

ナタマメの胚軸ならびに茎頂からの植物体再生

尾崎 厚 一*

岡山県農業試験場
(〒709-08 岡山県赤磐郡山陽町神田)

(1986年5月2日受付)

(1986年7月2日受理)

ナタマメ [*Canavalia gladiata* (JACQ) DC] の胚軸からの器官形成を検討するため、Murashige and Skoog (MS) 培地に 2-naphthaleneacetic acid (NAA) と 6-benzylaminopurine (BA) の濃度を組合せて検討した結果、BA 0.1~4.0mg/l 区と NAA 0.05mg/l+BA 0.5~1.0mg/l 区で10%~50%の割合で不定芽形成が認められ、NAA 0.05~1.0mg/l+BA 0.1mg/l 区で約10%の割合で植物体の形成が認められた。また、ナタマメの茎頂からの植物体の再生を検討するため、無機養分 (MS 培地)+vitamine (B5 培地) の培地に NAA と BA を単独並びに組合せて検討した結果、NAA 単独添加ならびに NAA と BA を組合せた区では茎頂からの目立った再分化は認められなかったが、BA 単独添加区では BA の濃度に比例して multiple shoot が形成された。そして、その multiple shoot は一部 1/2 MS+NAA 0.5~1.0mg/l, 1/2 MS+NAA 0.5~1.0mg/l +BA 0.1mg/l の培地で発根した。

1. 緒言

主要豆類のカルスの植物体の再生についてはいまだ不成功のものが多いが、外植片からの直接の植物体の再生については、ダイズ¹⁾、アズキ²⁾、ラッカセイ³⁾、インゲンマメ⁴⁾ など多くの種類で成功している。しかしナタマメなどの栽培面積の少ない種類については、いまだ外植片からの植物体の再生の報告例がない。外植片の種類としては胚軸、根、子葉、葉、茎頂等があるが、一般的によく利用されているのが胚軸、茎頂で、その場合に植物体再生の成功率が多いようである。このうち、茎頂についてはウイルスフリー個体を得る手段として有益であり、また germ plasm を低温もしくは凍結貯蔵するための材料として最適とされている。豆類のこの分野についての研究は Kartha⁵⁻⁷⁾ の報告例があるが、ナタマメについてはいまだ報告例がない。そこで筆者はナタマメの胚軸ならびに茎頂を材料として組織培養を行い、植物体の再生に成功したのでここにその概要を報告する。

2. 材料および方法

ナタマメの品種は白花種を用いた。種子を70%アルコールで10秒間、次に1%次亜塩素酸ソーダ液で10分間浸漬殺菌し、その後滅菌水で2回洗浄し、この種子をホルモンフリーの MS 培地を 10ml 入れた 20×100mm の試験管に1個/1試験管の割合で置床した。25°C, 3,000

lux の条件で7~14日培養後、胚軸が 3cm 程度に伸長し、子葉ならびに胚軸が緑色を帯びてきた時期に、胚軸は上下をそれぞれ 2~3mm 除外した残りの部分を 0.5 cm 程度の長さで切断して材料に供試した。茎頂は葉原基 2 枚を含む 0.5~0.6mm の大きさのものを、無菌状態の実体顕微鏡の下で摘出した。

培地は、胚軸の場合は MS 培地に NAA 0, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0mg/l と BA 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0mg/l を組合せたものを添加した後、蔗糖を 30g/l 加え、pH を 1N NaOH, 1N HCl で 5.8 に調節した。その後寒天を 8g/l 加えて溶解し、20×100mm の試験管に 10ml ずつ分注、オートクレーブは 125°C, 15分間の処理を行って作成した。茎頂の場合は MS 培地の無機養分に B5 培地の vitamine 類を添加し、それに NAA 0.02, 0.2, 1.0, 2.0mg/l ならびに BA 0, 0.02, 0.2, 1.0, 2.0mg/l の単独ならびに、NAA 0.02, 0.2, 2.0mg/l と BA 0.02, 0.2, 2.0mg/l を組合せたものを添加した後、胚軸の場合と同様の方法で作成した。材料の外植片は胚軸、茎頂ともに1切片/1試験管の割合で置床し、1区20反覆とした。

また、胚軸から得られたカルスの再分化試験には MS 培地に BA 0.2, 1.0mg/l を添加して試験を行った。

茎頂培養で形成された shoot の発根試験には 1/2 MS

Table 1. Effect of BA and NAA combinations on the regeneration from the hypocotyl of sword bean after 7 weeks of culture.

NAA (mg/l)	BA	No. of explant	Callus formation (%)	Callus+root formation (%)	Callus+shoot formation (%)	Shoot growth ^a	Plantlets (%)	Plantlets growth ^b
0	0.1	20	90.0	0	10.0	+	0	-
	0.5	20	90.0	0	10.0	+	0	-
	1.0	20	50.0	0	50.0	+++	0	-
	2.0	20	80.0	0	20.0	++	0	-
	4.0	20	80.0	0	20.0	++	0	-
0.05	0.1	20	10.0	80.0	-	-	10.0	+
	0.5	20	70.0	15.0	15.0	+	0	-
	1.0	20	70.0	0	30.0	++	0	-
	2.0	20	100.0	0	0	-	0	-
	4.0	20	100.0	0	0	-	0	-
0.1	0.1	20	45.0	40.0	-	-	15.0	+
	0.5	20	100.0	0	0	-	0	-
	1.0	20	100.0	0	0	-	0	-
	2.0	20	100.0	0	0	-	0	-
	4.0	20	100.0	0	0	-	0	-
0.5	0.1	20	45.0	40.0	-	-	10.0	+
	0.5	20	100.0	0	0	-	0	-
	1.0	20	100.0	0	0	-	0	-
	2.0	20	100.0	0	0	-	0	-
	4.0	20	100.0	0	0	-	0	-
1.0	0.1	20	40.0	45.0	-	-	15.0	+
	0.5	20	40.0	60.0	0	-	0	-
	1.0	20	100.0	0	0	-	0	-
	2.0	20	100.0	0	0	-	0	-
	4.0	20	100.0	0	0	-	0	-

^{a,b} - : irrelevance, + : slight, ++ : moderate, +++ : vigorous.

Table 2. Effect of NAA and BA combination on the morphogenetic response of sword bean meristems after 7 weeks of culture.

NAA (mg/l)	BA	Shoot formation		Callus formation ^a	Root formation ^b	Swelling of meristems ^c
		number	length			
0	0	0	-	-	-	+
	0.02	2	2.0-2.5cm	+	-	
	0.2	2-3	1.2-1.6	+++	-	
	1.0	4-6	0.8-1.0	+++	-	
	2.0	6-8	0.8-1.0	+++	-	
0.02	0.02	0	-	-	-	+
	0.2	0	-	-	-	+
	2.0	2	0.4-0.6	+	-	
0.2	0.02	B ^d	-	++	+	
	0.2	B	-	++	-	
	2.0	1	0.3-0.5	++	-	
2.0	0.02	0	-	+++	+++	
	0.2	3-4	0.2-0.4	+++	++	
	2.0	4-6	0.3-0.5	+++	-	

^a - : no callus, + : slight, ++ : moderate, +++ : profuse.

^b - : no root, + : slight, ++ : moderate, +++ : profuse.

^c + : slight, ++ : moderate, +++ : profuse.

^d B : many buds.

培地に NAA 0, 0.2, 0.5, 1.0mg/l と NAA 0.5~1.0 mg/l+BA 0.1mg/l を添加して試験を行った。

培養条件は温度 25°C, 照度 5,000 lux, 12時間照明であり, 調査は胚軸, 茎頂とも置床 7週間後に行った。

3. 結果と考察

(1) 胚軸からの植物体再分化について

胚軸置床 1週間後より, 供試したすべての区で胚軸と培地との接触面よりカルスが形成し, 胚軸の下半分は白い friable なカルスで覆われた。胚軸置床 2週間後には, その内 NAA 0.05mg/l+BA 0.1~0.5mg/l 区, NAA 0.1mg/l+BA 0.1mg/l 区, NAA 0.5mg/l+BA 0.1mg/l 区および NAA 1.0mg/l+BA 0.1~0.5mg/l 区で胚軸のカルスに覆われていない上半分の表面部分より不定根が発生した。そして, その不定根の大半は細い繊毛に覆われ, 培地中に入るとわずかにカルス化を起した。また, その不定根の発生量は NAA 濃度が濃くなるにつれて多くなった。

そして胚軸置床 3週間後には BA 0.1~4.0mg/l 区ならびに NAA 0.05mg/l+BA 0.5~1.0mg/l 区の胚軸の切断面より, 小さい緑塊が出現し, 7~10日後には不定芽が 1本/1胚軸の割合で形成された。不定芽形成の割合は BA 1.0mg/l 区が量も多く, 50.0%, 次が NAA 0.05mg/l+BA 1.0mg/l 区の30.0%, BA 2.0, 4.0mg/l 区の20.0%, BA 0.5mg/l 区は10.0%の順位であった。また BA 1.0mg/l 区, NAA 0.05mg/l+BA 0.5~1.0 mg/l 区では整った茎と葉が形成されたが, BA 2.0, 4.0mg/l 区では葉のついていない茎が伸長するのみであった。胚軸置床 5週間後には BA 0.1, 0.5mg/l 区と NAA 0.05~1.0mg/l+BA 0.1mg/l の各区でもやっと胚軸の切断面より不定芽が direct に発生し始め, NAA 0.05~1.0mg/l+BA 0.1mg/l の各区ではそれ以前に不定根が形成していたので, 一応植物体が形成されたが, その割合は10~15%であった。また, これらの区の不定芽の生育はきわめて貧弱であった。以上の区以外ではすべてカルス形成のみであり, 全体が白い friable なカルスで覆われた。また, このカルスを MS 培地に BA を 0.2, 1.0mg/l 添加した培地に移植して培養を試みたが, 再分化は認められなかった。

穀類用豆類の中で, 胚軸より直接不定芽が形成されているものは, ダイズ¹⁾とアズキ²⁾であるが, ダイズの場合はあらかじめ胚軸の外表面に apical meristem の基となるものが存在しており, またアズキの場合はカルス経由であった。しかし, このナタマメについては不定芽の形成された部分は胚軸の切断面より直接であり, 前二者とは様相が異なる。しかし不定芽の基については cy-

tologistic な観察を行っていないのではたして direct に発生したものかどうかについては定かではない。

(2) 茎頂からの植物体再分化について

BA 単独添加区では, 茎頂置床 1週間後より BA 0 mg/l 区を除く各区で茎頂の培地との接触面よりカルス化が起り, カルス量は日時の経過とともに増大した。置床 3週間後には BA 0~0.2mg/l 区を除く各区で茎頂に変化が現われ, leaf primodium (葉原基) は大きくなり始め, 茎頂の周辺は肥大し, その表面に多数の bud が形成された。bud の数は BA の濃度に比例し, BA 2mg/l 区では 6~8 個, 1mg/l 区では 4~6 個, 0.2mg/l 区では 2~3 個であり, それらは徐々に伸長して, 茎葉が形成され, 置床 7週間後には BA 1~2mg/l 区では 0.8~1.0 cm, BA 0.2mg/l 区では 1.2~1.6 cm に達した。しかしいずれも根の形成は認められなかった。また, BA 0.02 mg/l 区では前述のような多量のカルス形成はなく, 2本の leaf primodium がそのまま伸長したのみにとどまったが, その伸長速度は速く, 置床 7週間後には 2~2.5 cm に達した。ただし, 根の形成は認められなかった。ホルモンフリーの区では単に茎頂が肥大したのみで, それ以上の変化は認められなかった。

次に, 形成された BA 1.0~2.0mg/l 区の multiple shoot を, MS 培地に NAA 0.02mg/l, BA 0.02mg/l, GA 0.01mg/l を添加した培地で 3~4 cm に伸長させた後, 分割して発根培地へ移植したところ, 2週間後に NAA 0.5~1.0mg/l +BA 0.1mg/l 区で BA 1.0mg/l 由来の shoot が一番早く発根し始め, 結果としては BA 0.2mg/l 由来の shoot では NAA 0.5~1.0mg/l+BA 0.1mg/l 区で 50%, BA 1.0mg/l 由来の shoot では NAA 0.5, 1.0mg/l 区で 20%, NAA 0.5~1.0mg/l +BA 0.1mg/l 区では shoot 当たりの根の数は少量ではあるが, 100%の, BA 2.0mg/l 由来の shoot では NAA 0.5, 1.0mg/l 区で 30%の, NAA 0.5~1.0mg/l+BA 0.1mg/l 区では shoot 当りの根の数は少量ではあるが 100%の発根率を示した。しかし, その他の区での発根は皆無であった。また, NAA 0.5~1.0mg/l+BA 0.1 mg/l の培地は少量の発根を促したが, カルス化はなほだしかつた。

NAA 単独添加区では, 茎頂置床 1週間後より NAA 0.2mg/l 以上の濃度ではなほだしいカルス化が起り, 茎頂はカルスで覆われた。しかしその他の変化はなかった。また NAA 0.02mg/l 区ではカルス化は起らず, 茎頂が肥大したのみでその他の変化は起こらなかった。

NAA と BA の濃度を組合せた区では, 茎頂置床 1週間後より NAA 0.02mg/l+BA 0.02~0.2mg/l 区を除

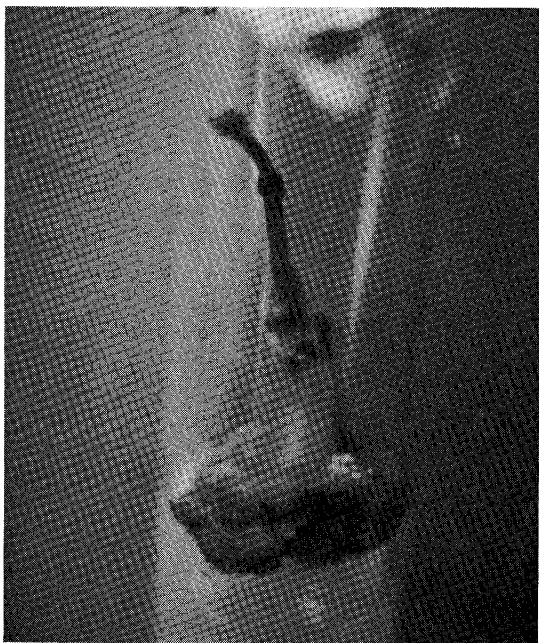


Fig. 1. Adventitious bud formation from hypocotyle of sword bean.



Fig. 2. Plantlets formation from hypocotyle of sword bean.



Fig. 3. Multiple shoot formed from meristem of sword bean on medium containing BA 2.0mg/l.

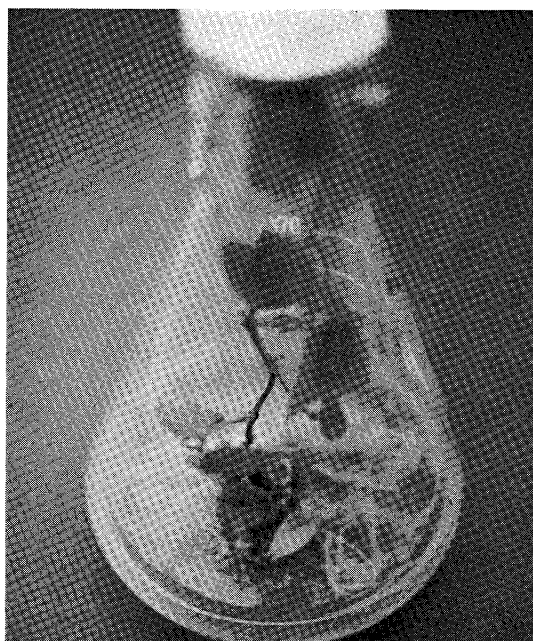


Fig. 4. Plantlets originated in meristem of sword bean.

く、各区で茎頂と培地との接触面よりカルス化が起こり、カルス量は NAA 量に比例して増加した。置床 3 週間後には NAA 0.02~0.2mg/l+BA 2.0mg/l 区, NAA 2.0mg/l +BA 0.2~2.0mg/l 区で茎頂より茎と葉が形成されたが、その後伸長しなかった。また、NAA 0.2mg/l+BA 0.02~0.2mg/l 区では茎頂の周辺部より bud が形成されたが、これもその後の伸長は認められなかった。NAA 2.0mg/l+BA 0.2mg/l 区では、茎頂置床 7 週間後にはさきに root が形成され、その後追いかけるように葉状のものが形成され、一応植物体の形が形成されたが、その後の伸長はなかった。NAA 0.02mg/l+BA 0.02~0.2mg/l 区ではカルス形成は起こらず、茎頂の肥大のみで、それ以上の変化は認められなかった。

Kartha⁴⁾ の試験によればインゲンマメを除く大部分の穀類用豆類では茎頂より直接全植物体が容易に形成されているが、このナタマメについてはいかなる NAA, BA の組合せでも直接植物体は形成されておらず、BA による multiple shoot 形成の後 NAA を含んだ培地への移植

後発根し、やっと植物体が形成されている。それから考えると、このナタマメの場合、茎頂培養は他の豆類に比べると、やや困難な部類に属するものと考えられる。

文 献

- 1) Kimball, S.L., E.T. Bingham, 1973. *Crop Sci.*, **13**: 758-760.
- 2) Ozaki, K., 1985. *Plant Tissue Cult. Lett.*, **2**: 59-62.
- 3) Pittman, R.L., 1981. *Disertation Abstracts International*, **B42**: 1690.
- 4) Kartha, K.K., K. Pabl, N.L. Leung, L.A. Mroginski, 1981. *Can. J. Bot.*, **59**: 1671-1679.
- 5) Kartha, K.K., O.L. Gamborg, 1978. In "Diseases of Tropical Food Crops," p. 267-283.
- 6) Kartha, K.K., N.L. Leung, O.L. Gamborg, 1979. *Plant Sci. Lett.*, **15**: 7-15.
- 7) Kartha, K.K., 1981. In "Plant Tissue Culture Methods and Application in Agriculture," p. 181-211.

Summary

Plant Regeneration from Hypocotyl and Shoot Meristem Culture of Sword Bean [*Canavalia gladiata* (Jacq) DC]

Koichi OZAKI

*Crop Division, Okayama Agricultural Experimental Station, Kōda, San'yō-chō,
Akaiwagun, Okayama, Japan*

Plantlet formation from hypocotyl explants of sword bean [*Canavalia gladiata* (Jacq) DC] was observed on Murashige and Skoog medium containing 0.05-1.0mg/l NAA+0.1mg/l BA. Multiple shoot formation from shoot meristem of sword bean was observed on the medium containing MS mineral B5 vitamins and 0.2-2.0mg/l BA. These formed shoots were transferred to the MS medium containing 0.5-1.0mg/l NAA and 0.5-1.0mg/l NAA+0.1mg/l BA. The shoots formed roots in a part of experimental plot.