

研究ノート

生殖器官からのマルチプルシュート形成を経由する
大量迅速育苗について

久島 繁*

従来、産業界では植物組織培養技術を利用した新品種開発(育種)に大きな関心を寄せてきた様に見受けられる。最近、短期的な収益向上を斟酌してか大量迅速育苗にも関心を移してきたように思われる。本稿では大量迅速育苗法について概説後、著者らの手がけている生殖器官からのマルチプルシュート形成を経由する大量迅速育苗法を紹介したい¹⁻⁴⁾。

技術的な可能性からいえば、組織培養の大量迅速育苗は二つの手法が考えられる。すなわちカルス細胞系あるいは液体培養細胞系(含むプロトプラスト)といった unorganized system (脱分化系)と成長点、茎頂といった organized system (分化系)を用いる方法である(Fig. 1)¹⁾。カルス細胞系あるいは液体培養細胞系からの不定胚形成を用いる方法は、ニンジン、タバコのように胚発生率が90%を超えるものは現在事例が少ないが、潜在的には organized system (分化系)より、増殖率は高いと考えられる。しかし、再生植物に脱分化(unorganized)状態を経由するために生ずると考えられる変異の見られる個体が多いとされており、潜在的な変異をも考慮すると、均質な植物を必要とする産業分野では利用しにくい方法かもしれない。一方、organized system 経由による方法を大別すれば、初代培養器官に側芽の伸長を促進する手法と不定芽を誘導する手法になる。何れの場合にも引き続いて各シュートの側芽を多数伸長させてシュートマルチプリケーションプロセスを確立し剰余のシュートに発根させて植物体を再生する事により大量迅速育苗が完結する(Fig. 1)。ここでマルチプルシュートとは側芽あるいは不定芽が集団的に発生したものをいう。organized system 経由の内でも前者、すなわち側芽の伸長を促進する大量迅速育苗は比較的歴史が長く経験的に変異が少ない事が知られており、現在、産業上多用されて

いる様である。後者の初代培養で不定芽を誘導する方法も研究室段階では変異が見られないと報告されており前者と同様産業上利用される様になるものと考えられる。著者らは organized system として、成長点、茎頂の様な vegetative organ/tissue (栄養器官組織)が用いられる事が多いのに反して、種子、胚といった reproductive organ (生殖器官)が用いられる事が少ない事に着目し、かつ、いわゆる胚・胚珠培養技術、交雑育種技術と連関させた大量迅速育苗技術を想定して生殖器官(主として、種子と胚)を用いる大量迅速育苗について検討してきた。

ランの大量増殖(プロトコム)は植物ホルモン無添加でも可能な様で、最初に組織培養の大量育苗法が確立される端緒となったと考えられる。また、ランを除いた植物で最初にマルチプルシュート経由の大量増殖の可能性の示唆されたものはオーキシン添加培地で培養されたカーネーションであり、その後他の植物ホルモンの添加によって安定した大量増殖系が確立されている²⁾。一般に栄養器官組織にマルチプルシュートを形成させる場合、種々の培養条件が検討され、植物ホルモン条件も主因の一つとなっている。オーキシン処理、サイトカイニン処理、サイトカイニンとオーキシンのコンビネーション処理あるいはジベレリン処理の併用などが行われる。また、数種のサイトカイニンと数種のオーキシンのコンビネーションにより行われる場合がある。これらの実験のデザインは、多くの場合、研究者の経験によるものと推定される。マルチプルシュート形成の理論的背景は頂芽優性の打破による側芽の伸長あるいは Skoog 一派のサイトカイニン-オーキシンコンビネーションによるシュート/ルートの誘導に求める例は多い様に推定される。しかし、実際に用いる植物材料は生理的な状態、遺伝子の形質発現の状態を異にしているため、実際上オーキシンのみ、サイトカイニンのみでもマルチプルシュート形成が起こるものと考えられる。

そこで、種子からのマルチプルシュート誘導に当たっては予備検討としてサイトカイニンとして BAP, Kine-

* Shigeru HISAJIMA: Microplant Propagation through Multiple Shoot Formation from Reproductive Organs in vitro

筑波大学応用生物化学系(〒305 新治郡桜村天王台)
Institute of Applied Biochemistry, University of Tsukuba (Sakura-mura, Niihari-gun, Ibaraki, 305 Japan)

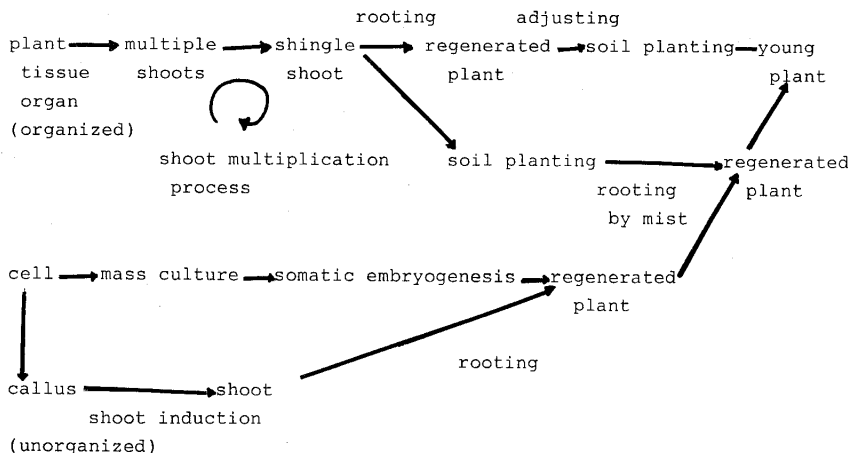


Fig. 1. Types of microplant propagation through tissue culture.

Table 1. Effect of individual cytokinin on multiple shoot formation from pea seeds.

Average shoot number ^a			
	BAP ^b	Kinetin ^c	2ip ^d
0 μ M	* ^e	*	*
0.5	*	*	*
2.5	lateral shoot	*	*
5	3.8 (1.8) ^f	*	*
10	4.0 (1.7)	lateral shoot	*
50	4.0 (4.3) ^g	3.3	lateral shoot
150	— ^h	—	4.4 (1.6)

^a The number indicates the number of shoot longer than 5 mm in length.
^b Cultured for 7 days.
^c Cultured for 11 days.
^d Cultured for 14 days.
^e* Indicates the only main axis elongated.
^f Numbers in parentheses show the number of small shoot between 1 mm and 5 mm.
^g With buds smaller than 1 mm.
^h No experiment.

tin, 2ip とオーキシンとして NAA, IAA, IBA を選び、さらにそれぞれのサイトカイニンとオーキシンの組み合わせにつき (3×3=9), 濃度を变化させてマルチプルシュート形成に対する影響を調べた。エンドウマメについてはサイトカイニン単独で誘導能がある事が分かった (Table 1, Plate 1-A)⁶⁾。(1) 各々のサイトカイニン濃度の低い領域では主茎の伸長が見られ濃度上昇とともに主茎の伸長抑制と側芽の発達伸長が見られた。さらに濃度の高い領域でマルチプルシュートの発生が認められるという作用スペクトルが観察された。(2) いずれのサイトカイニンについてもマルチプルシュートが形成さ

れ、カイネチン, 2ip は通常の組織培養で用いられる濃度に比して異常に高濃度な領域でのみマルチプルシュートを誘導した。(3) 三種のサイトカイニンの中で BAP が最もマルチプルシュート誘導能に優れていると考えられた。

BAP の影響を見ると濃度の上昇とともに shoot/bud 数が増加しており同時に各シュートの伸長抑制が厳しくなる。2週間ほど培養後低 BAP 培地に移す事により伸長を促進させる事が可能であった。たとえば 50 μ M BAP 培地で培養後 BAP 0.25 μ M の培地に移し 3~4 週間培養すると 60本以上 (5 mm 以上) のシュートが観察されることは珍しくなかった。

木本性, 単子葉, 双子葉植物からアトランダムに選択した他のすべての植物種についても, 類似の条件でマルチプルシュートの誘導が可能であった (Table 2)⁴⁾。大量迅速育苗の難しいとされた木本性植物についても比較的容易に系が開発できた (Plate 1-B)²⁾。カンキツ類は一般に多胚で, 生殖胚および栄養胚からなっている。ザボン, イヨカンについてはいずれの胚からもマルチプルシュートが形成された。種子は一般に種子伝染性の特殊な病害を除き無病と考えられ, 栄養胚からの大量迅速育苗は親系保持した無病育苗に役立つことが考えられる。マメ科植物の形態形成は難しいとされてきたが, マルチプルシュートは容易に形成され, エンドウマメについては大量迅速育苗も容易に確立できた⁶⁾。

胚からのマルチプルシュート誘導: 胚からのマルチプルシュート誘導も種子からの場合と同様の手順を踏んで検討された。エンドウマメの場合 BAP のみでマルチプルシュートが形成される事が明らかとなった (Plate 1-C)⁶⁾。BAP の影響はほぼ, 種子に対する影響に類似して

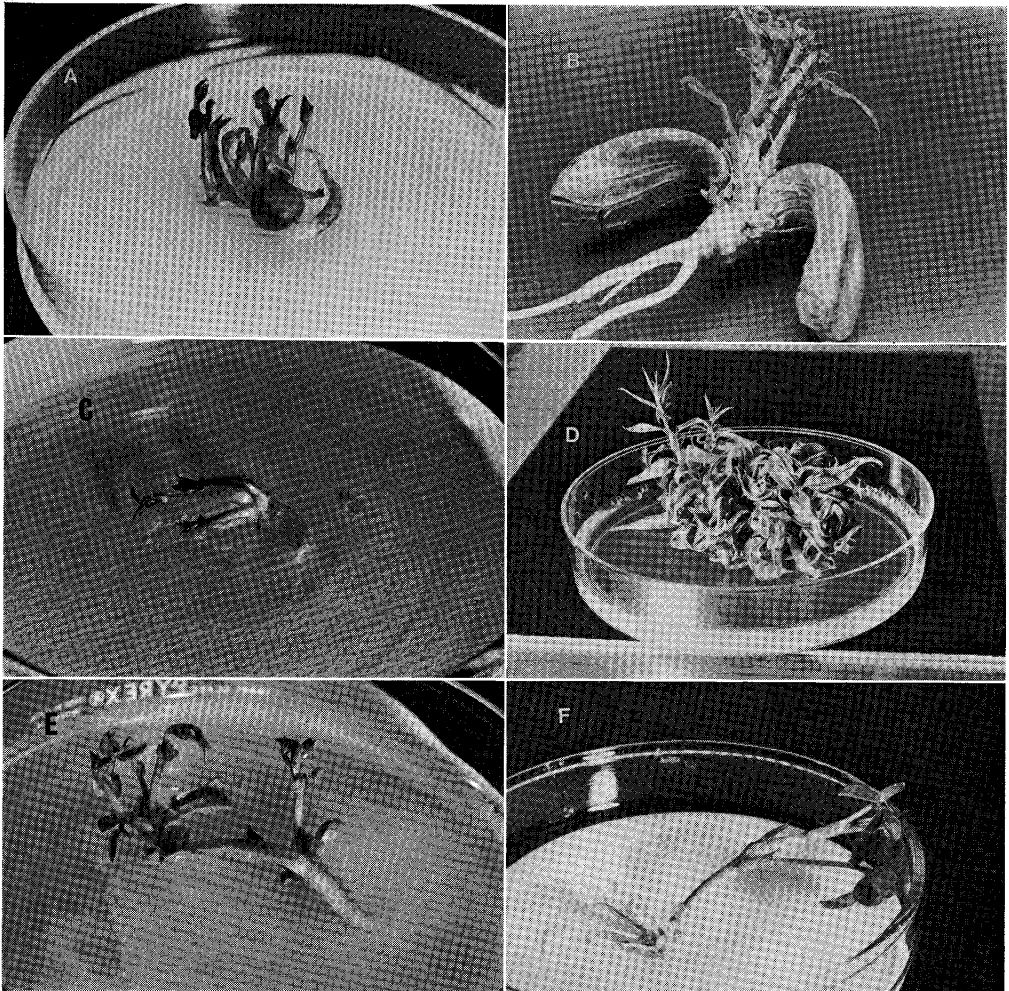


Plate 1. Multiple shoots and regenerated plants.

A : Multiple shoots from pea seed, B : Multiple shoots from almond embryo, C : Multiple shoots from pea embryo, D : Multiple shoots from almond embryo, E : Multiple shoots from pea excised single shoot, F : Regenerated pea plant through rooting from single shoot derived from multiple shoots.

いた。ただ、shoot/bud 数の最大は $2.5\mu\text{M}$ 付近で得られ種子の場合の $50\mu\text{M}$ と大きな違いがあった。このことは子葉からサイトカイニンの頂芽優性を抑制する作用を減殺する物質が供給されることを示唆している。また、胚から誘導されたマルチプルシュートを長期間連続して増殖させる場合 BAP 単独培地より BAP と IBA の混合培地を用いる方が増殖がよかった。アトランダムに選択実施した他のすべての植物種についても類似の条件下でマルチプルシュートの誘導が可能であった (Table 2)。アーモンドからのマルチプルシュート形成状態を Plate 1-D にしめす⁹⁾。

連続的シュートマルチプリケーション: 連続的にシュートを増殖させる場合各単一シュートにマルチプルシュートを形成させる必要がある。各シュートの成長点近傍で生産されるオーキシンにより側芽の発達伸長が抑制されていることが考えられるのでサイトカイニンで抑制を打破する必要が考えられる。同時に発達を開始した側芽の伸長促進も計る必要がある。エンドウマメの単一シュートを用いた予備実験でサイトカイニンとオーキシンの濃度を幾つか変えた組み合わせを検討した結果 BAP を $1\mu\text{M}$ 固定濃度としたシリーズで良い結果が得られる事が示された。そこで、BAP $1\mu\text{M}$ 固定濃度とし、IBA

Table 2. Induction of multiple shoots and regeneration of plants by rooting.

	Original organ			
	Seeds	Embryos	Excised shoots	Roots
Ligneous plants				
Almond	+	+	+	+
Chestnut	+	+	+	+
Loquat	+	?	?	?
Shaddock (<i>Citrus</i>)	+	+	+	+
Iyokan (<i>Citrus</i>)	+	?	+	?
Herbaceous monocots				
Rice	+	?	+	+
Maize	+	+	+	+
Herbaceous dicots				
Asparagus	+	?	+	?
Soybean	+	+	+	+
Pea	+	+	+	+
Peanut	+	+	+	+
Mungbean	+	?	?	?
Radish	+	?	?	?
Tomato	+	?	?	?
Egg plant	*	?	?	?
Cucumber	+	?	+	+
Pumpkin	+	?	?	+

+ Positive results.

? Not examined.

* Main axis with a pair of lateral shoots.

濃度を変化させて、単一シュートに対する影響を調べた。BAP $1\mu\text{M}$ 、IBA $0.05\mu\text{M}$ の組み合わせ培地で shoot/bud 数は最大となった (Plate 1-E)。3週間ごとにシュートを切除し各単一シュートからのマルチプルシュート誘導とシュートの伸長を繰り返すことによりシュートが1回の培養で4倍に増殖した。したがって計算上1年で1本のシュートから $4^{(51/3)} \approx 1.7 \times 10^9$ 本のシュートが得られることになる⁶⁾。

植物体再生：発根条件は植物体によりかなり異なっているようである。エンドウマメの場合には $1.5 \sim 3\text{ cm}$ の単一シュートを用いオーキシンによる発根を試みた。オーキシンは発根に必須で、IBA $2.5 \sim 5\mu\text{M}$ 領域で100%の発根が観察された (Plate 1-F)。

総合考察：種子、胚を用いることにより、比較的単純な条件でマルチプルシュートが誘導可能で、大量迅速育苗系が確立しやすい様な感触を得ている。これらの感触は細胞、組織、器官と大きくなればそれ自体の適応性が増すと考えられる事および種子・胚は若い組織を持ち、若い組織は外的環境条件に良くレスポンスするという知見によって補強される様に思われる。種子・胚からのマルチプルシュート形成あるいは大量迅速育苗法はごく一

般的にいえば (1) F_1 の親系保持、(2) F_1 の迅速な普及、(3) 種子遺伝資源保存の規模縮小などに役立つのではないかと考えられる。IRRI ではイネ花粉経由の大量迅速育苗法を開発中である。著者らはイネ種子からの大量迅速育苗法を投稿中である。トウモロコシについても大量迅速育苗法を開発した。トウモロコシについては種子・胚から試験管内で幼穂の発生を見、かつ未受精胚からの植物体再生を見た。このように、種子・胚の培養は単に大量迅速育苗系としてばかりでなく、多くの目的の実験系と用い得るようである。

(1986年5月23日受理)

文 献

- 1) 久島 繁, 1986. 植物組織培養アトラス, 印刷中.
- 2) Hisajima, S., 1982. Agric. Biol. Chem., 46: 1091-1093.
- 3) Hisajima, S., 1982. Biol. Plant., 24: 235-238.
- 4) Hisajima, S., Y. Arai, K. Ishizuka, 1985. Proceedings of 5th SABRAO Congress: in press.
- 5) Hackett, W.P., J.M. Anderson, 1967. Proc. Am. Soc. Hort. Sci., 90: 365-369.
- 6) Hisajima, S., 1985. Jpn. J. Trop. Agric. 29: 176-179.