することは、どの区においても、また、12週間を過ぎた段階でも見られなかった。

以上、茎、葉、カルスを16区の培地で培養したときの結果を報告してきたが、材料の如何にかかわら

第4表 カルスの変化 (NAA, BAを含む培地).

NAA BA mg/l	mg/l			
	0	0.1	1	10
0	20	10	20	30 少し発根あり
	0	5	5	5 少し発根あり
0.1	10	10	0	50 少し細毛あり
	5	5	0	50 大カルス, 細毛あり
1	50	30	10	100
	50 大カルス	30 大カルス	10 大カルス	90 大カルス, 発根あり
10	50	0	30	70
	20	0	20	70 大カルス

各区の試料のカルス数は、約20個であった。
 各区の上段の数字は培養4週間後のカルスの生存率。
 下段の数字は培養8週間後のカルスの生存率を示す。

$$\text{生存率} = \frac{\text{生存していたカルス数}}{\text{総カルス数}} \times 100(\%)$$

第5表 カルスの変化 (NAA, Kiを含む培地).

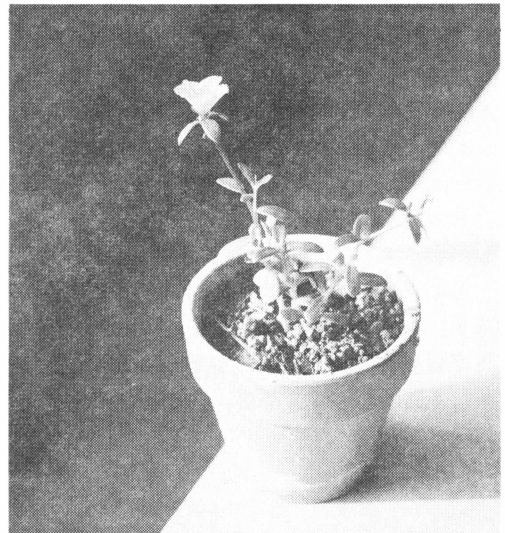
NAA Ki mg/l	mg/l			
	0	0.1	1	10
0	20	10	5	0
	0	5 少し発根あり	5	0
0.1	5	0	0	30
	5	0	0	30 大カルス, 発根あり
1	40 わずかに発根あり	30	60	50
	40 大カルス発根あり	0	60	50
10	10	10	80	90
	5	5	80 大カルス	90 大カルス

各区の試料のカルス数は、約20個であった。
 各区の上段の数字は培養4週間後のカルスの生存率。
 下段の数字は培養8週間後のカルスの生存率を示す。

$$\text{生存率} = \frac{\text{生存していたカルス数}}{\text{総カルス数}} \times 100(\%)$$

教材化についての考察

ハナスベリヒユは、スベリヒユ科スベリヒユ属の一年草であり、野生種のスベリヒユから改良された園芸種である¹³⁾(第2図)。茎、葉はスベリヒユに似ているが、花はスベリヒユよりかなり大きめであり、どちらかというとなつぽボタンに似ている。開花期も6~11月と長く、毎日多数の花を次々とつける。丈夫な植物であり、大変育てやすい。陽当りのよい屋外が最適であるが、窓際などでプランターで育てることも充分可能である。また、土、パーミキュライトへのさし木により簡単に増やすこともできるし、水にさして発根させることも可能である。また、細かい種子を作るので、これにより繁殖させることもできる。



第2図 ハナスベリヒユ.

ず言えることは、カルスを増殖させるのに適した植物ホルモンの組合せは、NAA 10mg/l+BA 1mg/lと、NAA 10mg/l+BA 10mg/lの二つの場合である。このうち、前者はカルスの増殖率も、生存率もよいが、8週間以上を過ぎると、少し不定根の再生が見られた。後者は、不定根の再生は見られないが、カルスの生存率は多少低くなった。

また、不定根を早く確実に得るためには、茎をNAA 1mg/l+BA 0mg/lまたはNAA 10mg/l+BA 0mg/lの組合せの培地で培養するのが良いと言える。

このハナスベリヒユを、植物組織培養の教材として利用する場合のすぐれた点を挙げてみる。

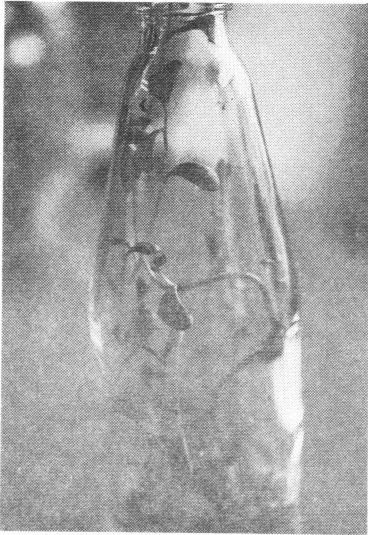
(1) カルス形成が早いこと。茎、葉という扱いやすい材料を培養して、4日後にはカルスが形成されるという早い反応は、生徒実験における教育効果を考えると、大切な性質であると思われる。

(2) 滅菌が容易なこと。70%エタノールに約30秒間、次に20%ビューラックスに15分間浸すだけで、ほぼ完全に雑菌混入を防ぐことができた。生育が旺盛なため、若い植物体であるということと、室内のプランターで育てたため昆虫などに食べられて雑菌が侵入する機会が少ないことなどによるのかもしれない。

ない²⁾。

(3) 茎や葉がメスで切断しやすいこと。キクなどの茎は、固いためにメスなどで切りにくいが、ハナスベリヒユの茎は、少々切れ味の悪いメスでもうまく切断できる。葉も肉厚でしっかりしており、切りやすい。未経験の生徒にも無菌箱の中での操作が行いやすい。

(4) 一度に多量の材料を用意することができること。6月～10月に面白いほど旺盛な成長をするので、いくつかのプランターに植えておけば、多人数の生徒実験を行うのにも十分な量が得られる。



第3図 ハナスベリヒユの器内培養。

(5) 無菌の植物体を得やすいこと(第3図)。節部を含む茎を滅菌して植物ホルモンを含まない培地に置床すると、芽を出し発根してくる。ガラス容器内でよく成長するので、さらに茎の一部を別の容器内に移植することにより、無菌的に増殖させることができる。蛍光灯を取り付けただけの簡易温室内で冬場も増殖させることが可能である。大きめのガラス容器を数個使って培養しておけば、冬の時期にも生徒実験の材料として使うことができる。このようにして得た植物は、もちろん無菌の植物体であるので、生徒実験に使用するにあたって、わざわざ滅菌する必要がなく便利である。

(6) カルス形成、不定根形成と植物ホルモンとの関係がかなりはっきりしていること。つまり、不定根形成はNAA濃度が高く、BA濃度が低い区ほどよく見られる。カルス形成は、NAA、BAがともに

高濃度になったときに著しい。

以上、ハナスベリヒユの長所を挙げてきたが、今までのところカルスから不定芽を再分化させることができていない。これが可能ならば、さらに面白い教材になると思われるので、今後の検討課題とした。

また、今回はMS培地だけを使用した。教育の現場では、より簡便な培地の方が望ましい。ハイポネックスなどを用いた培地でもおそらく培養が可能と思われるので、これも検討してみたい。

摘 要

ハナスベリヒユの茎、葉をNAA、BAなどを含んだMS培地で培養すると4日間という短期間でカルスを形成した。

不定根形成は、NAA濃度が高く、BA濃度の低い培地で顕著であり、カルス形成は、NAA、BAがともに高濃度の培地でよく見られた。不定根形成に適した培地は、MS培地にNAA 10mg/l+BA 0 mg/lを加えた培地であった。カルス形成に適した培地は、MS培地にNAA 10mg/l+BA 1 mg/lあるいは、NAA 10mg/l+BA 10mg/lを加えた培地であった。ハナスベリヒユの組織培養の教材化について考察した。

本稿をまとめるにあたり、県立厚木高等学校長の楠元守先生より貴重なご助言、ご指導を賜りました。深い感謝の意を表します。

引用文献

- 1) 楠元 守・森屋 一・難波純治・高橋節郎. 1989. ポピュラー・バイオテクノロジー(4). 材料として適する植物体の検討. 遺伝, 43(2): 40-45.
- 2) 楠元 守・高橋節郎・森屋 一・難波純治. 1989. ポピュラー・バイオテクノロジー(3). 初代培養にあたっての無菌化処理. 遺伝, 43(1): 72-76.
- 3) 大垣晃一. 1984. 組織培養法による形態形成の指導. 遺伝, 38(3): 17-22.
- 4) 楠元 守・山川 宏. 1988. ポピュラー・バイオテクノロジー(2). 簡単な組織培養法. 遺伝, 42(12): 47-52.
- 5) 渥美茂明. 1984. 植物組織培養への招待. 遺伝, 38

- (3): 7-16.
- 6) 田村純夫. 1987. ムラサキツユクサの培養. 遺伝, 41(2): 11-15.
- 7) 岩見吉三江・後藤伸治. 1990. 植物バイオテクノロジーの基礎実験. 教材生物研究, 13(4): 12-15.
- 8) 近 芳明. 1988. セイヨウタンポポを使った簡易培養実験. 第20回 東レ理科教育賞受賞作品集, 15-18.
- 9) 和田 薫. 1985. 図解組織培養入門(古川仁朗編著). 誠文堂新光社. p. 57.
- 10) 田中信徳・田中隆荘・田中昭男ら. 1991. 高等学校改訂生物. 第一学習社. p. 281.
- 11) MURASHIGE, T., F. SKOOG. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.*, 15 473-497.
- 12) 楠元 守・後 正博・朝倉正海. 1989. ポピュラー・バイオテクノロジー(5). コマツナの組織培養と分化. 遺伝, 43(3): 50-54.
- 13) 肥土邦彦. 1990. ポーチュラカ(ハナスベリヒユ). *NHK趣味の園芸*, 8月号. p. 70.