

育種のおよび組織培養学的手法による 棉の矮化についての検討

吉岡純代・斎藤英毅・茅野誠司・山口拓志
柳沢勝人・佐藤俊一・児玉 徹

(信州大学繊維学部附属農場)

緒 論

本学部附属農場には、棉をはじめとして数種類の繊維植物が遺伝子資源として保存されている。棉はアジア棉14品種と、陸地棉6品種の合わせて20品種保存されているが、その繊維は地理的、気候的な条件から良質なものにはならない。そこで棉の繊維以外の用途を検討した。

棉は花が美しく、またその朔果はドライフラワーとしても楽しめるため、鑑賞期間が非常に長い、その草丈は1m以上にもなりポット栽培には適さない。矮化が出来れば園芸品として利用できるため、棉を矮化してポット栽培が可能な園芸品種に改良できないかを検討した。

棉の矮化は大別して育種的手法と組織培養学的手法により検討した。さらに棉のカルスへ *A. rhizogenes* を接種するために、棉カルスの誘導について検討した。しかし、棉ではカルス誘導用のホルモンバランスが分かっていないため、まずその点について検討した。

I. 育種的手法

育種的手法として簡便な矮化剤の利用、肥料成分の検討および物理的ストレスの付加について検討した。これらの試験は温室内でポット栽培した棉を用いて行った。

I-① 矮化剤の利用

植物の生長過程で現れるさまざまな生理機能を促進、または抑制する物質は植物生長調整剤と総称されている。これらの薬剤は発根剤、着果剤や草丈調整剤など多種多様である。特に草丈調整剤は手軽に望み通りの草丈に出来るため、さまざまな種類の薬

剤がでまわっている。本実験ではこうした植物生長調整剤のうち、矮化剤として市販されているビーナインとスミセブンについて検討した。

[方法]

供試品種：紫蘇棉

鉢 土：パーミキュライト

肥 料：大塚ハウス A 処方 (但し、肥料調整区では用いない。)

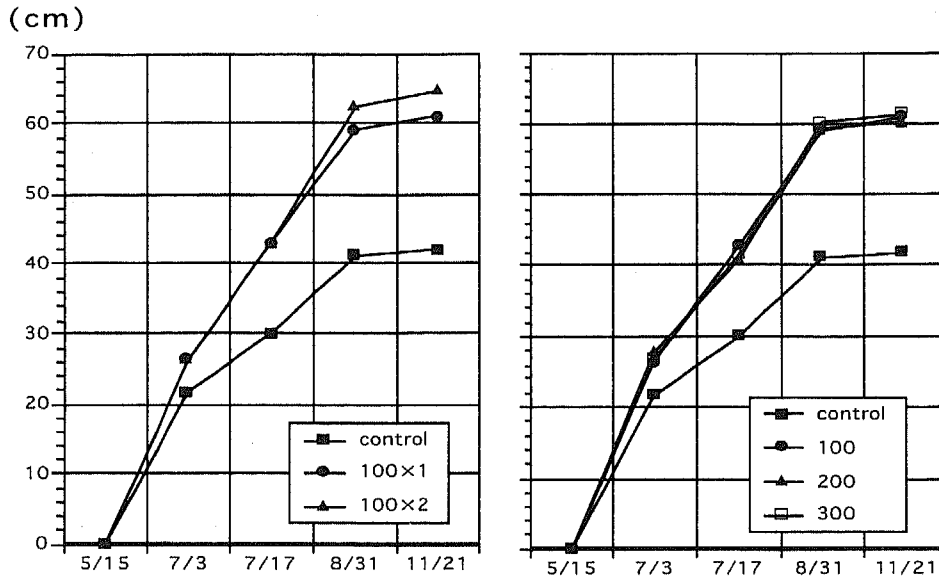
薬剤間による差を考え、主成分の異なる2種類の矮化剤 (ビーナイン、スミセブン) を用いた。ビーナイン、スミセブンとも添付書に準じ、生長点を中心とした茎葉散布により処理した。使用濃度は添付書に準じてそれぞれ決定した。矮化剤は発芽後30日経った棉の幼苗に処理し、外観の変化を観察するとともに草丈を測定した。さらにそれぞれの濃度で2回散布区を設け、1回目処理からさらに30日後1回目と同様に処理した。11月に最終草丈を測定し、散布回数別、散布濃度別、薬剤別にその変化を比較した。

[結果]

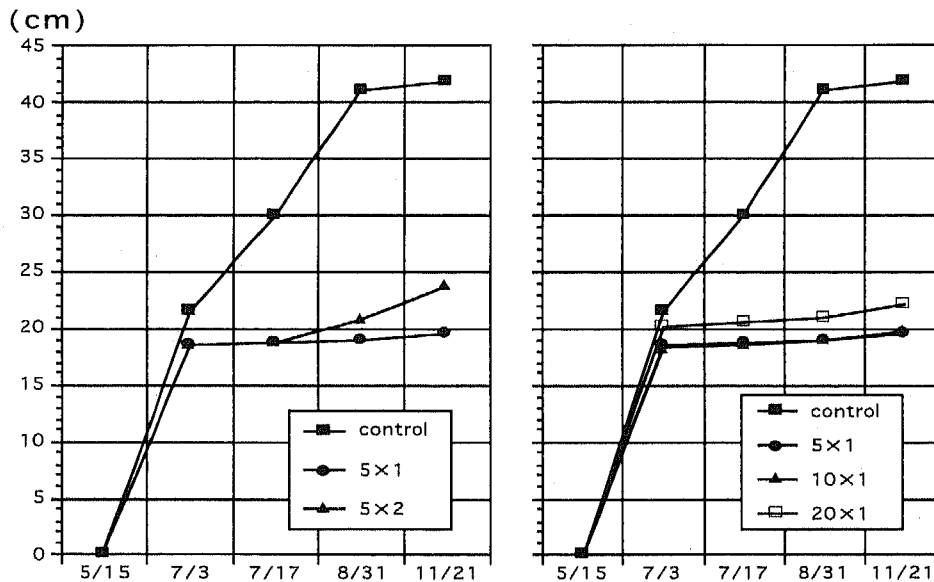
図1は、ビーナイン散布区における草丈変化を散布回数別、散布濃度別に比較したグラフである。今回用いた散布回数、各濃度で明確な差は見られなかった。また節間の徒長が見られ、草丈はコントロールと比較して明らかに高くなった。図2はスミセブン散布区における草丈変化を同様に示したグラフである。各濃度で矮化が起こっていることが分かる。最終的に草丈は約20cmになった。ビーナイン同様に散布回数、各濃度で明確な差は見られなかった。スミセブンでは矮化はしたが節間が極端につき、望むような草姿にならなかった。

I-② 肥料成分の検討

植物の生長に重要な役割をするものの一つに無機養分がある。無機養分の不足や偏りは植物の生長に重大な影響を及ぼすことが知られている。植物の生長にとって最も多く必要とし、欠乏しやすい元素は



<図1 ビーナイン散布区における草丈変化>



<図2 スミセブン散布区における草丈変化>

N, P, Kである。植物を鉢などの限られた環境で育てるためには、肥料としてこれらの元素を補う必要がある。ところでこの3つの元素にはそれぞれ主な働きがある。窒素は植物の栄養生長に関与し、リンは生殖生長に、またカリは植物体を丈夫にする働きがある。これらのことより人為的に養分を不足させ、棉の生長を調節することを検討した。

[方法]

植物の栄養生長に必要である窒素を除いた肥料を与えて、棉にどのような影響が出るかを調査した。そのために窒素分を含まない大塚ハウス9号を肥料として用いた。コントロール区は大塚ハウス肥料をA処方与えた。これらの肥料を通常用いるように、生長段階に合わせて3-7日間隔で1ポットあたり

100ml与えた。その間、外観を観察するとともに地上部の草丈を測定し、その変化を比較した。

[結果]

肥料調整区は、大塚ハウス9号を150ppmで用いたA区と、同じものを75ppmで用いたB区を設定した。A, B区間で草丈に差はなかった。最終的な草丈は13cm弱と大変小さくなったが、極端な栄養不足による生長不良を起こした。花芽の形成はA, B区とも数本確認されたが、花は小さく色も薄くなった。

I-③物理的ストレスの付加

植物は外界からさまざまなストレスを受けているが、これにより植物の生育が阻害、抑制されることが知られている。そこで棉にストレスを与えて、ど

の程度その生育が抑制されるかを試験した。

〔方法〕

本実験では方法の簡便さからプラグポットを利用し、棉の根へのストレスの付加を検討した。プラグポットは一部の野菜や花卉類の幼苗の育種に用いられるポットで、そのサイズは非常に小さい。今回用いたものは、3.5×3.5×5cmのものである。また1区につき1粒播種し、コントロールと同様に施肥して、最終草丈と根長を測定した。

〔結果〕

プラグポットで育種した結果、草丈は13cm弱であった。花芽の形成は数本で確認されたが、完全な蒴果を形成したものはなかった。また2個以上花芽を形成したものは確認されなかった。

〔育種的手法の考察〕

育種的手法として簡便な3つの方法により棉の矮化を試みた。その結果、それぞれの方法で矮化が確認されたが、望み通りの植物体は得られなかった。今後は矮化剤の利用を中心としてさらに検討していく予定である。しかしこうした育種的手法では、矮化が出来てもその形質が後代まで受け継がれないという問題がある。そこで組織培養学的手法を用いて棉を形質転換し、矮化の形質を与えることを検討した。

II. 組織培養学的手法

組織培養学的手法として土壌病原菌の *Agrobacterium rhizogenes* を用いて棉の形質転換を試みるため、棉の毛状根の誘導を検討した。

II-①土壌病原菌 *Agrobacterium rhizogenes* の利用

土壌病原菌である *Agrobacterium rhizogenes* が植物に感染すると、その感染部位に毛状根と呼ばれる組織を形成する。毛状根はホルモンフリーの培地中で活発に伸長し、この組織からの植物体の再生が可能である。また再生した植物体は特徴ある形態変化を起こし⁽¹⁾、その形質は後代まで安定して受け継がれる。これらの一連の作用は、*A. rhizogenes* の保持する Ri プラスミド中の T-DNA 領域が、ホストプラントのゲノムに組み込まれることによる。毛状根の利用は、薬用植物からの有用物質の生産を目的として研究され、発展してきた⁽²⁾。しかし近年、毛状根からの再生植物の様々な形態変化と、その遺伝的機構が解明されるにつれ、園芸品種の形質転換を目的としても利用されるようになった⁽³⁾。本研究

では *A. rhizogenes* のこれらの性質を利用し、棉の矮化を検討した。そのためにも、棉の毛状根の誘導を試みた。

〔方法〕

供試品種：紫蘇棉，赤木黒種

供試菌株：*A. rhizogenes*1724, M123（静岡農試より），IFO14554

棉の無菌の幼苗を得るために、3%スクロース、0.7% Agar を添加した MS 培地を pH5.8 に調整し、表面殺菌した種子を播種した。幼苗の育種は25°C、16時間明条件下で行った。*A. rhizogenes* は YEB 培地上で28°C、24時間明条件下で培養した。*A. rhizogenes* の感染方法は直接接種法、リーフディスク法を用いた。直接接種法では、*A. rhizogenes* を接種した幼苗を25°C弱光下で1ヶ月間培養し、その間接種面を中心に変化を観察した。リーフディスク法では2日間の菌との共存培養の後、500ppm Cefotaxime か500ppm Carbenicillin+200ppm Vancomycin を添加した MS 培地で除菌した。リーフディスクは1週間毎に継代した。培養は直接接種法と同様に25°C弱光下で行った。

〔結果〕

直接接種法で毛状根は誘導されなかった。しかし接種面が変化したものも多く観察された。また変化したものの中には枯死するものもあった。リーフディスク法でも毛状根は誘導されなかった。リーフディスクがカルス化するものはいくつか観察されたが、多くは褐変してしまった。

II-②棉のカルス誘導用のホルモンバランスの検討

直接接種法、リーフディスク法で毛状根は誘導されなかった。そこで未分化細胞であるカルスへ *A. rhizogenes* を接種し、毛状根を誘導できないか検討した。しかし棉ではカルス培養の報告はなく、カルス誘導用のホルモンバランスが分かっていないため、まずその点について検討した。

〔方法〕

3%スクロース、0.7% Agar, pH5.8 の MS 培地を基本培地とし、IBA, BA を各濃度で培地に添加した。それぞれの培地に棉の幼苗の茎切片を置いて、25°C暗条件下で培養し2週間毎に継代した。調査は、1ヶ月後のカルス形成量をそれぞれ比較した。

〔結果〕

調査範囲内では、培養開始から1ヶ月を過ぎると褐変がひどくなり、ほとんどのものが生長しなくなった。現在までの結果では、最適のホルモンバランスは分かっていない。

[組織培養学的手法の考察]

直接接種法、リーフディスク法により、*A. rhizogenes* の感染を試みたが、毛状根の誘導はできなかった。原因のひとつには棉が木本植物であるということが挙げられる。*A. rhizogenes* は植物の傷から感染するが、その際傷から分泌されるアセトシリシリンゴンなどのフェノール化合物がシグナルとなり、T-DNA が切り出される。ところが木本植物では、傷口にポリフェノール化合物などを分泌するため、一般に感染が起こりにくいとされている。このような場合、アセトシリシリンゴンなどのフェノール化合物で菌体を処理すれば感染率が上がるという報告があるため⁽⁴⁾、今後検討していく予定である。また直接接種法で棉が褐変したり枯死したことについては、コントロールでは確認されなかったため、病原菌の進入の刺激が褐変化を起こしたものと思われる。また *A. rhizogenes* について、用いた菌株は全て国内菌であるが、国内菌株は外国産菌株に比べて感染力が弱いと報告されている⁽⁵⁾。しかし最終的に形質転換した棉を園芸品種として利用するためには、外国産菌株の使用は避けるべきと考えた。今後は菌株と棉の品種を変えていきながら引き続き検討するとともに、感染方法についても検討する予定である。またカルスの誘導については、褐変化が問題になって

いる。植物組織の褐変化は非酵素的褐変化と酵素的褐変化に分けられる。in vitro での組織培養では、褐変化が酵素的か非酵素的かの判断さえ難しいとされ⁽⁶⁾、現在までにこれを防ぐ有効な手段は報告されていない。しかしホルモンバランスが適当であれば、褐変化を完全に防ぐことは出来なくてもある程度の活性のある培養細胞が得られると思われる。今後はホルモンの種類も合わせて、引き続き検討する予定である。

参考文献

- (1) 真野佳博 (1989): Plant Tissue Culture Letters 6(1) 1-9
- (2) Masahito TAYA, Akihiko YOYAMA, Osamu KONDO, Hiroyuki HONDA and Takeshi KOBAYASHI (1989): Plant Tissue Culture Letters 6(3) 159-161
- (3) Takashi HANDA (1992): Plant Tissue Culture Letters 9(1) 10-14
- (4) 半田 高: バイオホルティ 7 16-20
- (5) 半田 高 (1990): 第二回植物組織培養コロキウム 122-123
- (6) 旭 正 (1989): 植物細胞工学 Vol.1 No.1 90-93