

マタタビ(*Actinidia polygama* Miq.)葉柄のin vitro培養における器官形成および植物体再生

誌名	北海道大学農学部農場研究報告 = Research bulletin of the University Farm Hokkaido University
ISSN	03856445
著者名	原田,隆 劉,永立
発行元	北海道大学農学部附属農場
巻/号	30号
巻号補足	
掲載ページ	p. 9-14
発行年月	1997年3月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



マタタビ (*Actinidia polygama* Miq.) 葉柄の *in vitro* 培養における器官形成および植物体再生

劉 永立・原田 隆

(北海道大学農学部園芸学講座)

(1997 年 1 月 17 日受理)

緒 言

現在のキウイフルーツの品種は、キウイフルーツ種から選抜して育成されたもので、温暖な地域においてのみ栽培できる。今後の育種には、マタタビ属の他の種を利用し、特に、無毛、無追熟、高品質などの形質導入および栽培地域拡大のための耐寒形質の導入が挙げられる。北海道内の山地に自生しているマタタビ (*Actinidia polygama* Miq.) は耐寒性が強く、果実は特有の芳香と辛味を持ち、果実の品質がよく、生食されるとともに、果実酒の原料にもなる。また、若い果実は、塩漬けや砂糖漬けにして利用され、若い芽と葉はお茶としても利用されるなど、利用価値の高い野生果樹である。本研究では、マタタビの大量増殖および形質改良を行う場合の基礎となる組織培養系を確立するため、葉柄組織片からのカルスおよびシュート形成、カルスからのシュート形成ならびに個体再生に及ぼす生長調節物質の影響について検討した。

材料および方法

実験 1. 葉柄組織片からのカルス形成および器官形成に及ぼす生長調節物質の影響

1995 年 7 月 2 日に北海道恵庭市の山地に自生しているマタタビの葉柄 (長さ 3～4 cm) を採取した。次に、中性洗剤を用いて洗浄し水道水ですすいだ後、70 %エタノールに 1 分間浸漬し、直ちに次亜塩素酸ナトリウム溶液 (有効塩素 1 %, Tween20 数滴添加) に 10 分間浸漬して滅菌した。滅菌後、長さ 0.5～0.7 cm の切片を切り出して培養した。外植片は容器 (100 ml 容三角フラスコ)

当たり 4 個、区当たり 16 個とし、水平に置床した。

培地は、BW 培地 (Broad-Leaved Tree 培地と Woody Plant 培地の各成分を 1/2 ずつ混合したもの)¹⁾ を基本とし、ショ糖 30 g/l, ゲルライト 2 g/l および以下に述べる生長調節物質を添加し、pH 5.7～5.8 に調整したものを用いた。生長調節物質については、インドール酪酸 (IBA) 0, 0.01, 0.1, 1 μ M と N-(2-chloro-4-pyridyl)-N'-phenylurea (CPPU) 0, 0.1, 1 μ M とを組み合わせた 12 区を設けた。容器 (100 ml 容三角フラスコ) 当たり 25 ml の培地を注入し、オートクレーブにより滅菌した (1.2 kg $\cdot$ cm⁻², 120°C, 15 分)。培養は 25°C, 4,000 lx, 16 時間日長の条件下で行った。培養 7 週間後にカルス形成、培養 9 週間後にシュート形成について調査した。

実験 2. 葉柄由来カルスからのシュート形成に及ぼす生長調節物質の影響

実験 1 で形成されたカルスを 5 mm 立方程度の小塊に分割して培養した。基本培地、生長調節物質および培養方法は実験 1 と同様である。培養開始 9 週間後に、シュート形成について調査した。

実験 3. 培養体由来シュートを移植した場合の発根

まず、実験 1 で得られたシュートから、1～2 節をもつ長さ約 7 mm の切片を切り取り、ナフタレン酢酸 (NAA) 1 μ M およびゼアチン 1 μ M を添加した Miller 培地²⁾ に垂直に挿して培養することにより、シュートを増殖した。2 週間培養後、基部からシュートを切り出し、ベンジルアデニン (BA) (0, 1 μ M) と NAA (0, 0.1, 1, 10

μM) とを組み合わせで添加した Miller 培地へ移植して培養した。外植片は、容器 (100 ml 容三角フラスコ) 当たり 4 個、区当たり 16 個を用いた。移植 40 日後に根の形成について調査した。

結果および考察

実験 1. 葉柄組織片からのカルス形成およびシュート形成に及ぼす生長調節物質の影響

カルス形成についてみると、IBA $0.1 \mu\text{M}$ および CPPU $0.1 \mu\text{M}$ 以下の添加区では、切片の両側の切断面から緑色を帯びた硬いカルスが形成された。また、IBA および CPPU $1 \mu\text{M}$ 添加区では、切片の両側切断面と下部 (培地と接触している部分) から白色を帯びたカルスが形成され、そのカルスの生長は旺盛で、切片のほぼ全体を覆っているものもあった。生長調節物質無添加区では、カルスが形成されなかった。

カルス形成率についてみると、IBA 単独添加の場合には、 $0.01 \mu\text{M}$ 添加区で 81 % となり、 0.1 および $1 \mu\text{M}$ 添加区では 100 % となった。一方、CPPU $0.1 \mu\text{M}$ を添加した場合には、IBA 無添加区でカルス形成率が 94 % となり、IBA 0.01 , 0.1 および $1 \mu\text{M}$ 添加区では、100 % となった (第 1 図)。このように、マタビ葉柄組織片からのカルス形成は、IBA および CPPU の添加により促進されることが明らかになった。

カルスの大きさについては第 2 図に示したとおりで、IBA および CPPU の濃度が高くなるとカルスの生長が促進された。また、カルスの大きさに及ぼす IBA の影響は、CPPU の濃度によって異なり、CPPU 無添加および $0.1 \mu\text{M}$ を添加した場合には、大きかったが、CPPU $1 \mu\text{M}$ を添加した場合には、小さかった。

次に、シュート形成についてみると以下のとおりである。形成されたすべてのシュートは、外植片の切断面に形成されたカルスの表層から発生したものであった (第 3 図)。CPPU 無添加区においてはシュートが形成されなかったが、CPPU 添加区では形成され、第 4 図に示したように、シュート形成率は、CPPU の濃度が高くなるにしたがって高くなった。次に、IBA の影響についてみると、

CPPU 0.1 および $1 \mu\text{M}$ を添加した場合には、IBA 無添加および $0.01 \mu\text{M}$ 添加区ではシュート形成率が高かったが、IBA 濃度がそれより高くなるにしたがってシュート形成が抑制され、CPPU $0.1 \mu\text{M}$ および IBA $1 \mu\text{M}$ 併用区ではシュートが全く形成されなかった。シュート形成が高濃度のオーキシシン添加によって抑制されることはサルナシ³⁾の新梢切片の培養においても認められている。

次に、シュート数についてみると、シュート形成率と同じ傾向が認められた。すなわち、外植片当たりのシュート数は、CPPU の濃度が高くなるにしたがって多くなり、また、IBA 無添加区およ

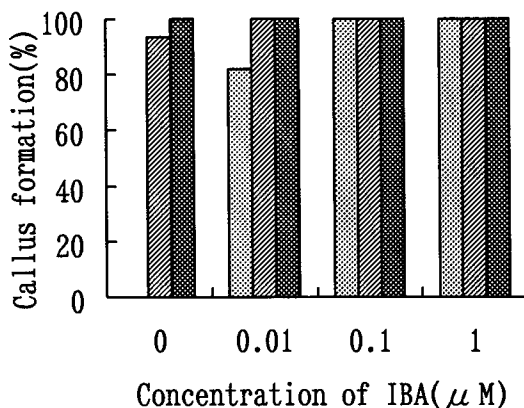


Fig. 1. Effect of IBA and CPPU on callus formation from petiole of silver-vine. Concentrations of CPPU : none (white), $0.1 \mu\text{M}$ (diagonal lines), $1 \mu\text{M}$ (solid black).

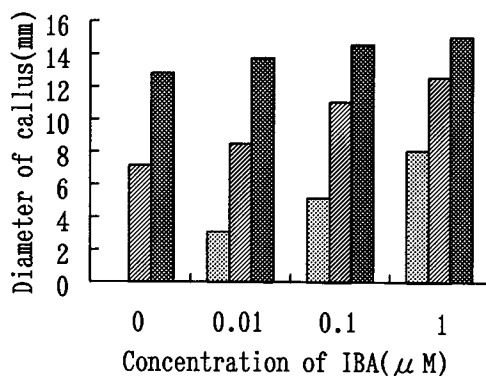


Fig. 2. Effect of IBA and CPPU on diameter of callus formed from petiole of silver-vine. Concentrations of CPPU : none (white), $0.1 \mu\text{M}$ (diagonal lines), $1 \mu\text{M}$ (solid black).

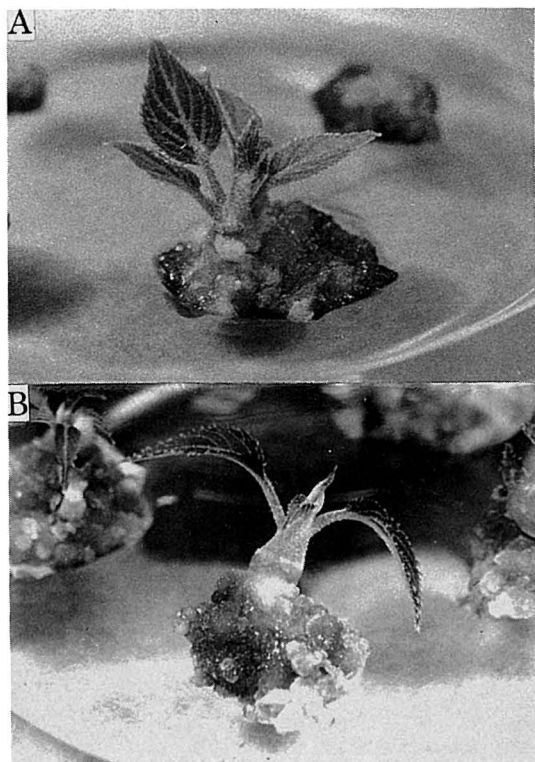


Fig. 3. Shoot formed from petiole segment (A) and petiole-derived callus (B) in silver-vine culture.

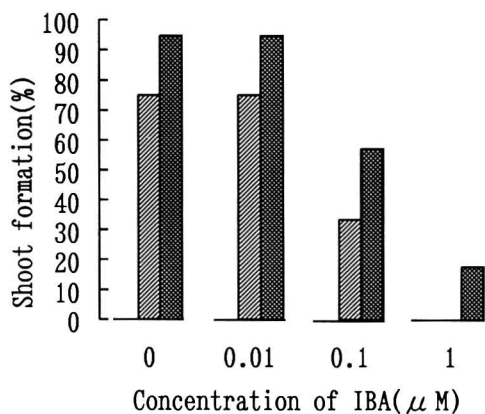


Fig. 4. Effect of IBA and CPPU on shoot formation from petiole of silver-vine. Concentrations of CPPU : none (▨), 0.1 μ M (▧), 1 μ M (■).

び0.01 μ M 添加区では多く、IBA 濃度がそれより高くなるにしたがって少なくなった (第5図)。

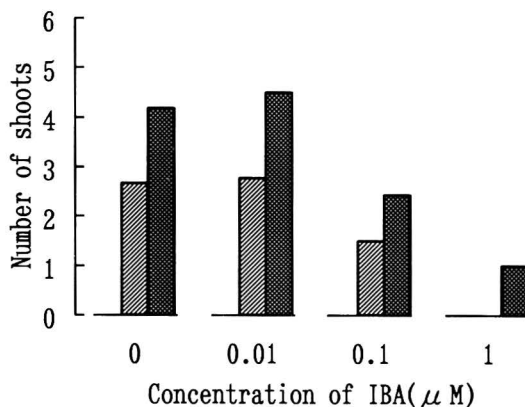


Fig. 5. Effect of IBA and CPPU on number of shoots formed from petiole of silver-vine. Concentrations of CPPU : none (▨), 0.1 μ M (▧), 1 μ M (■).

実験2. 葉柄由来カルスからのシュート形成に及ぼす生長調節物質の影響

第6図に示したように、シュート形成率は、CPPU 1 μ M 単独添加区で最も高く、50%となったが、実験1で葉柄を培養した場合より低かった。このように、カルスの培養を続けることによって再分化能が低下することは他の植物において

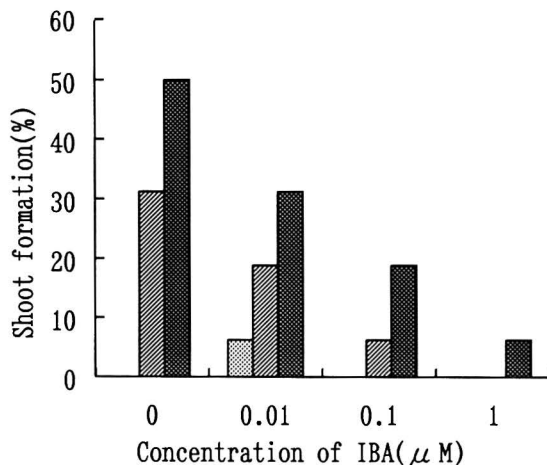


Fig. 6. Effect of IBA and CPPU on shoot formation from callus of silver-vine petiole. Concentrations of CPPU : none (▨), 0.1 μ M (▧), 1 μ M (■).

も報告されている⁴⁾。次に、生長調節物質の影響についてみると、CPPU無添加の場合、IBA 0.01 μM を添加した区以外ではシュートが形成されなかったが、IBA 0.01 μM 添加区では、置床した外植片16個の中のひとつのみからシュートが形成された。シュート形成率はCPPUの濃度が高くなるにしたがって高くなり、IBAの濃度が高くなるにしたがって低くなった。

第7図に示したように、CPPU 0.1および1 μM 単独添加区、ならびにCPPU 0.1 μM とIBA 0.01, 0.1 μM との組み合わせ添加区では、外植片当たりの平均シュート数は2以上と多かった。一方、シュート数については、CPPU 0.1 μM 添加区と1 μM 添加区との間には差が認められず、IBA 0.01 μM 以上を添加した区では、添加濃度が高くなるに従って外植片当たりのシュート数が少なくなった。また、葉柄由来カルスの培養では、葉柄培養の場合に比べて外植片当たりのシュート数が少なかった。

実験3. 培養体由来シュートを移植した場合の発根

培養体由来シュートを移植した場合には、根がシュート基部から直接分化した(第8図)。10 μM 以外のNAA単用区では、NAAの濃度が高くなるにしたがって発根は促進されたが、BAを添加するとシュートからの発根が抑制された(第9図)。NAA 1 μM 単独添加区では、発根率が100%となり、早期に発根がみられ、シュートの生長が旺盛であり、健全な幼植物が得られた。

一方、NAA 10 μM 添加区では、まず、シュート基部の切断面からカルスが形成され、その後、根が形成されたが、根形成率は低かった。これはキウイフルーツの培養体シュートを移植して培養した場合の発根と類似しており^{5,6)}、カルスが旺盛に生長することにより発根が抑制されるものと考えられる。

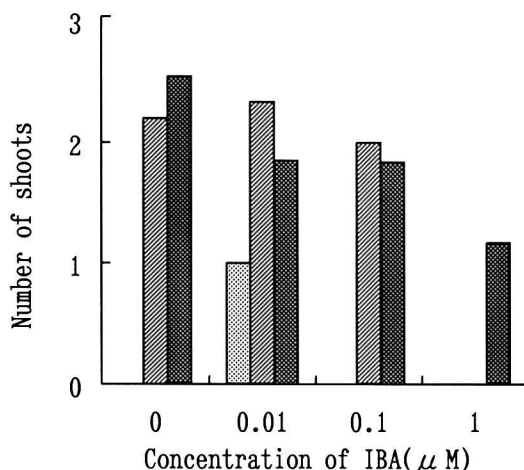


Fig. 7. Effect of IBA and CPPU on number of shoot formed from callus of silver-vine petiole. Concentrations of CPPU : none(□), 0.1 μM (▨), 1 μM (■).



Fig. 8. Rooting on basal portions of shoots formed from petiole of silver-vine.

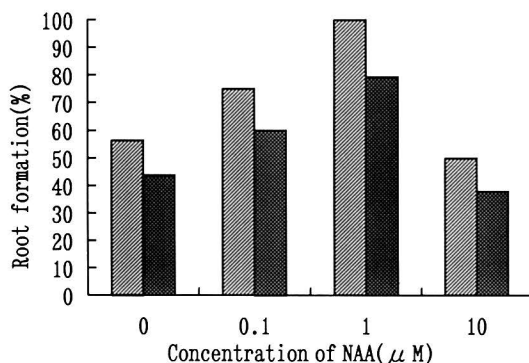


Fig. 9. Effect of NAA and BA on root formation from base of shoots derived from petiole of silver-vine. Concentrations of BA : none(▨), 1 μM (■).

摘 要

マタタビ (*Actinidia polygama* Miq.) の栄養繁殖ならびに形質改良に役立つ培養系を確立するため、BW 培地 (Broad-Leaved Tree 培地と Woody Plant 培地の各成分を 1/2 ずつ混合したもの) を基本とし、CPPU (0, 0.1, 1 μ M) と IBA (0, 0.01, 0.1, 1 μ M) とを組み合わせ添加した 12 種類の培地を用いて葉柄切片を培養した。

葉柄切片からのカルス形成は、CPPU および IBA の濃度が高くなるにしたがって促進された。葉柄切片および葉柄由来カルスからのシュート形成率は、CPPU の濃度が高くなるにしたがって高くなり、IBA 濃度が高くなるにしたがって低くなった。葉柄切片の培養におけるシュート形成数は、CPPU 1 μ M 単独添加区および CPPU 1 μ M と IBA 0.01 μ M との組み合わせ添加区において多かった。葉柄由来カルスを培養した場合のシュート形成数は、CPPU 0.1 および 1 μ M 単独添加区並びに CPPU 0.1 μ M と IBA 0.01, 0.1 μ M との組み合わせ添加区で多かったが、IBA 濃度が高くなるにしたがって少なくなった。

培養体シュートを NAA 1 μ M を含む Miller 培地へ移植したところ、発根率が 100 % となり、旺盛に生長する健全な幼植物が得られた。

引用文献

1. Sugawara, F., N. Yamamoto and O. Tanaka 1994. Plant regeneration in *in vitro* culture of leaf, stem and petiole segments of *Actinidia polygama* Miq. Plant Tissue Culture Lett. 11 : 14-18.
2. Miller, C. O. 1965. Evidence for the natural occurrence of zeatin and derivatives : compounds from maize which promote cell division. Proc. Natural Acad. Sci. USA. 54 : 1052-1058.
3. 劉 永立・笠井 登・原田 隆. 1995. サルナシ新梢組織の *in vitro* 培養における器官形成および植物体再生. 園学雑. 64 (別 1) : 134-135.
4. Syono, K. 1965. Changes in organ forming capacity of carrot root calluses during subcultures. Plant Cell Physiol. 6 : 403-419.
5. 末沢克彦・松田長生・大村三男・山木昭平. 1987. キウイフルーツ振盪培養細胞からの植物体の再生. 園学要旨. 昭 62 春 : 140-141.
6. 末沢克彦. 1988. キウイフルーツの増殖技術. 農及園. 63 : 133-137.

Organ Formation and Plant Regeneration in *in-Vitro* Culture of Petiole Segments of *Actinidia polygama* Miq.

Yong-Li LIU and Takashi HARADA

(Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo 060, Japan)

(Received January 17, 1997)

Summary

Petiole segments of *Actinidia. polygama* Miq were cultured to establish an efficient method for vegetative propagation and character improvement. BW media (a combined medium of half concentrations of both Broad-Leaved Tree Medium and Woody Plant Medium), supplemented with 12 combinations of CPPU (0, 0.1 or 1 μ M) and IBA (0, 0.01, 0.1 or 1 μ M), were used.

Callus formation from petiole segments was promoted by increasing CPPU and IBA concentrations. The rate of shoots formed from petioles and petiole-derived calli was increased with the increase of CPPU concentration, and decreased with the increase of IBA concentration. The number of petiole-differentiated shoots per segment became larger in the media with 1 μ M CPPU alone or with both 1 μ M CPPU and 0.01 μ M IBA. In addition, the number of shoots (differentiated from petiole-induced calli) per segment became larger in the media with 0.1 or 1 μ M CPPU alone or with combinations of CPPU (0.1 μ M) and IBA (0.01 or 0.1 μ M), and decreased with the increase in IBA concentrations.

When transferred to Miller medium supplemented with 1 μ M NAA alone, the intact shoots excised from the cultures showed a 100% rooting rate, resulting in the formation of healthy plantlets showing vigorous growth.