

平成21年6月18日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2006～2008

課題番号：18580030

研究課題名(和文) 果樹の組織・細胞培養系での不定胚誘導因子の究明

研究課題名(英文) On factors inducing somatic embryogenesis in an in vitro culture system with fruit tree species

研究代表者

杉浦 明(SUGIURA AKIRA)

石川県立大学・生物資源環境学部・教授

研究者番号：00026379

研究成果の概要：

永年性木本果樹のカキを材料として、幼若組織と成熟相組織について不定胚の誘導を試みた。幼若組織である未熟種子の胚軸・子葉をサイトカイニンのベンジルアデニン(BA)とオーキシンの2,4-ジクロロフェノキシ酢酸(2,4-D)を組み合わせて添加した培地で培養することによって不定胚が誘導され、植物体が再生された。いっぽう、成熟相に達した植物体の葉片はサイトカイニンのチジアズロン(TDZ)を高濃度で添加した培地で不定胚が誘導されたが、幼植物体の再生までには至らなかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	2,100,000	0	2,100,000
2007年度	700,000	210,000	910,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	450,000	4,050,000

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：不定胚形成 不定芽形成 植物ホルモン 果樹 幼若組織 成熟相組織

1. 研究開始当初の背景

果樹類の組織・細胞培養系において植物体の再生は不定芽か不定胚かのいずれかを經由して行われる。不定芽形成するか、不定胚形成するかは果樹の樹種によって異なるようであるが、樹種によっては不定芽形成もすれば不定胚形成もするものもある。また、不定芽形成するか不定胚形成するかは培養に供する植物体の齢や器官の種類によっても異なってくるようである。しかしながら、不定芽形成と不定胚形成を比べた場合、不定胚形成の方が栄養繁殖を目的とした大量増殖や遺伝子組換え体を作製する上でより効率

的であると考えられる。申請者らは、これまでカキの組織・細胞培養において植物体再生系を確立してきたが、成熟相に達した組織からの植物体再生はつねに不定芽經由によるのみ行われ、品種によっては再生したシュートからの発根がきわめて困難な場合があり、苗木生産の上で問題があった。したがって、果樹のような永年性作物の優良品種の自根苗を大量生産したり、既存の優良品種について特定の有用遺伝子を導入した個体を多数育成するためには、成熟相にある植物体からの不定胚形成が可能になれば実用的にきわめて有意義である。

2. 研究の目的

上述の通り、果樹の優良品種の栄養繁殖や遺伝子導入のためには、成熟相に達した器官からの不定胚形成が行われることがきわめて効率的で有利である。本研究では、まず、これまでの研究報告に照らして不定胚形成が比較的容易であると考えられる幼若組織について不定胚誘導を試み、次いで同様な条件が成熟相組織での不定胚誘導にも適用しうるかどうかを検証し、もし適用できないとなればどのような条件による不定胚誘導が可能かどうかを探索・検討する。

3. 研究の方法

(1) カキ未熟種子の胚軸または子葉組織からの不定胚誘導と植物体再生

①カキ品種‘富有’と‘次郎’を供試して放任受粉によって得られた果実の未熟種子の胚軸と子葉を摘出・切除し、暗黒条件下で2,4-ジクロロフェノキシ酢酸(2,4-D)とベンジルアデニン(BA)とを種々な濃度の組み合わせで添加したMS培地(固化剤として0.3%ゲランガム使用)で培養し、不定胚の誘導を試み、光条件下での植物体の再生をはかった。

②次いで、カキ品種‘水島’の放任受粉によって得られた果実の未熟種子の胚軸を摘出・切除し①で不定胚誘導に有効であった2,4-DとBAの組み合わせ濃度と、さらに別にフェニルウレア型サイトカイニンであるチジアズロン(TDZ)を単独またはインドール酢酸(IAA)と種々の濃度段階で組み合わせ、それぞれMS培地で暗黒または光条件下で培養し、不定胚誘導と植物体再生を試みた。

(2) カキ成熟相組織からの不定胚誘導

①成熟相組織である‘次郎’の葉原基由来カルスおよび、このカルスより不定芽形成によって再生させたシュートの葉切片を用いて、2,4-DとBAの組み合わせ添加培地での不定胚誘導を試みた。

②①で用いた‘次郎’由来のカルスおよび葉切片についてTDZを添加したMS培地で不定胚誘導と植物体再生を試みた。

4. 研究成果

(1) カキ未熟種子の胚軸または子葉からの不定胚誘導と植物体再生

①‘富有’、‘次郎’いずれの果実から得られた未熟種子の胚軸・子葉も培養開始約2週間後よりカルス形成が始まり、カルス形成率は2,4-DとBAの $3\mu\text{M}$ または $10\mu\text{M}$ の濃度組み合わせで最も高くなった。これらの条件で形成されたカルスは徐々に褐色または黒色に変色したが、そこから2次的に白色の胚的カルス(embryogenic callus:EC)が生じた(図1)。これらのカルスをさらに培養を続けてゆくと約8週間後には胚的カルスから球状胚が多数形成された(図2)。

球状胚は‘次郎’よりも‘富有’で、また、

子葉よりも胚軸でより多く形成された。球状胚を形成したカルスを植物ホルモンフリーの培地に継代培養すると6週間後には約70%のカルスで球状胚が魚雷型胚にまで発達した(図3)。

ついで、これらの魚雷型胚を親カルスから分離して光条件下でホルモンフリーかゼア



図1. 胚軸より生じた胚的カルス(EC)

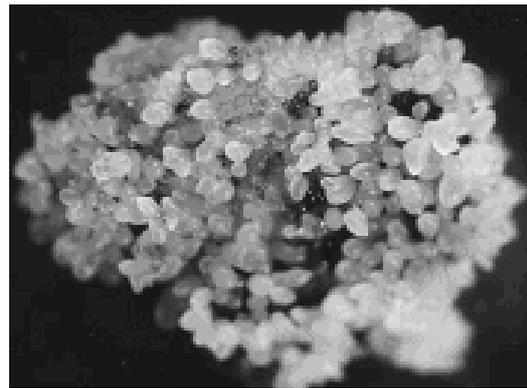


図2. 胚的カルスより生じた球状胚



図3. 球状胚から発達した魚雷型胚

チン添加のMS培地(固化剤として0.8%寒天使用)に移植すると‘富有’の魚雷型胚では1週間後には約50%、6週間後には約90%発芽した。

いっぽう、そのような魚雷型胚は6週間後には高い発根率を示した。このように胚軸から誘導された魚雷型胚は休眠に入ることなく発芽と発根が同時に起こり、鉢上げ順化の過程を経て正常な幼植物体に発育した。‘次郎’についてもほぼ同様の結果が得られた。このように、胚軸または子葉からの不定胚は発根処理しなくとも発根したので、不定芽由来の植物体に比べて増殖が容易であった。

②品種‘水島’の胚軸をBA 3 μ M と2,4-D 10 または 30 μ M 添加MS培養したところBA 3 μ M と2,4-D 30 μ M の組み合わせ培地でより多くの胚的カルスが形成され、‘富有’、‘次郎’と同様にホルモンフリーの培地に移植培養することにより球状胚から魚雷型胚→子葉型胚に移行し、発芽・発根して正常な幼植物体を形成した(図4および図5)。



図4. 胚軸由来の発芽・発根した幼植物体



図5. 胚軸由来の鉢上げ個体

いっぽう、胚軸をTDZ(1, 5, 10, 30, 60 μ M) 添加MS培地で培養したところ、低濃度(1 μ M) ではシュート(図6)、中濃度(5-10 μ M) では



図6. 低濃度TDZ添加培地で生じたシュート



図7. 中濃度TDZ添加培地で生じた葉状体

葉状体(図7)、高濃度(30-60 μ M) では不定胚(図8A, 8B)が形成された。このように、TDZは濃度レベルによってシュート、葉状体、不定胚というように異なる形態変化を誘導した。

しかし、TDZで誘導された不定胚はBAと2,4-Dとの組み合わせ培地でみられたような球状胚→魚雷型胚→子葉型胚という明確な区別のある形状変化がみられなかった。なお、誘導された不定胚をホルモンフリーの培地に移植したが、発根・シュート形成には至らなかった。

(2) カキ成熟相組織からの不定胚誘導

①‘次郎’葉原基由来カルスおよびその不定芽由来のシュートの葉切片をBAと2,4-Dを種々の濃度で組み合わせて添加したMS培地で培養したが、いずれもカルスのみ分化し続けるのみで、不定胚はいうまでもなく何らの器官分化も認められなかった。

A)



B)



図8 高濃度 TDZ 添加培地で誘導された不定胚
A) 不定胚の集合体
B) 生育した不定胚

②TDZ による‘次郎’由来カルスおよびカルスから生じたシュートの葉切片からの不定胚誘導の試み

‘次郎’葉原基由来カルスを TDZ の濃度段階の異なる MS 培地で培養したところ、発育したカルスは高濃度ほど大きくなったが、何ら器官分化の兆候はみられなかった。いっぽう、培養葉切片を TDZ 5-30 μ M 添加培地で光条件下で培養したところ、1-2 カ月後頃より緑色カルスより葉状体ないし不定胚とみられる器官の分化が観察された（暗黒条件では器官分化の兆候はみられなかった）。しかし、TDZ で誘導された不定胚は胚軸組織で BA と 2, 4-D で誘導される多数の不定胚とは異なり、その誘導はきわめて限定的であり、かつ、シュート形成や発根には至らなかった。以上の結果より、カキの成熟相組織でも添加植物ホルモンとして TDZ を用いることによって不定胚が誘導される可能性が示されたが、完全な植物体を再生させるためには更なる培地・培養条件の検討が必要であった。

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 1 件)

① Sugiura, A., Matsuda-Habu, Y., Gao, M., Esumi, T., Tao, R. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) embryos. HortScience 43:211-214.2008. 査読有

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉浦 明 (SUGIURA AKIRA)

石川県立大学・生物資源環境学部・教授
研究者番号：00026379

(2) 研究分担者

田尾 龍太郎 (TAO RYUTARO)

京都大学・大学院農学研究科・准教授
研究者番号：10211997

(3) 連携研究者

なし