

フジマメの cotyledonary node ならびに茎頂からの植物体の再生

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9月24日受付)

(1986年11月25日受理)

フジマメ (*Lablab purpureus* (L.) SWEET) の cotyledonary node segment よりの植物体の再生を検討するため、あらかじめ Murashige and Skoog (MS) 培地に 6-benzyl aminopurine (BA) の 1.0~20.0 mg/l の濃度を組み合わせた培地でフジマメを発芽させ、1, 2, 3 週間後に cotyledonary node segment の部分を切り出して MS 培地に BA 0.2 mg/l を添加した培地へ移植したところ、2 週間 BA で発芽処理をしたものが一番 shoot 発生数が多く、その中でも発芽処理の BA 濃度が高くなるほど shoot 数が増加することが判明した。またこの cotyledonary node の部分より発生した shoot を分割して、MS 培地に NAA 0.2 mg/l を添加した培地へ移植すると発根し、植物体が形成した。また、フジ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)+Vitamin (B5 培地) の培地に、NAA と BA を単独並びに組み合わせて添加し培養した結果、NAA 0.2 mg/l 単独添加区並びに NAA 0.02 mg/l+BA 0.2 mg/l, NAA 0.2 mg/l+BA 0.02 mg/l 区で、置床した茎頂当たり 30.0% の割合で植物体が形成され、また BA 単独添加では 0.02~0.2 mg/l の濃度範囲では多数の shoot が形成されることが判明した。

1. 緒言

主要穀類用豆類の組織からの組織培養による植物体の再生については、その大半¹⁻⁶⁾で成功しているが、栽培面積の少ない種類についてはいまだ手つかずの状態である。フジマメについては筆者が未発表の試験において、胚軸、子葉、未熟葉、根等の組織培養を試み、直接またはカルス経由の植物体の再生を試みたが、すべて失敗した。そこでダイズの試験において、高濃度の BA のもとで発芽させた苗より採取した cotyledonary node を低濃度の BA に移植して、大量増殖に成功している例⁷⁾を参考にし、フジマメにおいても cotyledonary node を材料として植物体の再生を試みたところ、成功したのでここに報告する。また併せて行った茎頂培養の試験結果も併記する。

2. 材料と方法

(1) cotyledonary node からの植物体の再生

供試品種は白花種を用いた。種子を70%アルコールで10秒間浸漬後、2%の次亜塩素酸ソーダ液で15分間浸漬殺菌し、その後滅菌水で3回洗浄した。その滅菌種子を Table 1 に掲載した A, B, C 各試験区の発芽処理培地へ播種した。播種の方法は各試験区とも培地を 30 ml づ

つ入れた 100 ml の三角フラスコに 1 本当たり 5 個づつ、4 反復、1 区 20 個播種した。seedling よりの cotyledonary node の採取法は Fig. 1 に図解しているとおりである。再分化培地への cotyledonary node の移植法は各試験区とも培地を 30 ml づつ入れた 100 ml の三角フラスコに 1 本当たり 5 個づつ、4 反復、1 区 20 本移植した。移植 1 カ月後に cotyledonary node の部分より発生した shoot の数ならびに長さを測定した。

培地は MS 培地に BA (0.2, 1.0, 5.0, 10.0, 20.0 mg/l) を添加後、ショ糖を 30 g/l 添加し、0.1N の NaOH もしくは HCl で pH を 5.8 に調節後、寒天を 8 g/l 溶かして 100 ml の三角フラスコに 30 ml づつ分注し、その後オートクレーブで 120°C, 1.25 気圧, 15 分間の滅菌処理をして作った。また他のホルモンフリー、BA 0.2 mg/l を含んだ MS 培地の作成法も同様である。

培養条件は発芽処理培地、cotyledonary node 培養培地とも温度 25°C, 照度 3,000 lux, 12 時間照明である。

(2) 茎頂培養

供試品種は白花種を用いた。種子を70%アルコールで10秒間浸漬後、2%の次亜塩素酸ソーダ液で15分間浸漬殺菌し、その後、滅菌水で3回洗浄する。その滅菌した

Table 1. The kinds of culture method.

Experimental plot	Germination of seed	Regeneration of bud or shoot ^a
A	0.2, 1.0, 5.0, 10.0, 20.0 mg/l BA 2 weeks	^b 0.2 mg/l BA 1 month
B	0.2, 1.0, 5.0, 10.0, 20.0 mg/l BA 1, 2, 3 weeks	0.2 mg/l BA 1 month
C	without BA 1 week	0.2, 1.0, 5.0, 10.0, 20.0 mg/l BA 4 weeks

^a The cotyledonary node segments excised from germinated seedling were cultured.

^b The segments were cultured once on the medium as same condition of germination for 4 weeks, and thereafter transferred on MS medium containing 0.2 mg/l BA and cultured during 1 month.

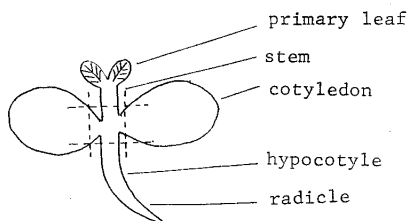


Fig. 1. The region of cotyledonary node cutted from seedling of lablab bean
Dot line indicates the region of cotyledonary node.

種子をホルモンフリーの MS 培地 30 ml を入れた 100 ml の三角フラスコに播種した。温度 25°C, 照度 3,000 lux, 16 時間照明の条件で培養後、胚軸が 2 cm 程度に伸びた時期に三角フラスコより取り出し、実体顕微鏡下で、無菌的に子葉を割って、メスで 0.5~0.6 mm 程度の大きさの 2 枚の葉原基をつけた茎頂を摘出し、材料に供試した。

培地は MS 培地の無機養分に B5 培地の Vitamin を加え、それにショ糖 30 g/l と、NAA 単独添加 (0, 0.02, 0.2, 1.0, 2.0 mg/l) 並びに BA 単独添加 (0, 0.02, 0.2, 1.0, 2.0 mg/l) それに NAA (0.02, 0.2, 2.0 mg/l) と BA (0.02, 0.2, 2.0 mg/l) の組み合わせそれぞれを添加して、cotyledonary node segment の場合と同様の方法で、21×100 mm の試験管に 10 ml ずつ分注して作製した。試験区は 1 区 10 反復、1 試験管に 1 個の割合で茎頂を置床した。培養条件は温度 25°C, 照度 3,000 lux, 16 時間照明で行った。調査は茎頂置床 1 カ月後に行った。

3. 結果ならびに考察

(1) cotyledonary node からの植物体の再生

当初、サイズで効果のあった A 法と B 法 (Table 1) とを比較したところ (双方とも発芽処理期間を 2 週間とした)、A 法の場合は cotyledonary node も発芽処理培地

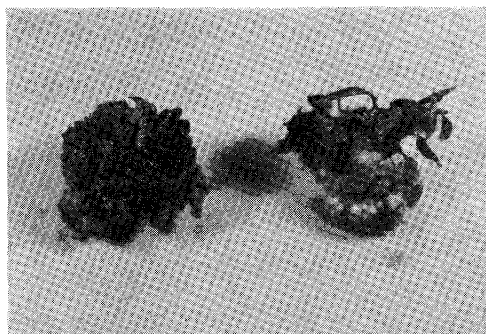


Fig. 2. Multiple buds formed from cotyledonary nodes.

Cotyledonary node excised from seedling cultured on the germination medium containing high BA concentration was cultured on the medium containing same BA concentration; left side: BA 20.0 mg/l, right side: BA 0.2 mg/l.

と同じ BA 濃度上で培養するため、B 法に比べて bud の形成数は非常に多かったが (Fig. 2), BA 0.2 mg/l の培地へ移植してからの shoot の発生数は B 法に劣った。そこでその後 B 法についてのみ発芽処理の期間を変えて検討を行い、併せて比較として C 法の検討を行った。

B 区における播種 1 週間後の seedling の生育状況は BA 0.2 mg/l 区が一番細く、長く、BA の濃度が濃くなるにつれて太く、短くなった。置床 2 週間後、3 週間後における seedling の生育状況は 1 週間後より太く、長くなったが、BA 10 mg/l 区の長さが BA 0.2 mg/l 区の次に長くなった以外は 1 週間後と同様の傾向にあった (Fig. 3: 置床 2 週間後)。

seedling より cotyledonary node の部分を切り出して BA 0.2 mg/l の培地へ移植すると 2 週間目当たりより cotyledonary node の子葉の基部と茎の基部に挟まれた腋の部分に bud が形成されたが、その数は発芽処理の期間に関係なく、発芽処理培地の BA 濃度が高くな

Table 2. Effect of high BA concentration in germination medium on bud formation and shoot formation from cotyledonary node region of lablab bean.

Experimental plot	Culturing term in germination medium (week)	BA concentration (mg/l) in germination medium									
		0.2		1.0		5.0		10.0		20.0	
		shoot number	shoot length (cm)	shoot number	shoot length (cm)	shoot number	shoot length (cm)	shoot number	shoot length (cm)	shoot number	shoot length (cm)
A		4.0	2.0	2.0 _{+4.0}	1.6	0.5 _{+11.0}	0.9	0.3 _{+15.1}	1.3	1.0 _{+19.1}	0.9
B	1	3.0	1.5	5.5	2.0	4.5	2.8	2.0 _{+5.0}	1.0	2.0 _{+4.8}	1.6
	2	3.2	1.8	2.7	2.0	8.4 _{+1.6}	3.0	7.4 _{+4.2}	2.3	11.6 _{+2.0}	2.2
	3	3.4	1.9	5.0	1.4	5.4 _{+2.3}	2.0	6.2 _{+6.2}	1.9	7.0 _{+7.0}	0.8
C#		2.0	1.4	2.2	0.6	0 _{+0.4}	—	0 _{+5.0}	—	0 _{+5.0}	—

* Small figure: mean number of bud.

Seed were germinated without BA, and excised cotyledonary segments were cultured on the medium containing various concentration of BA as indicated above.

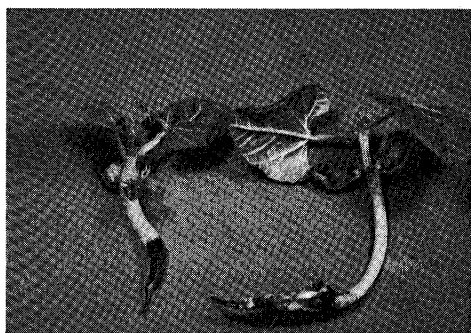


Fig. 3. Seedlings of lablab bean germinated after 2 weeks culture on the medium containing 20.0 mg/l (left) and 0.2 mg/l (right) BA.



Fig. 4. Multiple shoot formed from cotyledonary node segments.

Cotyledonary node segments excised from seedling germinated on the medium containing 10.0 mg/l (left) and 0.2 mg/l (right) BA were transferred to the medium containing BA 0.2 mg/l.

るほど多くなった。Table 2 に cotyledonary node を BA 0.2 mg/l の培地へ移植してから1カ月後の node segment からの shoot の発生数ならびに shoot 数を掲載しているが、shoot の発生数を比較すると発芽処理の期間が2週間のものが一番多く、次に3週間、1週間の順となった。この3週間目のものが2週間目のものに劣ったことについては、3週間目のものは bud 数は優っていたが、shoot 発生数が少なかったためと考えられる。また shoot の発生数を BA 濃度で比較すると1週間の発芽処理では BA 1.0 mg/l が一番多く、2、3週間では BA 20.0 mg/l が一番多かった (Fig. 4)。

shoot の長さについては、発芽処理の期間で比較すると1、2、3週間ともあまり変わらず、また BA 濃度間で比較すると、発芽処理の長さに関係なく、BA 5.0 mg/l が一番長く、それより濃度が濃くなるか、薄くなるにつれて短くなった。またC区でも seedling を BA 処理し

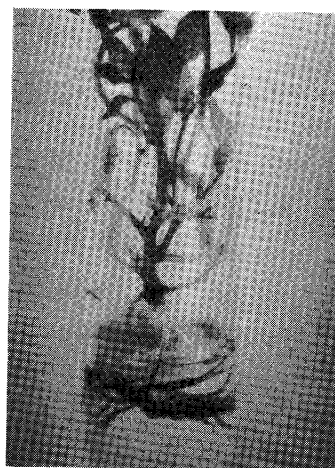
ていないにもかかわらず、B区と同じ位置に bud が形成されたが、その数は全体的にB区より少なく、shoot の形成も BA 1.0 mg/l 以下でしか認められず、全体的にB区の方法に劣った。以上の試験区で形成した shoot を分割して NAA (0.02, 0.2, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0 mg/l) の各濃度を含んだ培地へ移植したところ、NAA 0.2 mg/l の培地での root 形成が一番盛んであり、一カ月後に植物体が形成された (Fig. 5)。

以上のとおり、フジマメでもダイズと同様に cotyledonary node の segment より多数の shoot を再生させることができた。しかしフジマメでもダイズで効果のあったA法で、多数の bud を形成させ、ジベレリン等を使用して shoot を形成させることができれば、B法よりも shoot 数が増えると考えられる。これは今後の検討

Table 3. Effects of NAA and BA combination on the morphogenetic response of meristem of lablab bean.

NAA (mg/l)	BA	Whole plant regeneration (%)	Shoot formation		Callus ^a formation	Root ^b formation
			number	length (cm)		
0	0	0	2	1.00	—	—
0.02	0	0	3~4L	0.43	—	—
0.2	0	30.0	2	2.50	—	++
1.0	0	0	3~4L	0.83	+	—
2.0	0	0	4~5L	0.88	++	—
0	0.02	0	2~4	1.02	—	—
0	0.2	0	4~6	1.06	—	—
0	1.0	0	6~8L	0.32	—	—
0	2.0	0	7~9B	—	—	—
0.02	0.02	0	MB	—	##	—
0.02	0.2	30.0	2	1.03	—	++
0.02	2.0	0	2~4L	0.32	##	—
0.2	0.02	30.0	2	2.60	##	++
0.2	0.2	0	2~4	0.44	++	—
0.2	2.0	0	2~4L	0.36	++	—
2.0	0.02	0	1	1.06	##	—
2.0	0.2	0	2~3L	0.43	##	—
2.0	2.0	0	2L	0.56	++	—

^{a, b} — : no, + : slight, ++ : moderate, ## : profuse, L : leafy shoot, B : bud, MB : many buds.

**Fig. 5.** Plantlets formed from cotyledonary node segment.**Fig. 6.** Plantlet formed from meristem on the medium containing 0.2 mg/l NAA.

課題である。

(2) 茎頂からの植物体の再分化について

ホルモン無添加区では茎頂置床2週間後より、2本の leaf primordium (葉原基) がそのまま伸長したが、根の形成はなかった。NAA 単独添加区では、茎頂置床3週間後には各区で茎頂に変化が現われ、leaf primordium は大きくなり始め、茎頂の表面より bud が形成された。中でも NAA 0.2 mg/l 区の bud は伸長が早く同時に発

根も始まり、置床1カ月後には2~3 cm の plantlet が形成された (Fig. 6)。また他の NAA 0.02, 1.0, 2.0 mg/l 区では3~5の葉状の shoot が形成されたが、これはあまり伸長せず、1 cm 以内の長さにとどまった。しかし、これらの区では根の形成はなかった。また NAA 1.0~2.0 mg/l 区では茎頂置床2週間目よりカルス形成も始まり、NAA 濃度の高いほどカルス量は多かった。

次に BA 単独添加区では、やはり茎頂置床約3週間後

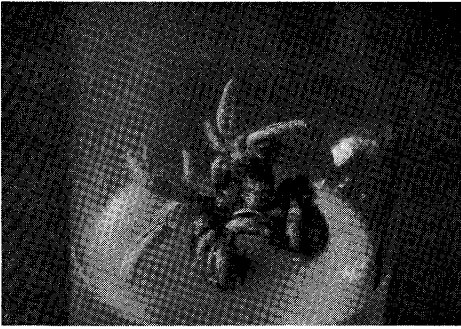


Fig. 7. Multiple buds formed from meristem on the medium containing 0.2 mg/l BA.

より、各区で茎頂に変化が現われ、leaf primordium 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 (Fig. 7)。bud の数は BA の濃度に比例し、BA 0.02 mg/l 区では 2~4 個、0.2 mg/l 区では 4~6 個、1.0 mg/l 区では 6~8 個、2.0 mg/l 区では 7~9 個であり、その内 BA 0.2 mg/l の濃度以下では bud が徐々に伸長して茎葉が形成され、1 カ月後には BA 0.02、0.2 mg/l 区とも 1 cm 程度の大きさに達した。しかし、BA 1.0 mg/l 以上の濃度ではあまり伸長せず、BA 1.0 mg/l 区では葉状の shoot が 0.2~0.4 cm の大きさにできた程度であり、また BA 2.0 mg/l 区では bud の範囲にとどまった。しかし、いずれの区も根、カルス形成は認められなかった。

NAA と BA の濃度を組み合わせた区では、茎頂置床 3 週間目より茎頂が肥大し、周辺に bud が形成されたが、その内 NAA 0.02 mg/l+BA 0.2 mg/l 区と NAA 0.2 mg/l+BA 0.02 mg/l 区では bud の生長が早く、

shoot が形成され、1 カ月後には前者で 1 cm 前後、後者で 2~3 cm 程度に達し、また根も形成されて plantlet が形成された。また NAA 2.0 mg/l+BA 0.02 mg/l 区では前二者と同じく、bud の生長が早く、1 カ月後には 1 cm 前後の single shoot が形成されたが、根は形成されなかった。また NAA 0.2 mg/l+BA 0.2 mg/l 区では 2~4 個の shoot が形成されたが、伸びは悪く、また根の形成もなかった。その他 NAA 0.02 mg/l、NAA 0.2 mg/l+BA 0.2 mg/l、NAA 0.2 mg/l+BA 2.0 mg/l、NAA 2.0 mg/l+BA 0.2 mg/l、NAA 2.0 mg/l+BA 2.0 mg/l の区ではだいたい 2~4 個の葉状の shoot が形成されただけであり、長さも 0.2~0.6 cm と伸長も悪かった。またいずれも根の形成はなかった。また全体的に NAA と BA を組み合わせた区では NAA 0.02 mg/l+BA 0.2 mg/l 区を除いてカルスの形成量が多かった。

文 献

- 1) Kimball, S. L., E. T. Bingham, 1973. *Crop Sci.*, **13**: 758-760.
- 2) Malmberg, R. L., 1979. *Planta*, **146**: 243-244.
- 3) Mroginski, L. A., K. K. Kartha, 1981. *Plant Cell Rep.*, **1**: 64-66.
- 4) Pittman, R. L., 1981. *Disertation Abstracts International*, **B42**: 1690.
- 5) Kartha, K. K., K. Pabl, N. L. Leung, L. A. Mroginski, 1981. *Can. J. Bot.*, **59**: 1671-1679.
- 6) Ozaki, K., 1985. *Plant Tissue Cult. Lett.*, **2** (2): 59-62.
- 7) Cheng, T. Y., H. Saka, T. H. Voquioinh, 1980. *Plant Sci. Lett.*, **19**: 91-99.

Summary

Plant Regeneration from Cotyledonary Node Segment and Meristem Culture of Lablab Bean [*Lablab purpureas* (L.) SWEET]

Koichi OZAKI

*Crop Division, Okayama Agricultural Experimental Station,
Koda, Sanyo-cho, Akaiwagun, Okayama, Japan*

Multiple shoots were formed from cotyledonary node segments of lablab bean (*Lablab purpureas* (L.) SWEET) seedlings which had been cultured on Murashige and Skoog medium containing high concentration of BA and then were cultured on the medium containing 0.2 mg/l BA.

Plantlets were also formed from shoot meristems of lablab bean on the medium containing MS mineral, B5 vitamins and 0.2 mg/l NAA or 0.02 mg/l NAA+0.2 mg/l BA or 0.2 mg/l NAA+0.2 mg/l BA. Multiple shoot and multiple bud were formed from shoot meristem of lablab bean seedling cultured on the medium containing MS mineral, B5 vitamin and 0.02-2.0 mg/l BA.