

# *Crepis capillaris* のカルス 形成と器官形成

矢 沢 静 江

(Received January 6, 1972)

高等植物の各器官を切りとって好適な条件で培養をつづけると、カルス（癒合組織）ができる。さらに培養をつづけると、器官の分化がおこり、葉・茎・根などを形成することがある。これらは培養の条件——とりわけ培地に含まれるホルモン物質等の種類や濃度——によってかなりの変化があり、ある程度までは調節することができる。

クレピス (*Crepis capillaris*) の組織培養については Reinert および Küster (1966), Yoneda (1969), その他の報告があるが、著者も 1967 年に、クレピスのカルスの細胞・形態学的観察についての結果を報告した。本論文においては、その際もっとも成長のよかった培地 VI に修正を加えた合成培地 (第 1 表) を用いて、クレピスの各器官別によるカルス形成および器官形成についての比較観察を行ない、同時にカイネチンの濃度による器官形成の差異についても比較を行なった。この結果、カルス形成および器官形成がもっとも旺盛であったカイネチン 4 ppm の D 培地においた葉の切片について、培養をつづけている間におこる形態的变化を中心に観察を行なった。

## 材料および方法

実験材料として用いたクレピス (*Crepis capillaris* L.) は、わが国に同属の植物の少ない外来種であり、二年生植物である。染色体数が 6 本で核型もかなり安定しているので、細胞遺伝学的研究の材料として広く栽培され、近年組織培養の材料としても使われている。

植物の器官を分離して培養するための材料としては、寒天培地上に無菌で発芽した幼植物を用いた。第 1 図のように同一培地を入れた 3 個の小型シャーレーを中型シャーレーの中に入れ、1 個体 (第 2 図) から各器官 (根・茎・葉) を分離した切片をそれぞれの小型シャーレーの培地上に置いた。そしてカルス形成とその後の分化の状態の比較を行なった。異なった培地を用いての実験には、上記のような中型シャーレー毎に培地条件を変え、4 種類の培地におけるそれぞれの器官からの分化の差異を比較した。

用いた培地の組成は第 1 表に示した。無機塩類は Murashige と Skoog の培地に須田 (未発表) が修正を加えたものを用い、ビタミン・アミノ酸類は前回と同様のものを用い、ホルモン類としては、インドール酪酸 10 ppm を一定にして、カイネチンの濃度のみを 0~4 ppm まで変えた 4 種類の培地を用いた。

カイネチン 4 ppm の D 培地が、どの器官についても好結果を示したので、その後の葉からのカルス形成および器官形成についての実験には D 培地を用いた。なお、この場合には幼植物の葉のみでなく、試験管内でやや生長した葉を主として用い、圃場でのロゼット葉も比較のために用いた。材料植物および切片は約 23°C の恒温箱中で培養した。

第1表 合成培地の組成 (100 cc 中の mg)

1. 無機塩類			
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	165	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.00025
KNO <sub>3</sub>	190	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.62
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	44	MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	2.23
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	37	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1.06
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	17	KI	0.083
Na <sub>2</sub> ·EDTA	3.73	Na <sub>2</sub> M <sub>10</sub> O <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.025
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2.78	CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.00025
2. アミノ酸・ビタミン・その他			
glycine	1.0	L-cystine	0.125
L-asparagine	2.0	nicotinic acid	0.05
L-glutamine	5.0	pyridoxine	0.01
L-tyrosine	4.0	thiamine	0.01
L-lysine HCl	1.56	inositol	10.0
L-arginine HCl	0.78	choline chloride	1.0
L-histidine HCl	0.26	Ca-pantothenate	0.01
L-methionine	1.3	L-ascorbic acid	0.01
L-threonine	1.3	biotin	0.001
L-valine	1.3	flavin	0.01
L-isoleucine	1.04	hypoxanthine	2.5
L-phenylalanine	0.5	kinetin	0~0.4
L-leucine	1.56	indol butyric acid (IBA)	1.0
L-tryptophane	0.4	sucrose	2000.0
L-glutamic acid	1.4	agar	700.0
L-aspartic acid	0.6		
L-proline	0.5		

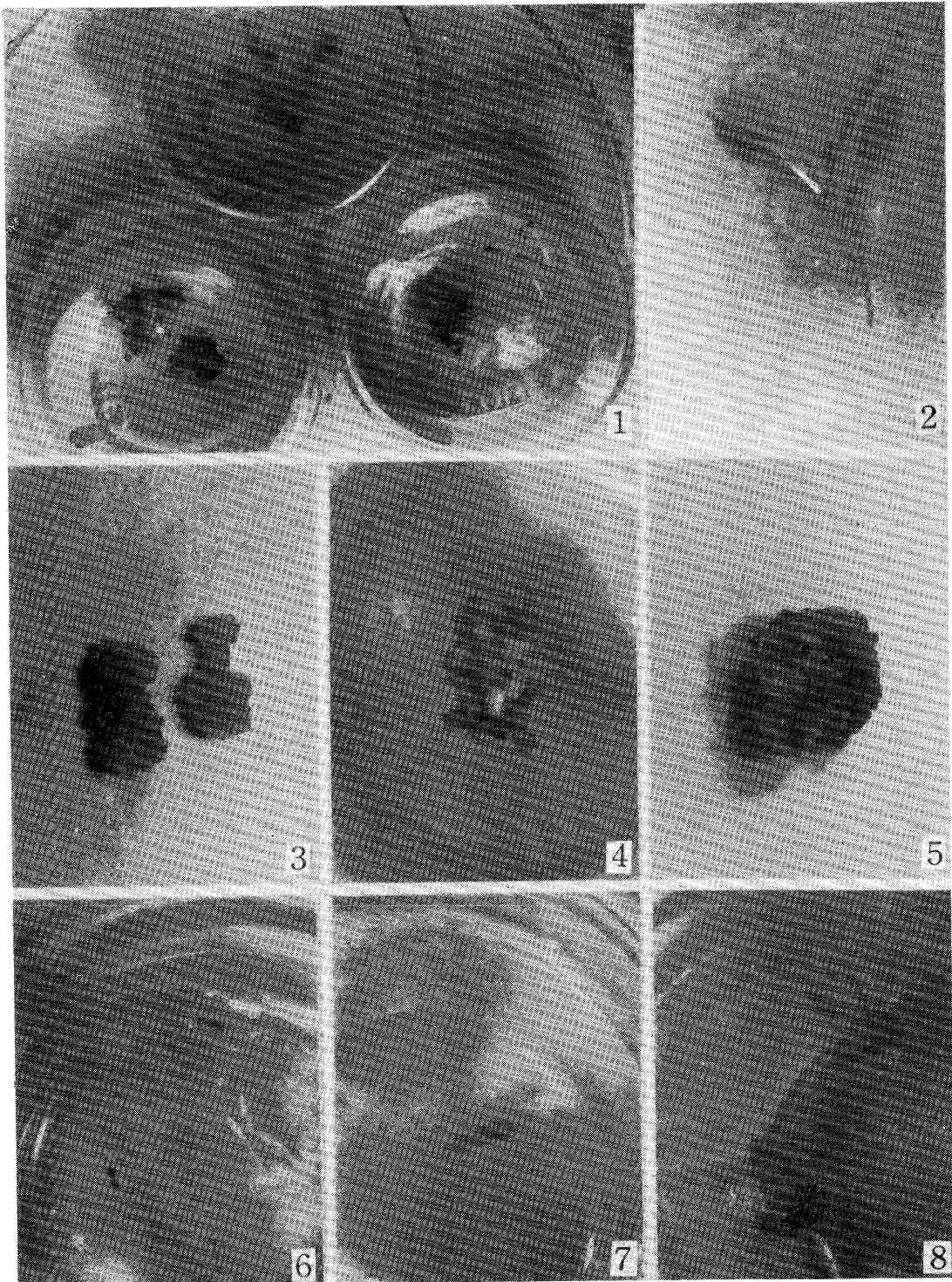
内部形態の観察には、培養組織を固定し、パラフィン法による永久プレパラート、ハンドミクロトーム・おしつぶし法等による一時プレパラートを併用した。固定には主としてホルマリン・酢酸・アルコール混合液 (FAA)、染色にはトルイジンブルー (0.5~1% 水溶液) またはヘマトキシリンとサフラニンを用いた。染色体の観察にはパラフィン法による永久プレパラートと酢酸オルセイン染色による一時プレパラートとを併用した。

### 実験・観察および考察

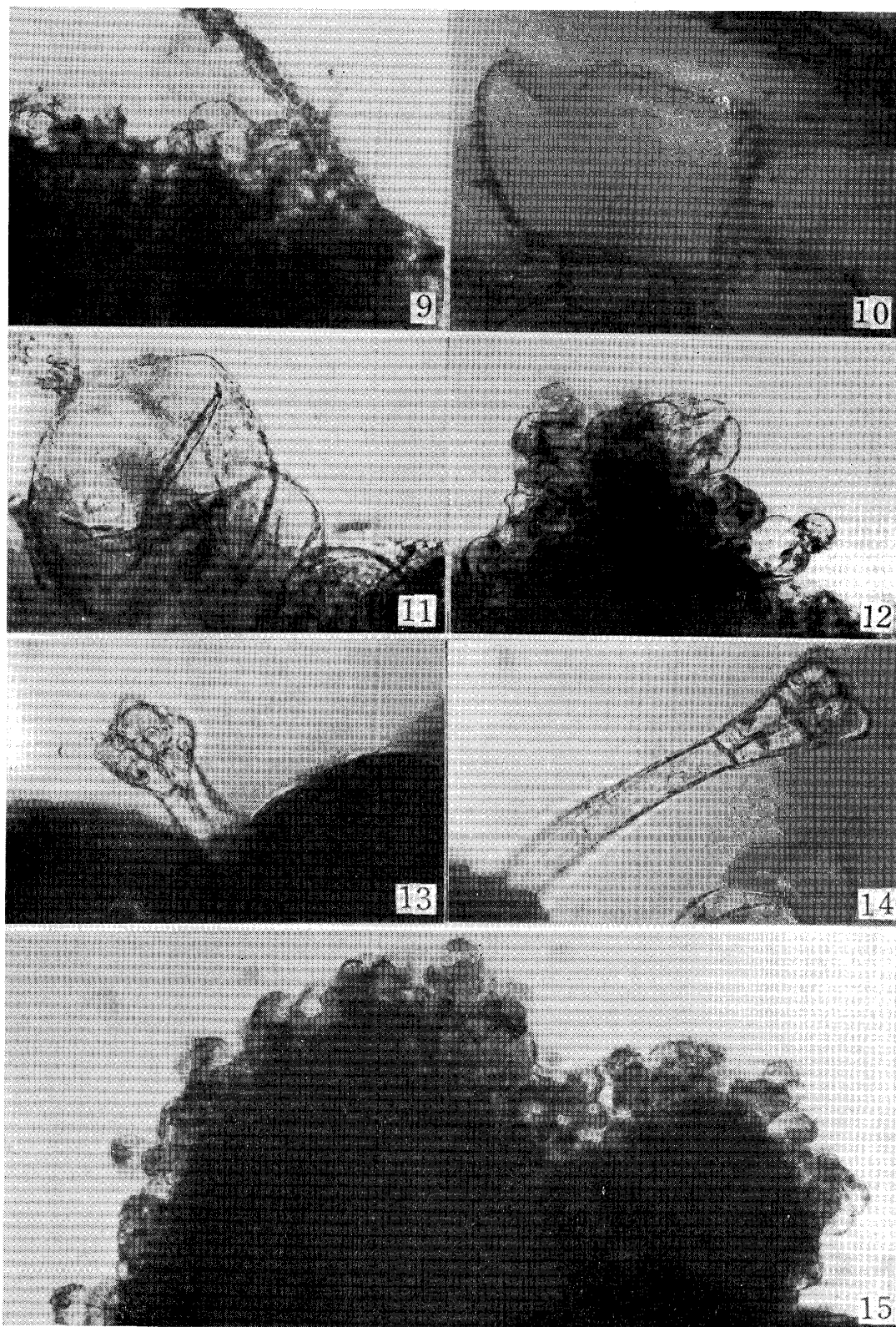
#### 幼植物の器官を分離して4種類の培地を用いた培養

発芽後約1週間の幼植物 (第2図) を切断して、若い葉と茎と根とに分離した。その各片を第1図に示したような中型シャーレー中の3個の同一培地の小型シャーレーに器官毎に置床して培養した。

培地は第1表および方法のところに示した合成培地を用いた。インドール酪酸 10 ppm は一定にし、カイネチンの濃度のみを変えた培地4種類は、カイネチンを加えないものをA培地、カイネチンを 0.04 ppm・0.4 ppm・4 ppm 加えたものを、それぞれ B・C・D 培地とした。材料植物および切片の培養は約 23°C の恒温器中で行なった。



第1～8図. 第1図, D培地の3個の小型シャーレーに器官別に培養されたカルス(培養後39日) ×1 第2図, 試験管内で発芽した幼植物 ×1.3 第3～5図, D培地のカルス(39日) ×2.5 第3図, 根. 第4図, 茎. 第5図, 葉. 第6～8図, C培地上のカルス(39日) ×2.5 第6図, 根. 第7図, 茎. 第8図, 葉.



第9~15図. D培地に置いた葉からのカルス. 徒手切片による. 第9図, 表皮の下のカルス. (培養後7日)  $\times 100$  第10・11図, 表面にできたカルス. (7日)  $\times 400$   
 第12図, カルスの表面の細胞. (15日)  $\times 160$  第13・14図, カルスの表面にできた毛状体. (15日)  $\times 270$  第15図, 凹凸の多いカルスの断面. (15日)  $\times 100$ .

得られた結果の概略は第2表に示した。即ち、A・B培地ではほとんどいずれの器官でもカルス形成は認められず、僅かにB培地に置かれた根で69日目にカルス形成が認められるのみである。葉では表面に僅かにカルス形成が認められる程度である。CおよびD培地ではいずれの器官でもカルス形成が認められる。39日目のC・D培地における各器官からのカルス形成の外形は第1図および第3～8図に示した。第1図および第3～5図はD培地を用いた培養で、根からのカルスは両端の切り口からカルス形成が進み、細い部分を除いてはほとんどうす茶色のカルスの塊になっている。茎と葉からのカルスでは根からのカルスに比べて、カルス形成もより旺盛であり、黄色・うす茶色のカルスの他に、緑色・うす緑色・白色等のカルスも見られ、さらに器官分化も進み、39日目には、小さな葉状体がカルスの表面に見られる。とりわけ葉から形成されたカルスには葉状体が数多く認められる(第5図)。

第2表 各器官からのカルス形成および葉状体の形成

器官	培地	カルス形成			葉状体形成日
		34日	39日	69日	
葉	A	-	-	-	-
	B	-	-	-	-
	C	+	++	++	-
	D	+++	+++	+++	+++
茎	A	-	-	-	-
	B	-	-	-	-
	C	+	+	+	-
	D	+	++	++	++
根	A	-	-	-	-
	B	-	-	+	-
	C	+	+-	+	-
	D	+	++	+++	-

C培地での培養(第6～8図)では、根からのカルス(第6図)の切り口に僅かにカルス形成が認められ、茎からのカルス(第7図)には切り口と表面にカルス形成が認められる。葉からのカルス(第8図)には切り口に塊状のカルスが見られる。

以上の培養からカイネチンの濃度4ppmのD培地が、どの器官に対してもカルス形成を旺盛にすることに効果的であった。また葉状体の形成にも効果的であった。しかし、根からのカルスには葉状体や根状体の形成はまったく見られなかった。葉からのカルスは、もっともカルス形成が盛んで、また葉状体の形成も多かった。なお葉や茎のカルスの表面から上方または側方に向って気根のように突出した根状体はしばしば見られたが、培地中への発根はかなりおそくないと行なわれなかった。

葉の切片からのカルス形成と器官形成

幼植物の器官を分離して4種類の培地で培養した結果から、その後の培養にはカルス形成と器官形成のもっとも旺盛だった葉の切片を主として用い、またカルス形成と器官形成に効果を示したカイネチン4ppmのD培地を用いた。前記の実験に用いた材料は、発芽後間もない幼植物の葉であったが、試験管内で数cmに育った植物の葉、畑にあるロゼット葉等を幼植物の葉と比較のために同じくD培地で同時に培養した。外観上の観察結果では、出芽時の大きさのちがいはあっても、いずれもカルス形成とその後の器官形成の経過においてはほとんど類似していた。試験管内の葉からのカルス(第17図)はカルス形成も比較的早く、またその後の器官形成も早く、33日目には大きな葉が沢山見られた。ロゼット葉からの19日目のカルス(第16図)では、葉面が一部そのまま残存しているかのように、葉より濃い緑色のカルスが淡黄色のカルスの間に見られた。

第18図は幼植物の葉からの10日目のカルスであり、全体にうす黄色にカルス化して

第3表 葉の切片からのカルス形成  
と器官形成 (D培地)

日 数	カルス 形 成	葉	根	備 考
7 日	+			表面・切断面等にカルス形成
10 日	+			内部にもカルス形成・毛状体
15 日	++			
19 日	++	+		小さな葉状体・根状体
34 日	+++	+		染色体の変化・発根
39 日	+++	++	+	
45 日	+++	++	++	中型の葉
69 日	+++	+++	+++	大型の葉
90 日	+	++++	+++	蕾の形成

でもカルス化が進み、外部形態的観察において凹凸が顕著に認められる (第 12・13・15 図)。葉からのカルスの横断面の観察によれば、葉の内部の組織は大部分変化を生じ、カルス化して表面に向かって山型に突出している (第 12 図)。さらにその表面は大きなカルス細胞でほとんどがおおわれている (第 12・15 図)。巨大細胞がそこそこに見られるが、既に隔膜で二分された細胞、さらに分裂して 3 細胞になったもの、あるいは数細胞のカルス集団等が認められる (第 12・15 図)。15 日目の切片で毛状体 (第 13・14 図) が認められたが、これについてはまた後で述べる。

19 日目のカルスには表面に小さな葉状体が見られる。これらははじめ根状体と区別がつかないように針状に見えるが、先端が緑色になり次第に大きく扁平状にはなるが、51 日目の観察でも葉脈が不完全で異常である (第 21~24 図)。また、水分を多く含んだ半透明状の葉が屢々見られ、それらは葉の側面や表面などにカルス細胞が多くて (第 23 図) 正常の葉とは異なっている。

正常の葉に近い構造のものは、後になって現われるが、細長くなった葉柄の基部は少しふくれてカルス塊の表面につづいている (第 24 図)。また根状体もカルスの表面にあらわれ、その中の一部は気根のように突出している (第 20 図)。これらは構造上ほとんど根といえる程、中央にはっきり導管のできている場合が多く (第 26~28 図)、それらの基部はやはりカルスの表面につづき、カルス塊の中で通導組織が終っている (第 28 図)。

第 25 図は、葉状体や根状体のでている 51 日目のカルス塊の一部を押しつぶした細胞群である。巨大細胞や細長い細胞がゆるい結合をしていることが認められる。

#### 発 根 と 着 花

カルスからの発根については 1967 年の論文で多少ふれたが、その時の材料と培地の条件では根の切片の切り出しから 4~8 か月頃に発根しやすく、それは小型細胞が増加する時期であり、さらにまた壁の肥厚した細胞の増加する時期であった。それ以外には稀にしか発根していない。今回の実験観察でも、根からのカルスについていえば、2 か月以上の

いる。

用いた材料やわずかな条件のちがいで多少の差はあるが、D培地においた葉からのカルス形成および器官形成についての概略を第3表に示した。

D培地上に置いた葉の切片は7日目で既に表面にカルス形成が認められる (第 9~11 図)。マイクロームによる永久プレパラートと併行して、シリンダーマイクロームを用いての徒手切片の一時プレパラートで観察を行なった。カルス細胞は、1) 表皮細胞の下側の細胞からつくられる場合 (第 9 図)、2) 切断面につくられる場合、3) 表皮細胞からつくられる場合 (第 10 図) 等がある。15 日目の観察では、葉の表面のみでなく、さらに内部

培養期間中に発根は見られなかった。但し、葉の切片からのカルスでは 19 日目頃から前述のような小型の根状体 (第 19・20 図, 第 26~28 図) が認められ, 39 日目には培地への発根が認められる。培地中へはかなり日数がたたないと発根しなかったのである。「カイネチンの濃度 0.5 ppm が発根に最適」と米田 (1969) が指摘していることを考えると, この場合はカイネチン濃度が極度に高いために発根が阻害されており, 気根という形でしか初期には発根しないのだと考えられる。

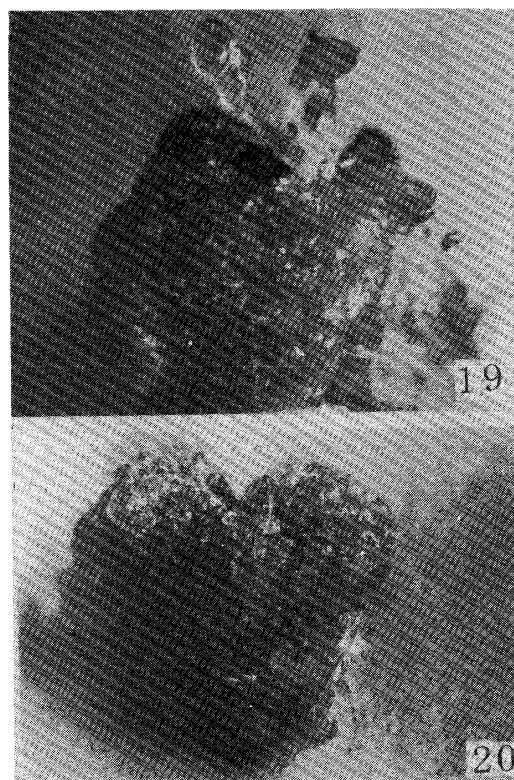
このカルスはさらに葉も根も発達して地上 2~3 cm の植物体になり, 時により試験管内でも 90 日頃に蕾の形成が認められた。しかし管理不行き届きのために開花に至らず枯死させてしまった。なお種まき培地 (ホルモン・ビタミン等のないもの) で種子から育てた個体はやはり約 75 日で開花している。

### 毛 状 体

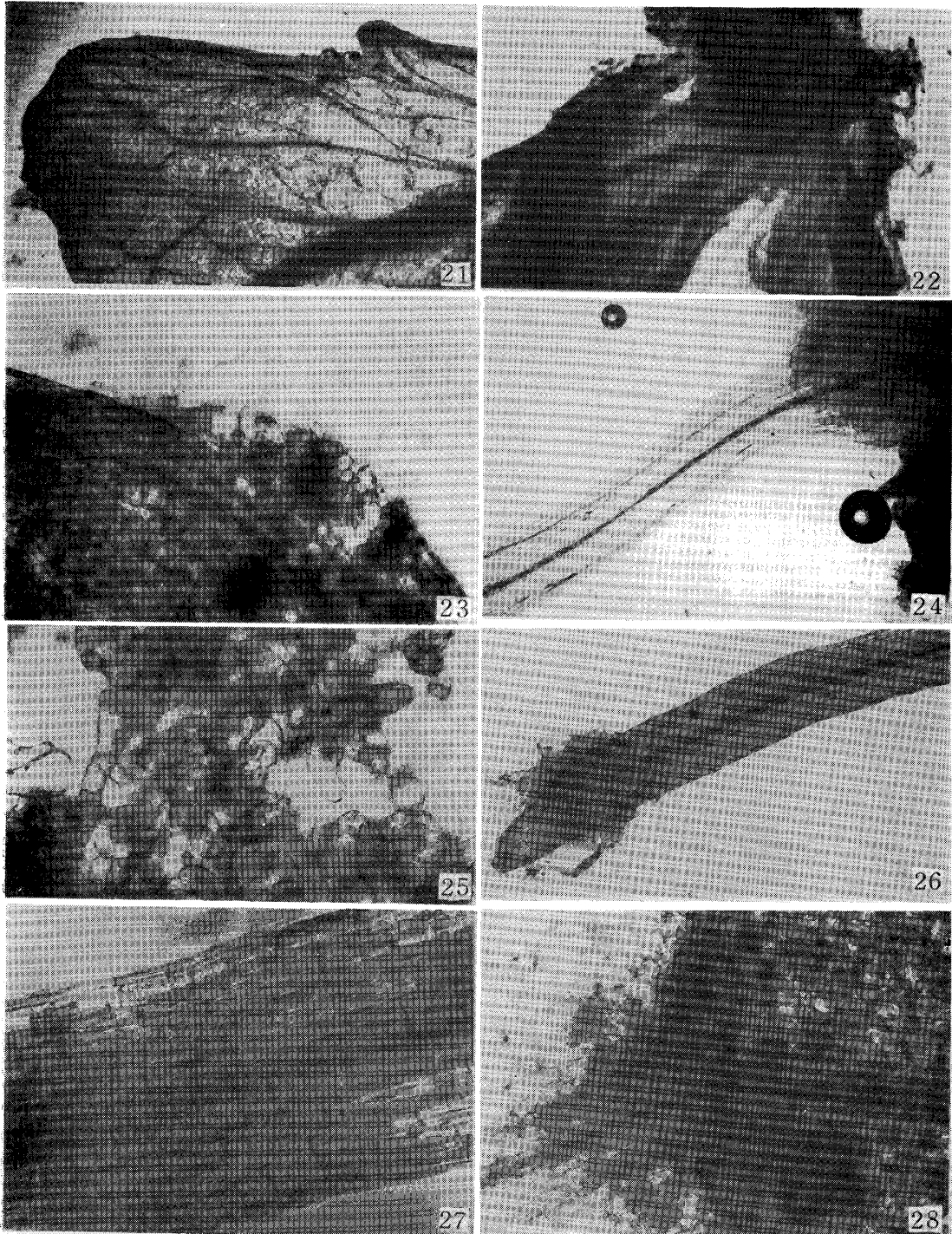
葉からのカルスの 15 日目の切片に毛状体が見られたことは既に述べた。これは, 先端が 5~8 細胞からなる有柄の毛状のものでカルス組織の表面から突出している (第 13・14 図)。柄の長さや形態は多様である。これらの基部はカルス化した組織の表面の細胞につ



第 16~18 図. 葉からのカルス. ×2 第 16 図, ロゼット葉からのカルス. カルスの黒く見える部分は濃い緑色. (19 日). 第 17 図, 試験管内の葉からのカルス. 白く突出しているのは主として葉状体 (19 日). 第 18 図, 幼植物の葉からのカルス (10 日).



第 19・20 図. 葉からのカルス. 葉状体や根状体が見られる. 第 19 図, 46 日. 第 20 図, 51 日. 上方に根状体が突出している. ×3.



第 21~24 図. カルスにできた葉状体. (51 日). 第 21 図, 不規則な葉脈をもつ葉状体.  $\times 15$   
 第 22 図, 葉状体の基部.  $\times 15$  第 23 図, 側面に見られるカルス.  $\times 40$  第  
 24 図, 葉柄の発達した葉状体の基部.  $\times 15$ .  
 第 25 図. 基部の付近に見られるカルス細胞群.  
 第 26~28 図. 根状体. 第 26 図, 先端部.  $\times 40$  第 27 図, 中央に通導組織ができている.  
 $\times 150$  第 28 図, 基部. 通導組織はカルスの中で終わっている.  $\times 40$ .



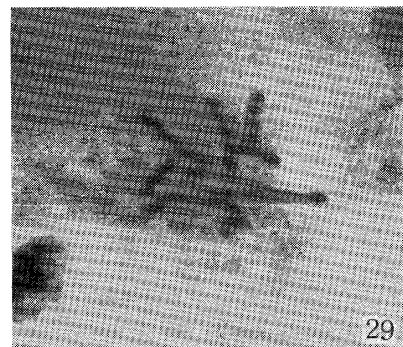
づいている。対照のために正常な葉の表面を観察した結果では、やはり表皮細胞から突出している多細胞の毛が認められるが、カルスに見られた毛状体とは形態的な差異がいちじるしい。しかし、試験管内で育てた幼植物の葉の毛は形態的にカルスの毛状体と類似点がある。前述のカルス表面に直接に突出していた毛状体とほとんど同じものは、やはり葉からのカルスの表面にでていた小さな葉状体の表面に見られた。結局このカルス表面は15日目には毛をつくり出すことができ、それはごく初期の葉状体につくられるのと同じ毛がつくり出されているのではないかと考えられる。

#### 染色体の変異

クレピス (*Crepis capillaris*) の染色体は体細胞で6本であり、かなり安定した核型を示している。材料として用いたクレピスは、長期にわたって圃場で代々栽培し、しばしば根端および花粉母細胞で染色体を観察したが、異常は認められなかったものである。クレピスの根から生じたカルスの細胞分裂を1967年に観察した際の結果では、中型細胞群で内容物の充実した細胞に分裂像が多く見られた。なお、培養中にしばしば染色体の観察を行なったが、2,4-D イースト培地の培養において、カルス形成から13か月までは、つねに6本の染色体数を示し、分裂時の異常も見られなかった。17か月目の観察ではじめて染色体数の倍加が認められ、6本(2n)の正常なものが10%、12本(4n)のもの74%、24本(8n)またはその附近の染色体数を示す細胞が16%であった。

今回は、第1表に示した合成培地を使用しているが、39日目の観察で根からのカルスに染色体の倍加化が認められた(第29図)。また無菌で育てた葉からのカルスでは、直径2mm程の白い塊状のカルスの押しつぶし法による39日目のカルスの観察で、いちじるしい染色体変異が認められた。即ち、観察された分裂細胞の中で染色体数が6本(2n)の正常なものは10%であり、12本(4n)のもの70%、13本以上の染色体数を示す細胞は20%であった。

既にのべたように、クレピスの染色体は6本で通常核型も安定している。前回の観察によれば、一般に染色体変異をおこしやすいとされているイースト・2,4-D培地での培養においても13か月までは染色体変異が認められなかったのである。また、ReinertとKüster(1965)もクレピスのカルスから安定した6本の染色体数を報告している。今回は合成培地で培養した根からの39日目のカルスに染色体の倍加が認められ、また葉からのカルスでは正常の染色体数のものは僅か10%しか見られず倍加またはそれ以上の染色体数のものが認められた。概して合成培地の場合にはイースト・2,4-D培地より染色体変異をおこしにくいと考えられていたが、実際には、この場合のほうがかえって変異が大きくなっている。これは合成培地中の何れかの物質の影響であろうが、カイネチンの高濃度の影響とも考えられる。しかし、その結論は今後の詳細な比較実験にまたねばならない。



第29図. 根からのカルスの染色体. 染色体が倍加している。(培養後39日).  $\times 1700$ .

## 摘 要

1. 試験管中で発芽させたクレピス (*Crepis capillaris*) の幼植物から、器官——葉・茎・根——を分けて培養し、カルス形成およびその後の分化を比較した。いずれにも、カルス形成が見られたが葉の切片はカルス形成がもっとも顕著であった。その後、葉・茎からのカルスでは葉が分化したが、根からのカルスからは葉の形成が認められなかった。

2. さらにカイネチンの濃度のみを変えた4種類の培地を用いて、葉・茎・根の培養を行なったが、いずれの器官からのカルス形成およびその後の分化に対しても、カイネチンを4 ppm 加えたD培地がもっとも効果的であった。

3. つぎにカルス形成の顕著だった葉の切片を用い、効果の多かったD培地を用いて培養し、カルス形成およびその後の器官形成について外部形態および内部形態の観察を行なった。カルス細胞は切片を培地においてから7日目でかなり多く見られるが、そのカルス細胞は、葉の表皮細胞からつくられること、表皮細胞の下にある細胞からつくられること、また葉の切断面からつくられることが観察された。17日目には葉の組織全体に変化がおり、カルス集団や生長点様の組織がそここにあらわれる。その後、カルス集団や生長点様の組織などから分化がおり、葉状体や根状体がカルスの表面に形成される。

4. 葉状体は発達して葉を形成した。発根は39日目以後に見られた。さらに培養をつづけると約90日で蕾をつけたが管理不行き届きのために開花に至らず枯死してしまった。

5. カルス化した葉片の表面の細胞から、先端が数細胞からできている毛状体を形成することが、15日目の固定切片で認められた。

6. 合成培地を用いた培養において、39日目で根からのカルスに染色体数の倍数化が認められた。葉からのカルスにおいては、さらにいちじるしい染色体変異が見られた。即ち染色体の6本(2n)の正常なもの10%、12本(4n)のもの70%、13本以上の染色体数のもの20%であった。

## 文 献

- 1) Murashige, T. and Nakano, R., (1965) Morphogenetic Behavior of Tobacco Tissue cultures and implication of Plant Senescence. Amer. Jour. Bot. 52:819.
- 2) Reinert, J. and White, P. R., (1956) The cultivation in vitro of Tumor Tissues and Normal Tissues of *Picea glauca.*, Physiol. Plant. 9:177.
- 3) Reinert, J., (1962) Morphogenesis in plant tissue cultures., Endeavour. 21:85.
- 4) Reinert, J. und Küster, H.-J., (1966) Diploide, chlorophyllhaltige Gewebekulturen aus Blättern von *Crepis capillaris* (L.) Wallr. Pflanzenphysiol. 54:213.
- 5) 竹内正幸, (1964) 組織培養と形態形成, 植物生理. 4:14.
- 6) Wetmore, R. H., and Rier, J. P., (1963) Experimental induction of vascular tissues in callus of Angiosperms., Amer. Jour. Bot. 50:418.
- 7) 矢沢静江, (1967) *Crepis capillaris* のカルスの細胞・形態学的観察, 植物学雑誌. 80:413.
- 8) 矢沢静江, (1968) ニンジンのカルスの形態学的観察, 東京女子大学創立五十周年記念論文集 自然科学編.
- 9) Yoneda, Y., (1969) Organ Formation in Cultured Leaf Blades of *Crepis capillaris.*, Bot. Mag. Tokyo 82:971.
- 10) Yoneda, Y., (1969) Histological change in isolated *Crepis* leaves cultured in vitro. The Reports of the Department for Liberal Arts, Shizuoka University, (Sciences), No 5.

## The Callus and Organ Formation of *Crepis capillaris*

Shizue Yazawa

### Summary

1. The organs—the leaf, the stem and the root of *Crepis capillaris* were separately cultured for the comparison to be made between their callus formation and the later differentiation.

The callus formation was found in all of them—most remarkably in the culture of a leaf blade.

The leaf formation was to be seen both in the culture of the leaf and the stem, but not in that of the root.

2. The only difference in four media used for the culture was in the amount of kinetin. The medium D containing 4 ppm of kinetin—that is the largest amount of all—proved to be most effective both on the callus formation and its later differentiation.

3. A fragmented leaf was cultured on the medium D for observation of callus formation and its later organ development—for this the morphological observation was made internally as well as externally.

Seven days after the fragmented leaf was placed on the medium D, a number of calluses were seen originating out of the surface tissue cell as well as out of those beneath the surface and out of those on the face where the cut was made.

In seventeen days' time, it was apparent that all tissues of the leaf were affected.

The concentration of calluses, and the new tissues suggestive of some growth were seen everywhere. Gradually callus differentiation took place and the leaf-like thing and the root-like one came into being.

4. A leaf-like thing formed a leaf. A root developed after 39 days had passed. It took about 90 days for a bud to grow and it did not live to bloom.

5. It was noted that in 15 days' time a hairy substance consisting of several cells at its pointed end sprang out of the surface tissue cells on the face of the cut in the leaf.

6. As for the chromosomes, with the 39 day-old culture on the compound medium the root callus showed double the ordinary number of chromosomes. The leaf callus showed greater aberation. The result was: 70% was 12 (4n), 20% 12 and only 10% was ordinary 6 (2n).