

エンドウ品種アラスカの葉外植片からの カルス誘導と植物体再生

橋本尚子・橋本忠明・山田哲治・白石友紀・奥 八郎

岡山大学農学部植物病理学研究室
(〒700 岡山市津島中 1-1-1)

(1989年4月6日受付)

(1989年7月10日受理)

植物の病原体に対する防御反応のひとつに、ファイトアレキシンと呼ばれる抗菌性物質の生産がある。ファイトアレキシン生産やその他の抵抗性反応の発現には植物個体が必要な場合もあるが、ダイズ¹⁾、ニンジン²⁾、インゲン³⁾ などでは培養細胞においても発現することが報告されている。しかしながらエンドウにおける培養細胞系を用いたファイトアレキシン合成、あるいはその代謝機構の研究では、Bailey の報告⁴⁾ を除いてはほとんど見当たらない。本研究では、エンドウ培養細胞系を用いたファイトアレキシン合成の研究の前段階として、カルス誘導ならびに植物体の再生に関する基礎的条件を明らかにしたので報告する。

エンドウ (*Pisum sativum* L.) の品種アラスカを 20 ± 2°C, 4,000~5,000 lux の全日長条件下で1カ月間栽培し、上位の比較的若い葉を採取した。これを70% エタノールに3分間、次に0.1% Tween 20 を含む次亜塩素酸ナトリウム (2.5% Cl) に5分間浸漬し、その後滅菌水で4回洗浄して、0.5~1 cm² の葉断片を作製した。これを外植片とし、2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) あるいは indole-3-acetic acid (IAA) と kinetin を添加した Murashige-Skoog (MS) の培地⁵⁾ (pH 5.7, gellan gum 0.2%) に置床し、20°C, 4,000 lux の全日長照明下で培養した。供試数としては、それぞれのホルモン濃度区を5本ずつの培養瓶で、培養瓶1本につき10断片置床し、1区につき合計50断片の葉外植片となるようにした。カルスが誘導された場合には、カルスのみを切断して同一組成の培地に移植し、20日間隔で継代培養した。

まず、2,4-D (0.01~2.0 mg/l) と kinetin (0.1~2.0 mg/l)、あるいは IAA (0.01~0.1 mg/l) と kinetin

(0.1~2.0 mg/l) を組み合わせた濃度区をそれぞれ90とおりに設けて培地に加え、それぞれ50断片の葉外植片を培養した。

その結果、2,4-D と kinetin を添加した培地ではすべての濃度区において7~10日で肉眼的にカルスの形成が認められ (Table 1)、特に 1.0 mg/l 以下の 2,4-D と 1.0 mg/l 以下の kinetin を組み合わせた濃度区において活発なカルス増殖が認められた (Fig. 1-A)。このような条件下でカルスを2~3代継代した場合、12種類の濃度区において緑色小斑 (green spot) が形成され (Fig. 1-B, Table 1)、また5種類の濃度区においては培養後15~20日で活発な不定根の形成が認められた (Fig. 1-C, Table 1)。しかしながらいずれの濃度区からも shoot の分化は誘導されず、エンドウ葉外植片カルスからの shoot の分化には 2,4-D と kinetin を組み合わせた培地は適さないものと考えられた。そこで、2,4-D (0.1 mg/l) と kinetin (0.5 mg/l) を添加した培地上で得た緑色小斑を含むカルスを、IAA (0.01~0.1 mg/l) と kinetin (0.1~1.0 mg/l) を組み合わせて作成した50とおりの濃度区をもつ培地に移植した (Table 2)。その結果、IAA と kinetin の濃度をそれぞれ 0.01 と 0.1, 0.04 と 0.5, 0.05 と 0.5 および 0.05 と 0.6 mg/l とした濃度区において、緑色小斑はさらに肥大生長を続け、黄緑色から濃緑色に変化するとともに移植後25~30日には小斑部から shoot の形成が認められた (Fig. 1-D)。また、IAA (0.01, 0.05 mg/l) kinetin (0.1, 0.5 mg/l) を含む濃度区においては shoot 形成と同時に根の分化も認められ、完全な再生体を得ることができた (Fig. 1-E)。また、その他の濃度区で得られた shoot は小葉が十分に展開した時点で、ホルモ

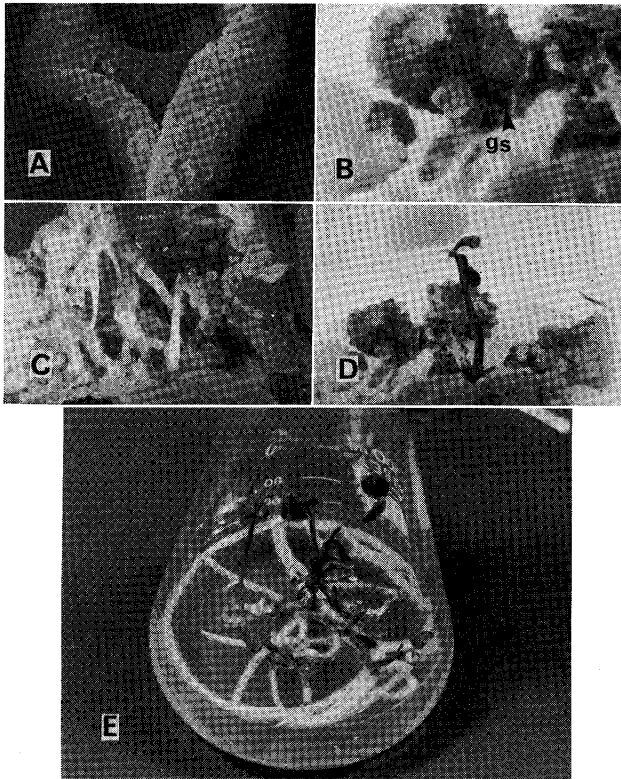


Fig. 1. Plant regenerated from callus tissues. (A) Callus tissues induced from leaf-explants on Murashige-Skoog (MS) medium supplemented with 2,4-D (0.1 mg/l) and kinetin (0.5 mg/l). (B) Green spot (gs) formation in callus tissues. Green spots were formed 33 days after transferred to a fresh MS medium supplemented with 0.1 mg/l 2,4-D and 0.5 mg/l kinetin. (C) Formation of adventitious roots from callus tissues in second generation of subculture on MS medium supplemented with 0.1 mg/l 2,4-D and 0.1 mg/l kinetin. (D) Shoots development from green spots after transferred to MS medium supplemented with 0.04 mg/l of IAA and 0.5 mg/l of kinetin. (E) Root formation in shoot, 22 days after incubation.

Table 1. Effect of 2,4-D and kinetin on callus induction and green spot formation.^a

Concentration of kinetin (mg/l)	Concentration of 2,4-D (mg/l)							
	0.01	0.05	0.1	0.3	0.5	0.8	1.0	2.0
0.1	C ^b (gs ₂₄ ^c , r ₈₃)	C(g _{s28})	C(r ₇₀)	C(g _{s37})	C	C(g _{s11})	C(b)	C
0.5	C(g _{s38})	C(g _{s44})	C(g _{s67} , r ₁₈)	C	C	C	C	C(b)
0.6	C	C(g _{s36})	C(g _{s38})	C	C	C	C(b)	C
0.8	C(g _{s18} , r ₇₉)	C(g _{s31})	C	C	C	C	C(g _{s9})	C
1.0	C	C	C(r ₄₂)	C	C	C	C	C
1.2	C	C	C	C	C	C	C	C
1.3	C	C	C	C	C	C	C	C
1.5	C	C	C	C	C	C	C	C
2.0	C	C	C	C	C	C	C	C

^a Various concentrations of 2,4-D and kinetin were added to Murashige-Skoog basal medium (0.2% gellan gum). Leaf-explants were incubated at 20°C under a constant illumination of 4,000~5,000 lux.

^b Abbreviations are as follows. C: Callus induction from leaf-explant, b: Browning of the tissue where further growth was not observed, gs: Green spot formation from callus, r: Formation of adventitious root from callus.

^c Numbers in parentheses represent;

$$\frac{\text{the number of callus formed adventitious root or green spot}}{\text{the total number of callus pieces}} \times 100 (\%)$$

Table 2. Effect of IAA and kinetin on regeneration from green spots (gs) of pea callus.^a

Concentration of kinetin (mg/l)	Concentration of IAA (mg/l)									
	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.07	0.08	0.09	0.10
0.1	G ^b (S ₁₈ ^c , r ₁₀)	G	G	G	G(r ₈)	G	G	—	b	—
0.5	G(r ₁₁)	—	—	G(S ₁₀)	G(S ₉ , r ₈)	—	—	—	G	—
0.6	—	G	—	G	G(S ₆)	—	—	—	G	—
0.8	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1.0	—	G	G	—	G	G	—	—	G	—

^a Various concentrations of IAA and kinetin were added to Murashige-Skoog basal medium (0.2% gellan gum). Green spots excised from calli were incubated at 20°C under a constant illumination of 4,000~5,000 lux.

^b Abbreviations are as follows. G: Rapid growth of green spot, b: Browning of the green spot where further growth was not observed, S: Shoot formation from green spot, r: Formation of adventitious root from green spot, —: Not changed.

^c Numbers in parentheses represent;

$$\frac{\text{the number of callus formed root or shoot}}{\text{the total number of callus pieces}} \times 100 (\%)$$

ソ無添加 MS 培地に移植したところ、移植後 7~10 日で根が分化した。IAA-kinetin 培地に緑色小斑を移植した場合、カルスも少しずつ生育を続けたが小斑部の生育が顕著で細胞の配列も密であった (Fig. 2)。得られた再生植物体は通常の栽培環境において順調に生育し、最終的には花芽を形成し、種子を生産した。一方、IAA-kinetin 培地で外植片を直接培養した場合、いずれの濃度区においても活発なカルスの誘導は認められず、外植片は褐変・枯死した。エンドウのカルス誘導やカルスからの植物体再生に関しては、すでにいくつかの報告がある。Hussey と Gunn⁶⁾ は 5 品種の胚組織を用いて、また Malmberg⁷⁾ は、16 品種の発芽種子の上胚軸からカルス誘導とその植物体再生について報告しているが、本実験に用いた品種アラスカについては shoot 分化の形成を得ることができなかった。Mroginski と Kartha⁸⁾ は未熟な小葉を、Griga ら⁹⁾ は腋芽を、そして Kysely ら¹⁰⁾ は未熟胚と茎の生頂点を用いて再生に成功しているが、いずれの場合もカルスをほとんど経由せずに再生している。また、Eriksson のグループ^{11,12,13)} は 10 品種の葉や上胚軸からプロトプラストを調製し、その培養条件や再生条件を明らかにしており、その再生条件で成熟した葉断片からの植物体再生を試みたところ、アラスカ品種においてはカルスは誘導されたものの shoot の形成は認められなかった。著者らは葉外植片だけでなく完熟胚を用いて同様の実験を試みたところ、2,4-D と kinetin のいずれの濃度区においてもカルスが誘導され、2~3 代継代した後 IAA-kinetin 培地に移植した場合、緑色小斑から shoot への分化が確認された。し

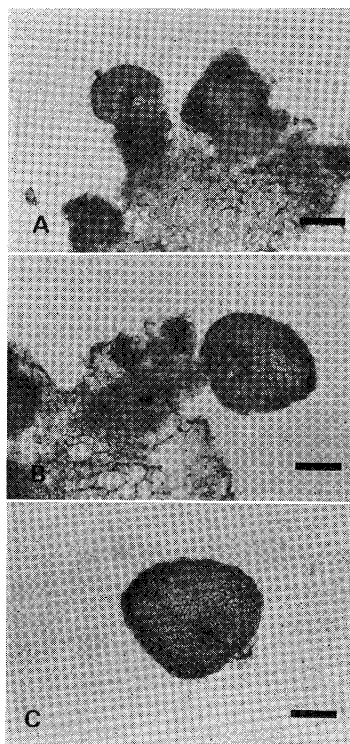


Fig. 2. Characteristics of green spots from pea callus tissues at early stage (A), middle stage (B) and the late stage (C) after transfer to MS medium supplemented with IAA (0.01 mg/l) and kinetin (0.1 mg/l). Bars represent the length of 0.5 mm.

かしながら、完熟胚を IAA-kinetin 培地に直接置床した場合、すべての区においてカルスを經由せずに発芽、発根して通常の植物体に生長した。現在は、ここで確立された培養条件を基本として培養細胞におけるファイトアレキシン合成について検討している。

本研究の経費の一部は文部省科学研究補助金（課題番号 62480045, 62560044）と岡山大学教育研究特別経費によった。

文 献

- 1) Köhle, H., H. David, H. Kauss, 1984. *Plant Sci. Lett.*, **33**: 221-230.
- 2) Kurosaki, F., K. Futamura, A. Nishi, 1985. *Plant Cell Physiol.*, **26**: 693-700.
- 3) Dixon, R. A., K. W. Fuller, 1978. *Physiol. Plant Pathol.*, **12**: 279-288.
- 4) Bailey, J. A., 1970. *J. Gen. Microbiol.*, **61**: 409-415.
- 5) Murashige, T., F. Skoog, 1962. *Physiol. Plant.*, **15**: 473-497.
- 6) Hussey, G., H. V. Gunn, 1984. *Plant Sci. Lett.*, **37**: 143-148.
- 7) Malmberg, R. L., 1979. *Planta*, **146**: 243-244.
- 8) Mroginski, L. A., K. K. Kartha, 1981. *Plant Cell Rep.*, **1**: 64-66.
- 9) Griga, M., E. Tejklová, F. J. Novák, M. Kubaláková, 1986. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, **6**: 95-104.
- 10) Kysely, W., J. R. Myers, P. A. Lazzeri, G. B. Collins, H. J. Jacobsen, 1987. *Plant Cell Rep.*, **6**: 305-308.
- 11) von Arnold, S., T. Eriksson, 1976. *Physiol. Plant.*, **36**: 193-196.
- 12) von Arnold, S., T. Eriksson, 1977. *Physiol. Plant.*, **39**: 257-260.
- 13) Puonti-Kaerlas, J., T. Eriksson, 1988. *Plant Cell Rep.*, **7**: 242-245.

Summary

Callus Induction and Plant Regeneration from Pea (*Pisum sativum* L. cv. Alaska) Leaf-Explants

Hisako HASHIMOTO, Tadaaki HASHIMOTO, Tetsuji YAMADA,
Tomonori SHIRAIISHI and Hachiro OKU

*Laboratory of Plant Pathology, Faculty of Agriculture,
Okayama University, Tsushima, Okayama, 700, Japan*

Callus tissue was induced from pea leaf-explants on a Murashige-Skoog (MS) medium containing 2,4-D (0.01~2.0 mg/l) and kinetin (0.1~2.0 mg/l). Adventitious roots and green spots were formed on the same medium within 40-days of culture. Shoot formation from green spots and subsequent growth were observed when the excised green spots were transferred to a fresh MS medium containing IAA (0.01, 0.04, 0.05 mg/l) and kinetin (0.1, 0.5, 0.6 mg/l).