

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月29日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580038

研究課題名（和文） *in vitro* 全茎切断およびフェノール代謝制御による植物の再分化促進研究課題名（英文） Plant regeneration promoted by complete decapitation and controlled phenol metabolism *in vitro*

研究代表者

小田 雅行（ODA MASAYUKI）

大阪府立大学・大学院生命環境科学研究科・教授

研究者番号：50291604

研究成果の概要（和文）：組織培養法は、植物研究や育種に有効な技術であるが、多くの植物種において未確立または不安定である。そこで、効率的で安定的な新しい組織培養法として試験管の中の植物を子葉の下で切断する *in vitro* 全茎切断法を開発した。窒素欠乏条件で育成した植物体を全茎切断し、褐変を抑制する物質(AOPP)を含む培地に移植すると、更に増殖効率が高くなることが分かった。これらの成果は、多くの植物種の組織培養において再分化を効率的で安定的なものにする可能性を示している。

研究成果の概要（英文）：Tissue culture is effective in the study of plant science and breeding, but has not been established and unstable for regeneration. We developed a new tissue culture method in which hypocotyl is cut under cotyledons of a plant *in vitro*. When plant grown on a nitrogen deficient medium is cut by the method, and transplanted into a medium including a reagent to control browning (AOPP) promotes the regeneration with stability. These results show a possible adaptation of the method to many plant species.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・園芸学・造園学

キーワード：野菜・植物組織培養法

1. 研究開始当初の背景

遺伝子組み換え植物は、世界の食糧高騰、飢餓および地球温暖化を抑制するとして、世界的には導入が急速に進んでいる。しかし、植物の遺伝子組換えは、組織培養による再分化系の確立が大前提であるにも係わらず、多くの植物種において未確立または不安定である。

2. 研究の目的

研究代表者らは、圃場のトマトにおいて全茎切断（すべての茎頂の切除により茎切断面に不定芽を多数形成させる。）が、また、ラン科植物においてフェノール代謝の抑制がシュートを大量に形成させることをみつけた。これらの再分化促進法を植物の組織培養に適用して再分化の安定化と効率化を図り、将来的には有用植物の遺伝子組換え効率を

向上させる。

3. 研究の方法

共通の方法と用語の定義を以下のようにした。

無菌播種は、10%次亜塩素酸ナトリウム水溶液で15分間浸して殺菌した後、滅菌水で3回洗浄した。基本培地は、Murashige and Skoog (MS) 培地に3% sucrose および0.8% agar を加えて調整した。培養中の環境は、25°C, 16時間日長(約 $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)とした。

褐変率、生存率およびカルス形成率はすべての外殖片または全茎切断個体当たり、不定芽の形成率と形成数およびシュート形成率は生存した外殖片または全茎切断個体当たりとし、増殖効率はすべての外殖片または全茎切断個体数に対する得られた不定芽またはシュート数の倍率を表す。

(1) 全茎切断におけるフェノール代謝活性の関与

植物の切断面は、フェノール代謝産物によって保護されるが、再分化には不利と考えられた。そこで、トマトの茎切断後に切断面を被陰または1週ごとにアスコルビン酸(ASA)を葉面散布した。切断後1週ごとに抗酸化酵素として super oxid dismutase (SOD)、ascorbate peroxidase (APX)、catalase (CAT)、活性酸素として hydrogen peroxide (H_2O_2)、脂質酸化による生体膜の破壊を表す malonaldehyde (MDA)、フェノール代謝系の酵素として phenylalanine ammonialyase (PAL)、polyphenol oxidase (PPO)、peroxidase (POX) および総フェノールを測定した。

(2) AOPP による再分化の促進

フェノール代謝を抑制するために、その最上流で機能する酵素である PAL を拮抗的に阻害する L-2-aminoxy-3-phenylpropionic acid (AOPP) で処理した。

① フウラン

フウラン幼植物の上部を 0, 0.01, 0.1 および 1.0 mM の AOPP を含む培地に置床した。8週後に褐変率、生存率、不定芽形成率および不定芽形成数を調べた。

② ナス

第2~3本葉が展開した‘千両二号’の下胚軸を5mmに調整し、1.0 mg/L の BA と 0, 0.002, 0.01, 0.05 および 0.25 mM の AOPP を添加した培地に置床した。1週ごとに生存率、カルス形成率、不定芽形成率および不定芽形

成数を調べた。

(3) *in vitro* 全茎切断と従来の組織培養の比較

in vitro 全茎切断による再分化が、従来の組織培養よりも優れているか明らかにするために両法を比較した。

① トマト

‘Micro Tom’ を無菌播種し、2週後の本葉2~3枚展開時に下胚軸中央を10mm切り取り、1.0 mg/L の BA を含む培地に横方向に置床した。全茎切断では、下胚軸中央を切断した。4週後に生存率、不定芽形成率および不定芽形成数を調べた。

② ナス

‘紫水’の種子を無菌播種し、本葉1~2枚展開時に下胚軸中央で10mm長に切断して外植体とし(胚軸培養)、子葉は5mm角に調整して胚軸面を下にし(子葉培養)、それぞれ1.0 mg/L の BA を含む培地に置床した。胚軸培養では、5mm深で挿した。このとき、下胚軸中央で切断した植物体を、BA を含まない培地に移植した(全茎切断)。その後毎週、カルス形成率、不定芽形成率、シュート形成率を調べた。

(4) *in vitro* 全茎切断による再分化の品種間差異

in vitro 全茎切断による再分化の程度は、品種間で異なるか明らかにする。

ここでは、ナスを4品種供試した。‘紫水’、‘千両二号’、‘黒陽’、‘庄屋大長’の種子を無菌播種し、第3~4本葉が展開したときに全茎切断した。切断1週ごとに生存率、カルス形成率、不定芽形成率およびシュート形成数を調べた。

(5) *in vitro* 全茎切断における AOPP の効果

組織培養による再分化において AOPP の効果が認められたので、*in vitro* 全茎切断でも同様の効果があるか検討した。

① トマト

全茎切断した植物体を 0, 0.01, 0.1 および 1.0 mM の AOPP を含む培地に移植して培養した。その後、生存率、カルス形成率、不定芽形成率、シュート形成数および増殖効率を調べた。

② ナス

‘紫水’の種子を無菌播種し、第2~3本葉が展開したときに子葉直下の下胚軸で全茎切断して 0, 0.01, 0.1 および 1.0 mM の AOPP を含む培地に移植して培養した。切断1週ごとに生存率、カルス形成率、不定芽形成率およびシュート形成数を調べた。

(6) *in vitro* 全茎切断における窒素欠乏処理の効果

根におけるサイトカイニンの生合成は、土壌中の窒素が十分であると抑制された (Takei ら, 2002)。そこで、逆に培地の窒素欠乏によって不定芽形成を促進できるか検討した。

① ナス

MS 培地 (以後、N 充足培地) と、窒素成分 (KNO_3 , 1900 mg/L) を除いて 47% に減少させた培地 (以後、N 欠乏培地) にナス '紫水' を無菌播種し、3 週後に全茎切断して N 充足培地と N 欠乏培地に移植した。全茎切断後毎週、不定芽およびシュートの形成数を調べた。

② カボチャ

カボチャ '平安小菊' の種子から種皮を取り除いて無菌播種し、N 充足培地と N 欠乏培地に無菌播種した。その後、子葉が展開した植物体を全茎切断および片子葉残し全茎切断で処理して N 充足培地に移植した。培養 4 週まで毎週不定芽形成率を調べた。

4. 研究成果

(1) 全茎切断におけるフェノール代謝活性の関与

被陰、ASA とともに、再分化を促進した。そして両処理ともに、抗酸化酵素の活性を高め、 H_2O_2 、MDA、総フェノールおよび PAL 活性を低下させた。

これらの結果より、全茎切断においても組織培養と同様に、活性酸素の消去とフェノール代謝の抑制が再分化促進に有効であることが明らかになった。

(2) AOPP による再分化の促進

① フウラン

外植体の褐変率は、0 mM で 70%、1.0 mM で 3% となり、AOPP 濃度が高いほど褐変率は低下した。生存率は、0.01 mM までは 100% であったが、それを超える濃度では低下した。不定芽形成率は、0.1 mM までは 100% であったが、1.0 mM では 0% であった。不定芽形成数は、0 mM で 2.4 本であったのに対して、0.01 mM で 7.2 本と最も多かった。

② ナス

置床 4 週後の生存率は、AOPP 無添加区の 89% に対して添加区全てで 100% であった。不定芽形成率は、0 mM の 47% に対して 0.01、0.05 および 0.25 mM で 82% 以上になった。不定芽形成数は、0 mM の 4.3 個に対して 0.01 mM では 5.6 個と最も多かった。増殖効率で見ると、0 mM で 2.0 倍に対して、0.01 mM で 4.6 倍と最も高かった。

これらの結果より、培地への AOPP の添加

は、外植体の再分化を促進することが明らかになった。

(3) *in vitro* 全茎切断と従来の組織培養の比較

① トマト

生存率は、対照の胚軸培養、全茎切断ともに 80% で差はなかった。不定芽形成率は、対照で 20% に対して全茎切断では 73% と高かった。不定芽形成数は、対照で 2.0 個に対して全茎切断では 3.9 個とほぼ 2 倍になった。

② ナス

胚軸培養と全茎切断は 1 週後、子葉培養は 2 週後にカルス形成率が 100% に達した。不定芽形成は、子葉培養では認められず、胚軸培養で 2 週後に 100% の形成率に達したが、全茎切断ではそれよりも 1 週早かった。6 週後の不定芽形成数は、子葉培養では 0 個、胚軸培養では 4.1 個に対して全茎切断では 11.4 個と著しく多かった (図 1)。シュート形成数は、対照の 2.4 本に対して全茎切断では 8.1 本と多かった。

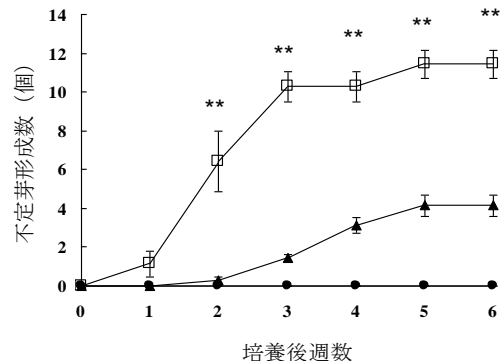


図 1 ナス胚軸からの不定芽形成数の *in vitro* 全茎切断 (□) と従来の組織培養 (●) との比較. (●) 子葉培養, (▲) 胚軸培養, (□) 全茎切断. **は t-検定による 1% 水準の有意差を、誤差線は標準誤差を表す。

これらの結果より、*in vitro* 全茎切断法は、従来の組織培養と比較してシュート形成を著しく促進することが明らかになった。

(4) *in vitro* 全茎切断による再分化の品種間差異

ナスの '紫水'、'千両二号' および '黒陽' の不定芽形成率は 100% だったのに対し、'庄屋大長' では 80% だった。切断 6 週間におけるシュート形成数は '紫水' が最も多く、続いて '千両二号'、'黒陽' そして '庄屋大長' となり、それぞれ 8.1、7.6、5.8 および 3.4 本であった。シュートの発根率は、全品種で 100% であった。

これらの結果より、*in vitro* 全茎切断は、再分化率に品種間差異があるものの、採取したシュートは全て発根する効率的な再分化法であることが示された。予備実験では、再分化しやすい品種で台木培養すると、再分化しにくい品種の再分化を促進できる可能性が示されている。

(5) *in vitro* 全茎切断における AOPP の効果
① トマト

培養 3 週間後では、AOPP の濃度にかかわらず全ての外植体が生存し、カルスを形成した。不定芽形成は、全ての濃度で認められたが、0.1 mM だけが全個体で認められた。不定芽形成数は、0.01 mM で最も多い 5.9 個であった。増殖効率は、0.01 および 0.1 mM で 4.5 倍と最も大きかった。

② ナス

切断 8 週間後の生存率およびカルス形成率は、0.1 mM AOPP までは 100%であったが、1.0 mM では 63%と低下した。不定芽は 0.1 mM までは 80%前後で形成されたが、1.0 mM では認められなかった。不定芽形成数は 0.1 mM までの範囲で高濃度ほど多くなる傾向にあった(表 1)。シュート形成数は 0 mM の 3.1 本に対して 0.1 mM で最も多い 6.2 本であった。

表 1 ナスの *in vitro* 全茎切断以降の AOPP 処理が再分化に及ぼす影響

濃度 (mM)	不定芽形成数 (個体当たり)	シュート形成数 (個体当たり)
0	10.7±0.7	3.1±0.5 ^b
0.01	11.3±1.4	6.2±0.5 ^a
0.1	12.3±1.1	4.0±0.3 ^b
1	0	0

平均値±標準誤差(4 個体×2 反復)。

^a^b間に 5%水準の有意差(Tukey の多重検定)

これらの結果より、*in vitro* 全茎切断における AOPP 処理は再分化を促進することが明らかになった。

(6) *in vitro* 全茎切断における窒素欠乏処理の効果

① ナス

不定芽形成数は、N 欠乏→N 充分区が最も多く、1 個体当たり 20.5 個、続いて N 充分→N 充分区、N 欠乏→N 欠乏区、N 充分→N 欠乏区の順となり、それぞれ 13.7, 8.4, 0 個であった(表 2)。1 cm に達したシュートは、N 欠乏→N 充分区で最も多く、形成時期も 2 週間早かった。

表 2 ナスの *in vitro* 全茎切断における切断前後の窒素栄養が再分化に及ぼす影響

培地窒素	不定芽形成数 (個体当たり)	シュート形成数 (個体当たり)
欠乏 欠乏	8.4 ^b	0.21 ^b
充足 充足	20.5 ^a	0.80 ^a
充足 欠乏	0	0
充足 充足	13.7 ^b	0.41 ^{ab}

平均値±標準誤差(6 個体×3 反復)。

^a^b間に 5%水準の有意差(Tukey の多重検定)

② カボチャ

カボチャでは、全茎切断のみでは不定芽を形成しなかったが、窒素欠乏前処理後子葉を残さずに全茎切断した区のみで不定芽が形成された(20%)。

これらの結果より、全茎切断前の窒素欠乏処理は、全茎切断後の再分化を促進することが明らかになり、カボチャにも有効である可能性が示された。

(7) 本研究の成果は、全茎切断法と AOPP 処理の導入により組織培養の効率化に寄与することを明らかにし、世界的な遺伝子組換え植物の実用化に必要な安定的で効率の良い新しい再分化法を提供できる可能性を示している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Hideyuki Tanaka, Haruka Ueda, Kazuhiko Mitsukuri, Takahiro Tezuka, Shuji Shiozaki and Masayuki Oda. 2013. L-2-Aminoxy-3-phenylpropionic acid (AOPP) promoting shoot formation from hypocotyl explants of eggplant. Res. J. Biotech. (peer-reviewed original article) 8: 4-8.
- ② Masahumi Johkan, Yoshihiro Imahori, Hajime Furukawa, Mitsukuri, Kazuhiko, Satoshi Yamasaki, Hidekazu Tanaka, Masayuki Oda. 2011. Effect of ascorbic acid and etiolation on antioxidant enzyme activity and phenylpropanoid metabolism during shoot regeneration from cut ends of tomato stems. J. Japan. Soc. Hort. Sci. (peer-reviewed original article): 45-51.
- ③ 箕作和彦・小田雅行、2011、フウランの増殖における AOPP の効果、植、査読無 45、180-185.
- ④ Kazuhiko Mitsukuri, Masahumi Johkan, Satoshi Yamasaki, Hidekazu Tanaka, Takahiro Tezuka, Kei-ichiro Mishiba, Masayuki Oda. 2010. L-2-aminoxy-3-phenylpropionic acid (AOPP) controls browning and promotes adventitious bud formation in *Neofinetia falcata in vitro*. J. Japan. Soc. Hort. Sci.

(peer-reviewed original article): 367-371.

[学会発表] (計6件)

- ①田中秀幸・藤岡ももこ・黒田恵子・古川一・手塚孝弘・小田雅行、ナスの *in vitro* 全茎切断における窒素欠乏前処理がシュート形成に及ぼす影響、平成25年度園芸学会春季大会、2013年3月23～24日、東京農工大学.
- ②廣瀬亮平・藤岡ももこ・田中秀幸・手塚孝弘・小田雅行、ナスおよびピーマンの *in vitro* 全茎切断におけるAOPP 処理が不定芽形成に及ぼす影響、平成25年度園芸学会春季大会、2013年3月23～24日、東京農工大学.
- ③Hideyuki Tanaka , Kazuhiko Mitsukuri, Satoshi Yamasaki, Ryohei Hirose, Takahiro Tezuka, and Masayuki Oda. Adventitious bud formation promoted by L-2-aminooxy-3-phenylpropionic acid in tomato plants treated with the complete decapitation method *in vitro*. ASHS annual conference, 31 July – 3 August, 2012, Inter Continental Miami, USA.
- ④Hideyuki Tanaka, Yuta Yokoyama, Satoshi Yamasaki, Takahiro Tezuka, Masayuki Oda. A simple and efficient method for shoot regeneration from hypocotyls in eggplant *in vitro*. 8th Solanacea and 2nd Cucurbitacea Genome Joint Conference, 28 Nov. – 2 Dec, 2011, Kobe Convention Center, Japan.
- ⑤田中秀幸・上田晴香・箕作和彦・手塚孝弘・小田雅行、ナスの胚軸培養における PAL 阻害剤 AOPP による不定芽形成の促進、園芸学会平成 23 年度秋季大会、2011 年 9 月 24～26 日、岡山大学.
- ⑥箕作和彦・田中秀幸・山崎識知・手塚孝弘・小田雅行、トマトの *in vitro* 全茎切断における PAL 阻害剤 AOPP による不定芽形成の促進、園芸学会平成 23 年度秋季大会、2011 年 9 月 24～26 日、岡山大学.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小田 雅行 (ODA MASAYUKI)
大阪府立大学・大学院生命環境科学研究科・教授
研究者番号：50291604

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし