

ニホンナシ子葉からの不定芽 再生に及ぼす要因

伴野 潔・田村文男*・田辺賢二*

信州大学農学部 園芸生産利用学講座

Factors Affecting Shoot Regeneration from Cotyledons of Japanese Pear

Kiyoshi BANNO, Fumio TAMURA and Kenji TANABE

Division of Horticulture and Food Economics,
Faculty of Agriculture, Shinshu University

Summary

Several factors affecting regeneration from cotyledons of Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* NAKAI) were investigated. Shoots from cotyledons were easily regenerated on the medium containing NAA at 0.1-0.5 mg/l and BA at 1-5 mg/l. On the other hand, adventitious roots were easily regenerated on the medium containing NAA at 1-5 mg/l and BA 0.1-0.5 mg/l. Among the auxins tested, NAA at 0.1 mg/l was the best for shoot regeneration. Moreover, higher percentage of shoot regeneration was obtained by the addition of sucrose at 0.1 M and under 16 hour photoperiod. Frequency of shoot regeneration was greater in the adaxial side of cotyledon than in the abaxial side. Observation by a scanning electron microscope showed that these shoots were directly regenerated from the epidermal cells near the cut surface of cotyledons.

(Jour. Fac. Agric. Shinshu Univ. 29: 13-19, 1992)

Key words: Japanese pear, regeneration, tissue culture, ニホンナシ, 再生, 組織培養

緒 言

これまで数種の果樹において、各器官からの植物体再生例がいくつか報告されているが、ニホンナシに関してはほとんどなされていない。ニホンナシにおいても、将来、プロトプラスト、細胞、カルス等のレベルで細胞育種を行うためには、再生効率の高い培養系を確立しておく必要がある。

*鳥取大学農学部

1992年4月30日 受付

そこで、本研究では、安定して再生効率の高いニホンナシの培養系を確立する目的で、葉や根に比べて不定芽再生が比較的容易な子葉を外植体として用い、不定芽再生に及ぼす種々の要因について検討した。

材料及び方法

1. 供試材料及び培養方法

低温貯蔵したニホンナシ‘二十世紀’果実から種子を取り出し、70%エタノールで12分間、0.1% Tween-20を加用した1%次亜塩素酸ナトリウムで15分間、それぞれ滅菌し、滅菌水で5回洗浄した。これらの種子から種皮を取り除いた後、胚軸側3分の1程度メスで切除し、残りの子葉部分を向軸側が培地と接するように、2分の1の濃度の Murashige & Skoog 培地⁴⁾に植え付け、25°C、16時間日長、2300lux で35日間培養後、発生した不定芽、不定根、カルス形成程度を調査した。なお、培地に添加した糖は、基本的に3%シュクロース(約0.18M)とした。また、いずれの処理区とも20~24枚の子葉を用いて調査した。

2. ホルモンの濃度と組合せの影響

不定芽及び不定根の再生に及ぼすオーキシシンとサイトカイニンの濃度とこれらの組合せの影響について検討した。オーキシシンとして α -naphthaleneacetic acid (NAA) を用い、0, 0.01, 0.1, 0.5, 1, 5mg/l の濃度で、また、サイトカイニンとして6-benzyladenine (BA) を0, 0.1, 0.5, 1, 5mg/l の濃度で用い、それぞれ30通りの組合せについて調査した。

3. オーキシシンの種類と濃度の影響

不定芽再生に及ぼすオーキシシンの種類と濃度の影響について検討した。オーキシシンとして、NAA, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 3-indolebutyric acid (IBA), 3-indoleacetic acid (IAA) 及び β -naphthoxyacetic acid (NOA) の5種類を用い、濃度はそれぞれ0.01, 0.1, 0.5mg/l の3段階とした。なお、サイトカイニンとしてBAを1mg/lの濃度で添加した。

4. 糖の種類と濃度の影響

不定芽再生に及ぼす糖の種類と濃度の影響について検討した。培地に添加する糖類として、シュクロース、ラクトース、グリセロールの3種類を用い、濃度は0.1及び0.2Mの2段階とした。なお、培地にはNAA 0.1mg/l及びBA 1mg/lを添加した。

5. 光の影響

不定芽再生に及ぼす光条件の影響について検討した。光条件として、全日長、16時間日長及び暗黒のそれぞれの条件下で子葉を培養した。なお、培地にはNAA 0.1mg/l及びBA 1mg/lを添加した。

6. 品種間差異

低温貯蔵した‘新水’、‘幸水’、‘豊水’及び‘二十世紀’の果実から取り出した種子由来の子葉を1.と同様に調整し、供試した。培地にはNAA 0.1mg/l及びBA 1mg/lを添加した。

7. 子葉の置床方向及び不定芽発生部位

子葉の置床方向として、子葉の背軸側が培地と接するように置床(子葉の表面を上)に置

床), 子葉の向軸側が培地と接するように置床 (子葉の裏面を上)に置床, 子葉の切断面を上にして垂直に置床する通りの置床方向で検討した。また, 葉条発生が肉眼的に認められる培養15日後の子葉を FAA で固定し, 常法に従って上昇エタノール系列で脱水し, 臨界点乾燥後, 白金で蒸着し, 走査型電子顕微鏡 (日立 X-650型) で不定芽発生の様子を観察した。

結果及び考察

1. ホルモンの濃度と組合せの影響

不定芽及び不定根の再生に及ぼす NAA と BA の濃度と組合せの影響について検討した結果を Fig. 1及び Fig. 2に示した。

一般に, 不定芽はオーキシシンに対するサイトカイニンの量比が高い場合に形成されやすく,

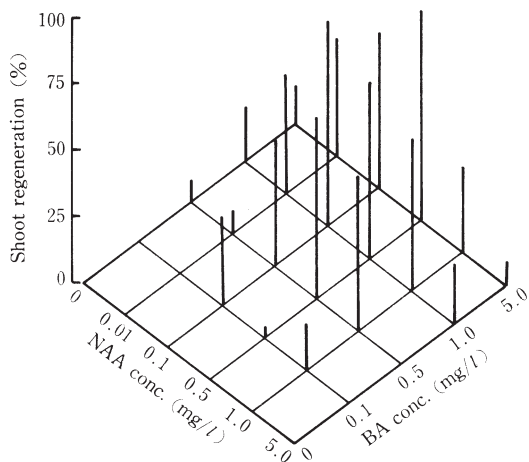


Fig. 1. Effect of NAA and BA on shoot regeneration from cotyledons of 'Nijisseiki'.

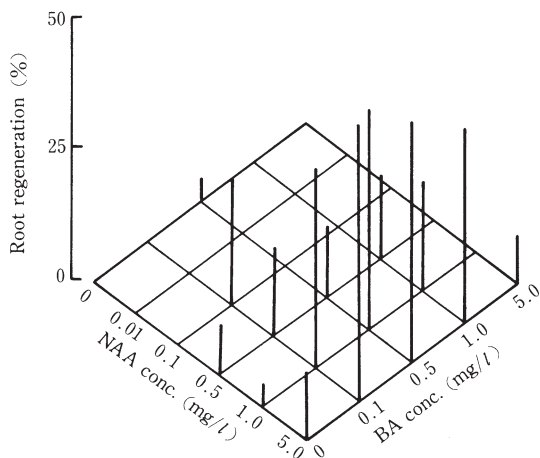


Fig. 2. Effect of NAA and BA on root regeneration from cotyledons of 'Nijisseiki'.

NAA 0.1~0.5mg/l と BA 1~5mg/l の組合せで高い再生率が得られた。とくに、NAA と BA の量比、NAA/BA 比は0.1が最適であった。これに対し、不定根はオーキシンに対するサイトカイニンの量比が低い場合に形成されやすく、NAA 1~5mg/l と BA 0.1~0.5 mg/l の組合せで高い再生率が得られ、NAA/BA 比は10~50が最適であった。また、オーキシンとサイトカイニンの量比が等しい場合には不定芽と不定根が同時に分化する傾向が認められた。

このように、ニホンナシ子葉の器官分化にはオーキシンとサイトカイニンが必須で、これらの量と相対濃度によって分化の方向が決定されるものと考えられる。

2. オーキシンの種類と濃度の影響

不定芽再生に適したオーキシンの種類と濃度を検討した結果、NAA を0.1mg/l の濃度で添加した場合、最高の不定芽再生率が得られた (Fig. 3)。これに対し、2,4-D ではカルス形成が著しく、不定芽はほとんど形成されず、分化した葉条も奇形が多く認められた。また、不定芽再生に及ぼすオーキシンの最適濃度は種類によって異なり、2,4-D と IBA では0.01 mg/l, NAA では0.1mg/l, IAA と NOA では0.5mg/l であった。これらのオーキシンのうちでも、IAA は一般に被分解性が高いことから、さらに高濃度についても検討する必要があるかも知れない。

3. 糖の種類と濃度の影響

不定芽再生に適した糖の種類と濃度を検討した結果、0.1M のシュクロースを添加した場合、不定芽再生率、外植片当りの葉条数がともに秀れていた (Table 1)。0.1M の濃度のラクトース添加によっても比較的高い不定芽再生率が得られたが、グリセロールはいずれの濃度でも不定芽形成と著しく抑制した。これまで、各器官から不定芽を再生させる場合、糖の種類や濃度についてはほとんど検討されておらず、標準的な3%シュクロース (約

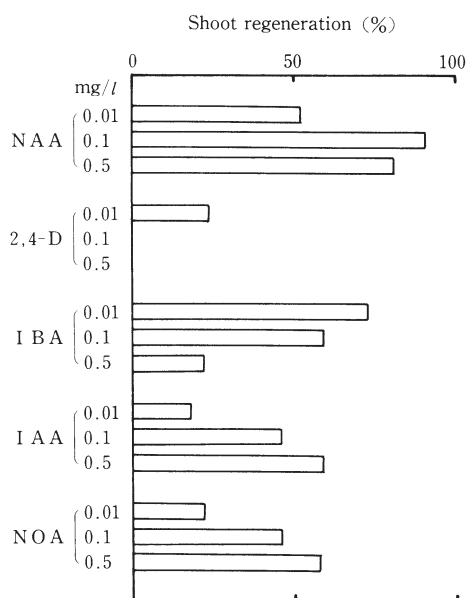


Fig. 3. Effect of different auxins on shoot regeneration from cotyledons of 'Nijisseki'.

Table 1. Effect of different sugars on regeneration from cotyledons of 'Nijisseiki'.

Sugar		Callus (%)	Shoot regeneration(%)	No. of shoots / explant	Root regeneration(%)
Sucrose	0.1M	83.3	95.8	7.8	4.2
	0.2	100.0	84.0	5.3	0
Lactose	0.1	64.0	84.0	7.3	4.0
	0.2	70.8	50.0	4.6	4.2
Glycerol	0.1	45.8	45.8	2.1	0
	0.2	75.0	58.3	2.5	0

Table 2. Effect of light conditions on regeneration from cotyledons of 'Nijisseiki'.

Light condition	Callus (%)	Shoot regeneration(%)	No. of shoots / explant	Root regeneration(%)
16h	85.0	80.0	9.3	5.0
24h	65.0	55.0	5.8	0
Dark	100.0	60.0	5.0	10.0

0.18M) が用いられている。糖の濃度については、さらに詳細に検討する必要があるが、不定芽を再生させる場合、一般的に用いられる濃度よりも低い方が適しているものと考えられる。増田ら³⁾も、リンゴ葉外植片からの不定芽形成は糖濃度が高くなるほど抑制され、0.088 M の濃度で最も良好な結果が得られたと報告している。Hidaka ら¹⁾は、カンキツ細胞の分化・脱分化が糖類あるいはその関連物質で自由に制御できることを報告し、これらの効果は直接的に作用するのではなく、植物ホルモン等の代謝系に間接的に影響するのであろうと考察している。

4. 光の影響

不定芽再生に及ぼす光条件の影響について検討した結果、16時間日長下で最も再生率が高かった (Table 2)。これに対し、全日長下では最も不定芽再生率が低かった。また、暗黒下

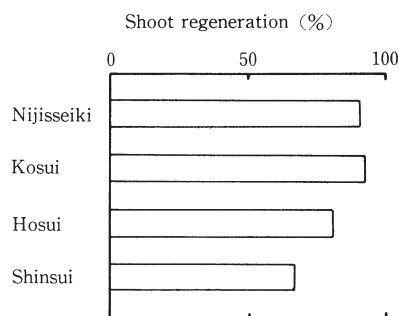


Fig. 4. Cultivar differences of shoot regeneration from cotyledons.

ではカルス形成が著しく、不定根の分化も認められた。これらの結果から、不定芽の分化には暗期が、また、葉条の発育には光が必要であるものと考えられる。

5. 品種間差異

Fig. 4に示すように、供試したいずれの品種においても60%以上の不定芽再生率が得られた。‘二十世紀’、‘幸水’では再生率が90%以上と高く、逆に、‘新水’では低かった。‘新水’は比較的フェノール様物質が溶出し、培地が褐変しやすく、フェノール物質が不定芽形成を阻害したのかも知れない。

6. 子葉の置床方向と不定芽発生部位

不定芽再生に及ぼす置床方向の影響について検討した結果、Table 3に示すように、再生率に差異はみられなかったが、不定芽の発生部位に差異が認められた。子葉の表面を上に乗床した場合は、子葉切断面にカルスが形成され、この付近の両側から不定芽が発生した。これに対し、子葉の裏面を上にして置床した場合は、カルス付近の向軸側から大部分の不定芽

Table 3. Effect of orientation of cotyledons in contact with medium on regeneration.

Orientation	Callus (%)	Shoot regeneration (%)	No. of shoots / explant	Portion of shoot regeneration(%)			Root regeneration (%)
				Adaxial	Abaxial	Others	
Adaxial	77.8	88.9	9.9	71.7	26.4	1.9	16.7
Abaxial	72.2	88.9	8.6	96.3	3.7	0	5.5
Vertical	100.0	88.9	8.0	60.2	25.0	14.8	27.8

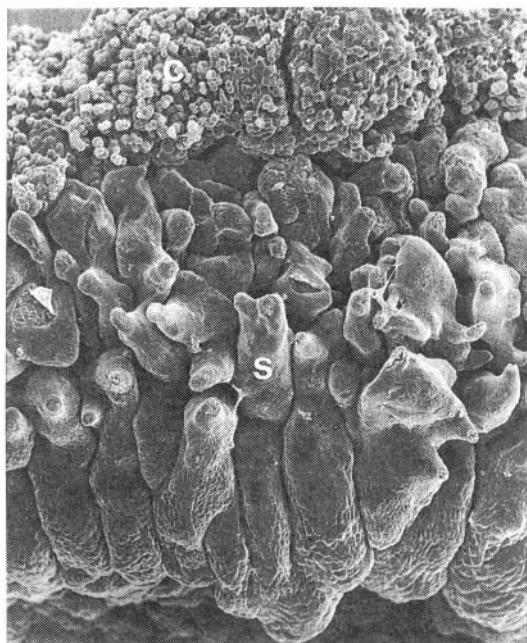


Fig. 5. Shoot regeneration from epidermal cells near the cut surface of cotyledon.

C : Callus formed on the cut surface

S : Shoot-like primordium regenerated from the epidermal cells

(×50)

が発生した。また、子葉切断面を上にして置床した場合には、子葉全体から不定芽が発生し、さらに不定根の発生も多かった。しかし、いずれの場合にも切断面付近の向軸側から多くの不定芽が発生していた。Kouider ら²⁾も、リンゴ子葉からの不定芽再生について同様の極性が認められることを報告し、子葉切断面に内生ホルモンや養分が子葉向軸側の維管束を通過して求基的に移動し、集積する結果、子葉切断面付近の向軸側で不定芽の発生が多くなるのであろうと推察している。

一方、不定芽発生の様子を走査型電子顕微鏡で観察した結果、Fig. 5 に示すように子葉切断面にカルスが形成され、この付近の表皮組織が肥厚・突出し、これらの生長点様の構造をもった組織から不定芽が分化・発達することが認められた。

摘 要

ニホンナシ子葉からの不定芽再生に及ぼす種々の要因について検討した。子葉からの不定芽は、オーキシンに対するサイトカイニンの量比が高い場合に形成されやすく、NAA 0.1~0.5mg/l+BA 1~5mg/l で高い再生率が得られた。これに対し、不定根は、オーキシンに対するサイトカイニンの量比が低い場合に形成され、NAA 1~5mg/l+BA 0.1~0.5 mg/l で高い再生率が得られた。また、不定芽再生に及ぼすオーキシンの種類としては NAA が最も高く、その濃度は0.1mg/l が最適であった。さらに、不定芽再生率は0.1M のシュークロースの添加、16時間日長下でそれぞれ高かった。一般に、子葉からの不定芽再生は子葉の向軸側で多く、走査型電子顕微鏡で観察した結果、これらの不定芽は子葉切断面付近の表皮組織から発生していた。

引用文献

- 1) Hidaka, T. and M. Omura. 1989. Control of embryogenesis in *Citrus* cell culture. Bull. Fruit Tree Res. St. Ser. B 16: 1-17.
- 2) Kouider, M., S. S. Korban, R. M. Skirvin and M. C. Chu. 1984. Influence of embryonic dominance and polarity on adventitious shoot formation from apple cotyledons *in vitro*. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 109: 381-385.
- 3) 増田哲男・吉田義男・別所英男. 1987. リンゴの細胞培養と個体の再分化に関する研究 第1報 リンゴの葉外植片からの不定芽形成. 果樹試報 C14: 1-10.
- 4) Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A reversed medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497.