

## バラ葉外植片からのカルス誘導と個体再生系の確立

豊田秀吉\*・吉田健二\*・緒方陽子\*・森川芳恵\*・  
是枝一春\*\*・茶谷和行\*\*・大内成志\*

\*近畿大学農学部植物病理学研究室

(〒631 奈良市中町 3327-204)

\*\*株式会社第一園芸プランテックバイオ研究室

(〒410-13 静岡県駿東郡小山町上野 1101-8)

(1993年6月23日受付)

(1993年8月16日受理)

体細胞変異選抜法などの細胞工学的手法を用いて植物の品種改良を行う場合には、使用する植物の培養系を確立することが必須の条件となるが<sup>1)</sup>、バラの場合には、品種の多様性もあって、必ずしも効率的な細胞・組織培養系が確立されておらず、上述のような品種改良が容易に行えないのが現状である。そこで、本研究では、バラ葉外植片からのカルス誘導とその個体再生条件について検討し、バラにおける組織培養系を確立することとした。ただ、通常の栽培条件で育成したバラでは、その栽培条件や aging を均一にすることが困難であるため、本実験では、まず、茎頂培養法を導入して *in vitro* で個体を増殖させ、得られた個体の葉外植片を用いて、培養条件を明らかにすることとした。

本実験にはバラ (*Rosa hybrida*) の品種 Carl Red (CR) を供試した。まず、通常のガラス温室で栽培した CR から側枝 (本葉が未展開で 2~3 cm の側枝) を切り出し、70% のエタノールと 1% の次亜塩素酸ナトリウムで表面滅菌した後、滅菌水で数回洗浄し、実体顕微鏡下で茎頂組織 (1×1 mm) (Fig. 2-A) を摘出し、それを Murashige-Skoog<sup>2)</sup> (MS) 培地 (pH 5.7) に置床して、26°C、4,000 ルックスの全日長照明下で培養した。MS 培地に添加する植物成長調節物質としては、Hasegawa<sup>3)</sup> および Bressan ら<sup>4)</sup> の報告に従って benzylamino purine (BA) を使用した。しかしながら、CR の茎頂培養に及ぼす BA の影響についてはまったく不明であったため、まず、BA 添加培地で茎頂組織を培養し、個体の分化、成育に及ぼす BA 濃度の影響につい

て検討した。その結果、いずれの濃度区においても、置床したすべての茎頂組織から幼苗 (shoot) 形成が認められたが、その成育速度には濃度区間で顕著な差異が認められたので、もっとも良好な成育が観察された 1.0  $\mu\text{g/ml}$  添加区を最適濃度区とした (Fig. 1)。この濃度区では、培養 4 週間で第 1~6 節葉が形成されたので、

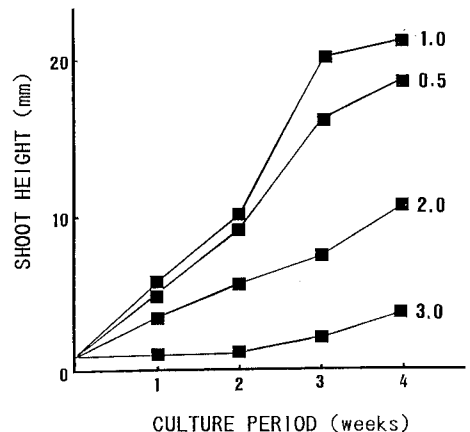


Fig. 1 Growth of shoots excised from axillary buds of rose (*Rosa hybrida* cv. Carl Red) plants in the presence of BA. Numbers in the figure represent concentrations ( $\mu\text{g/ml}$ ) of BA. Ten shoot apices were cultured in each BA concentration and the means of shoot height and their standard deviation were obtained from three separate replications of the complete experiment.

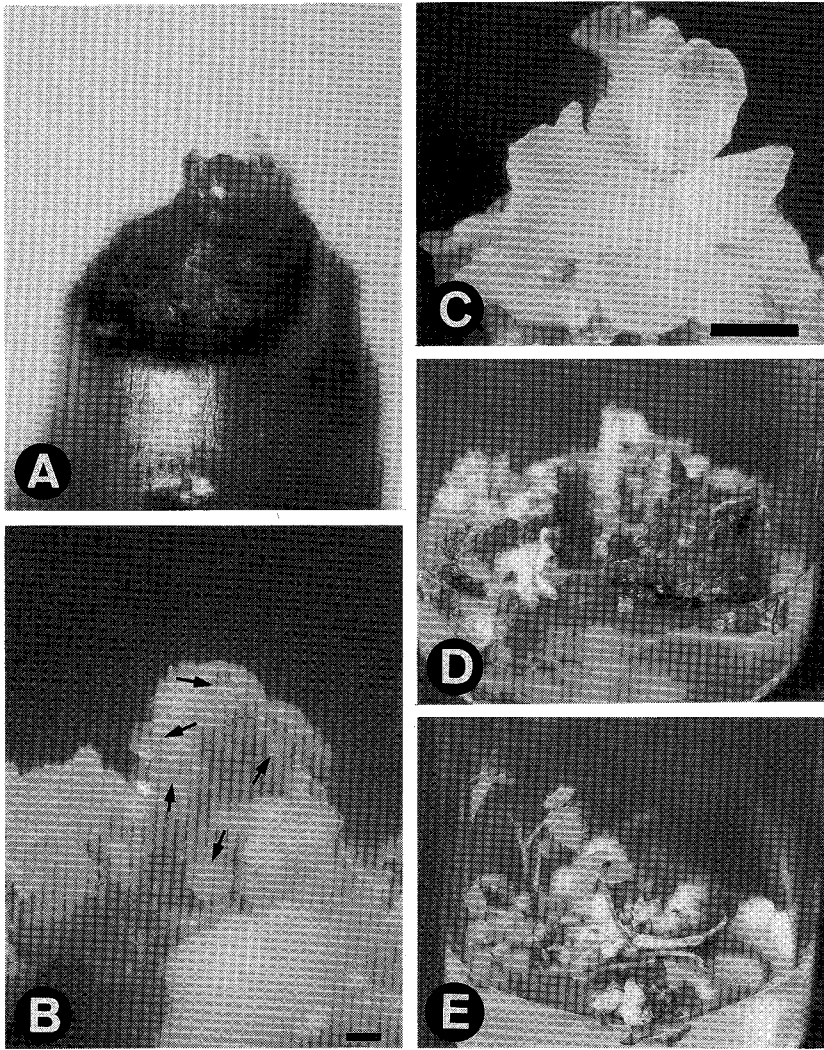
**Table 1.** Effects\*<sup>1</sup> of plant growth regulators on callus induction and morphogenesis from leaf-explants obtained from axillary bud-cultured plants of rose (*Rosa hybrida* cv. Carl Red).

Concentrations of NAA ( $\mu\text{g/ml}$ )	Concentrations of BA ( $\mu\text{g/ml}$ )							
	0	0.001	0.0025	0.005	0.0075	0.01	0.05	0.1
0.05	R	CsR	CsR	CsR	CsR	CsR	Cs	Cs
0.1	CsR	CsR	CsR	CsR	CsR	CsR	Cs	Cs
0.25	CsR	CsRS	CsRS	CsRS	CsRS	CsRS	Cs	Cs
0.5	CgR	CsR	CsRS	CsRS	CsRS	CsRS	Cs	Cs
0.75	CgR	CsR	CsR	CsR	CsR	CgR	Cg	Cs
1.0	CgR	CgR	CsR	CsR	CsR	CgR	Cg	Cg
1.25	CgR	CgR	CgR	CgR	CgR	CgR	Cg	Cg
1.5	CgR	CgR	CgR	CgR	CgR	CgR	Cs	Cs
2.0	CgR	CgR	CgR	CgR	CgR	CgR	Cs	Cs
2.5	CR	CgR	CgR	CgR	CgR	CgR	Cs	Cs

\*<sup>1</sup> Leaf-explants were cultured on MS medium containing NAA and BA, and morphological changes, such as callus induction, shoot formation (S), and adventitious root formation (R), were scored 30 days after incubation. Note that adventitious roots were induced from both slowly proliferating (Cs) and vigorously growing callus tissues (Cg), and that shoots were differentiated from Cs, but not from Cg.

第6節の展開直後の小葉を外植片とし、以後のカルス誘導に用いた。上記で得た小葉を2片に横断し、1濃度区当たり10個の外植片をMS培地に置床して、26°C、暗所で培養した。培地に添加する植物成長調節物質としては、0.05~2.5  $\mu\text{g/ml}$  の *a*-naphthaleneacetic acid (NAA) もしくは indole-3-acetic acid (IAA) と 0~0.1  $\mu\text{g/ml}$  の BA を用い、両者を組み合わせた合計 80 とおりの実験区を設けた。観察する形態変化としては、外植片からのカルス誘導、カルス組織からの個体再生および不定根形成をとりあげ、5片以上の外植片で観察され、かつ反復実験(4回)で再現された形態変化をそれぞれの濃度区における培養結果とした。まず、オーキシンとサイトカイニンの組み合わせを IAA と BA として葉外植片を培養した場合、いずれの実験区においても、培養 7~10 日後に外植片からカルス組織が誘導され、さらに 2 週間が経過した時点で、ほとんどすべての実験区でカルス組織から不定根が形成された。しかしながら、これらの実験区では、培養をさらに継続してもカルスの増殖は観察されたものの、カルス組織からの個体再生は認められなかった。そこで、培地に添加するオーキシンを NAA とし、上記と同様に葉外植片を培養した。結果を Table 1 に示す。外植片からのカルス誘導は培養 10 日前後でほぼ全ての濃度区で観察されたが、BA 濃度を 0.01  $\mu\text{g/ml}$  以下とした実験区では、培養開始 20 日程度でカルスから不定根が形成された。一方、NAA の濃度を 0.25 もしくは 0.5  $\mu\text{g/ml}$  とし、BA 濃度を 0.001

~0.0075  $\mu\text{g/ml}$  とした実験区では、不定根形成後 10 日前後で不定芽が形成され (Fig. 2-B), 特に、NAA と BA の濃度をそれぞれ 0.25 と 0.005  $\mu\text{g/ml}$  とした区ではもっとも高い不定芽形成率(置床カルス塊当たり 20%) が得られた。このような不定芽は単一カルス塊に 5~8 個形成され、さらに培養を継続すると、培養開始 40~45 日後には Fig. 2-C に示すような白色のラッパ状葉原基集塊が形成された。この時点で、ラッパ状の葉原基集塊を分割し、上述の再生培地 (1.0  $\mu\text{g/ml}$  の BA を添加した MS 培地) に移植し、26°C、4,000 ルックスの全日長下で培養したところ、移植 2 週間後には葉原基が緑化し、さらに 2 週間後には 5~7 本の shoot が新たに形成された (Fig. 2-D)。このような shoot の形成率は 90~95% であった。shoot の茎部が 2 cm に伸長した時点で各個体を分割し、同一培地に移植・継代したところ、移植 10 日後には Fig. 2-E のような成育良好な幼植物体が得られた。バラ shoot の発根最適培養条件については、すでにいくつかの研究報告がある。Hydnman ら<sup>5)</sup> は MS 培地の無機塩類濃度を低下させることで発根効率が向上するとしており、また Hasegawa<sup>2)</sup> は IAA や NAA の添加が発根に有効であると報告している。そこで、本実験においても、再生培地の培地強度を 1~1/4 に調製し、0.1, 0.25, 0.5 および 1.0  $\mu\text{g/ml}$  の IAA もしくは NAA を添加した培地に shoot を移植・培養した。その結果、培地に BA が存在する場合には、いずれの濃度のオーキシンを加えても発



**Fig. 2** Callus induction and plant regeneration from leaf-explants obtained from axillary bud-cultured rose (*R. hybrida* cv. Carl Red) plants.

A, Meristem tissue excised from axillary bud of rose plant grown in a greenhouse; B, Adventitious buds (arrows) induced in callus derived from leaf-explants of axillary bud-cultured rose plants (30 days after incubation on MS medium containing  $0.25 \mu\text{g/ml}$  NAA and  $0.005 \mu\text{g/ml}$  BA); C, Leaf-primordia differentiated from adventitious buds shown in B (45 days after incubation); D, Swarming shoots differentiated from adventitious buds after transfer to MS medium containing  $1.0 \mu\text{g/ml}$  BA (45 days after transfer); E, Well-developed shoots separated and subcultured on the same medium (10 days after subculture). Bars in B and C represent 1 mm and 5 mm, respectively.

根しなかったが、BAを除外して同様に培養した場合、培地強度を1/2以下、 $0.5 \mu\text{g/ml}$ 以上のIAAもしくはNAAを単独で添加した区で発根が認められた。特に、1/4強度のMS培地に $1.0 \mu\text{g/ml}$ のIAAを添加した場合にもっとも短期間(移植後10日間)で、かつもっとも高率(95%以上)にshoot基部から不定根が形成された。これらの再生個体を土壤に移植し、弱光・湿室条

件下で数日間馴化し、通常の栽培条件下で育成させたところ、対照親個体と同様の良好な育成を示した。

本研究においては、CRを使用し、茎頂培養法による個体増殖、葉外植片からのカルス誘導、カルス組織からの個体再生系を確立した。同種の研究は、de Witら<sup>9)</sup>によっても報告されており、バラ品種のDomingoやVickeyBrownでは、葉外植片を2-naphtyloxyacetic

acid およびカイネチン存在下で培養したときに、カルス組織から胚様体が形成されるとしている。しかしながら、その形成率は6%以下であり、また、胚様体から個体への再分化率も60%であった。このような結果を考慮すると、筆者らが今回報告した培養システムは、バラにおける効率的な個体再生系であると考えられる。de Witら<sup>6)</sup>が使用した品種では、BAが存在すると胚様体やshootが形成されず、さらに、Lloydら<sup>7)</sup>が *R. hybrida* を含む *Rosa* 属およびその種間雑種の培養系を検討した場合にも、*R. persica* と *R. xanthina* の雑種個体において、NAA および BA 添加培地で茎部節間由来カルスから shoot 形成が誘導されたのみで、*R. hybrida* (品種 Clarissa と Dame of Sark) からの個体再生には成功していない。このような結果から、BA が *R. hybrida* の個体再生に抑制的に作用すると考えられていたが<sup>6,7)</sup>、本研究の結果は、BA 存在下でも効率的に不定芽が形成されることを示しており、また、筆者らの予備試験では本培養条件が他のバラ品種にも適用できることを明らかにしている。このようなバラ品種間における反応性の相異は、用いた個体の遺伝的背景に影響されると考えられているが<sup>7)</sup>、BA が CR の発根誘導に抑制的に作用する点を考慮すると、培地に添加した植物成長調節

物質に対する反応性は、品種間のみならず、同一品種における組織間においても異なっている可能性がある。

筆者らの研究室では、葉多植片カルス由来再生体には多数の体細胞変異の存在することを種々の植物種について報告してきた<sup>8)</sup>。本実験で明らかにした培養系を利用することによって、バラにおいても変異の誘導と変異個体の選抜が可能となり、細胞工学的手法によるバラ品種改良の基礎条件が確立されたものと考えられる。

## 文 献

- 1) 豊田秀吉, 1990. 野菜の組織・細胞培養と育種 (西 貞夫ほか編), p.163-188, 農業図書, 東京.
- 2) Murashige, T., F. Skoog, 1962. *Physiol. Plant.*, **15**: 473-497.
- 3) Hasegawa, P. M., 1980. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **105**: 216-220.
- 4) Bressan, P. H., Y. - J. Kim, S. E. Hyndman, P. M. Hasegawa, R. A. Bressan, 1982. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **107**: 979-990.
- 5) Hyndman, S. E., P. M. Hasegawa, R. A. Bressan, 1982. *HortScience*, **17**: 82-83.
- 6) de Wit, J. C., H. F. Esendam, J. J. Honkanen, U. Tuominen, 1990. *Plant Cell Rep.*, **9**: 456-458.
- 7) Lloyd, D., A. V. Roberts, K. C. Short, 1988. *Euphytica*, **37**: 31-36.
- 8) 豊田秀吉, 1990. 化学と生物, **28**: 12-19.

## Summary

### Establishment of a System for Efficient Callus Induction and Plant Regeneration from Leaf Explants of Axillary Bud-cultured Rose Plants

Hideyoshi TOYODA\*, Kenji YOSHIDA\* Yoko OGATA\*, Yoshie MORIKAWA\*, Kazuharu KOREEDA\*\*, Kazuyuki CHATANI\*\* and Seiji OUCHI\*

\*Laboratory of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Kinki University, 3327-204 Nakamachi, Nara, 631 Japan

\*\*Plant Biotech Division, Fuji-Oyama Research Laboratory, Dai-ichi Engei Plantech, Shizuoka, 410-13 Japan

Meristem tissues were excised from axillary buds of rose plants (*Rosa hybrida* cv. Carl Red) and cultured on media containing various concentrations of BA in order to clarify the condition for micropropagation. The meristem tissues showed rapid and effective shoot formation when cultured with 1.0  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  BA. After 1 month of incubation, small leaflets of shoots were harvested and cultured on MS medium

containing either IAA and BA or NAA and BA for callus induction. Adventitious buds were frequently induced in callus tissues cultured in the presence of 0.25  $\mu\text{g/ml}$  NAA and 0.005  $\mu\text{g/ml}$  BA, and effectively differentiated into shoots when transferred to MS medium containing 1.0  $\mu\text{g/ml}$  BA. Abundant roots were formed when shoots were cultured on 1/4 $\times$  strength regeneration medium.