グラジオラス根からのカルス形成と植物体再生

霞 正一^{1*}・高津康正¹・鈴木一典¹・郷内 武¹・野木光子¹・山田哲也²・眞部 徹¹

¹茨城県農業総合センター生物工学研究所 319-0292 茨城県 西茨城郡岩間町安居

²科学技術振興事業団・科学技術特別研究員

Callus Formation and Plant Regeneration from Root Explant of *Gladiolus* (*Gladiolus* × *grandiflora* hort.).

Masakazu Kasumi^{1*}, Yasumasa Takatsu¹, Kazunori Suzuki¹, Takeru Gonai¹, Mitsuko Nogi¹,
Tetsuya Yamada² and Toru Manabe¹

¹Plant Biotechnology Institute, Ibaraki Agricultural Center, Ago, Iwama, Nishi-ibaraki, Ibaraki, 319-0292

²Japan Science and Technology Corporation, Domestic Research Fellow, Tokyo 102-8471

Summary

Callus formation, organogenesis and somatic embryogenesis from root section of gladiolus cormels grown *in vitro* were observed on MS medium containing NAA with and without BAP, respectively. The regeneration rate of adventitious buds showed a high frequency on MS medium containing 5 mg · liter⁻¹ NAA and 5 mg · liter⁻¹ BAP. Regenerated shoots were transferred to MS medium, and subsequently roots developed and corms were formed at the base of the shoots. The corms were released from their dormancy by low-temperature treatment and transplanted into pots, then developed shoots, roots and flowers. The regenerated plants had the same characteristic flower shape and color as the mother plant. Varietal differences were observed in the rate of adventitious buds formation. In conclusion, we showed the most suitable culture condition, for organogenesis and somatic embryogenesis of gladiolus in using root explant.

キーワード： 培養，カルス，グラジオラス，根，再分化

緒 言

グラジオラスでは、これまで花被片(霞ら, 1998b), 子房片(霞ら, 1998b), 花茎(大城ら, 1974; Kamoら, 1990), 葉片(Stefaniak, 1994; 霞ら, 1998a), 木子茎頂(霞ら, 1999), 木子片(Kamoら, 1990; 霞, 2001)を外植体とした茎葉再分化系が報告されているが, 根を外植体としたものはない。

一方, グラジオラスと同じ球根花きのチューリップでは, 球根の増殖率が低いものの, 根が1球根当たり200~400本と大量に発生する。この根を外植体とした茎葉再分化が報告され, 大量増殖法の開発が検討されている(荘司, 1999)。

そこで, グラジオラスではこれまで未検討であった根を外植体とした場合のカルス形成, 茎葉再分化および再生植物体の特性を検討した。

材料および方法

実験1. 根片からのカルス形成および茎葉再分化に及ぼすNAA, BAP濃度の影響

当研究室で保存している‘トラベラー’木子を70%エタノールで1分間, 次いで少量の界面活性剤を添加した有効塩素0.5%の次亜塩素酸ナトリウム液で20分間表面殺菌した。さらに, 滅菌水で5分間ずつ3回洗浄した。植物生長調節物質を無添加とし, 3%ショ糖, 10 g · liter⁻¹寒天を添加したMurashige and Skoog培地(MS培地)(Murashige・Skoog, 1962)を, pH5.8に調製し, φ25 mm × 100 mmの試験管に5 mlずつ分注した。さらにアルミ箔でふたをして, オートクレーブ(120°C, 1.2 kg · cm⁻², 15分間)後, 斜面培地としたものを木子培地とした。殺菌した木子を無菌的に木子培地に置床し, 15~30日培養後, 根を先端から約1 cmの長さに切った根片を外植体とした。この外植体を1試験管当たり3本ずつ, 1区当たり計30個の3反復でカルス形成, 茎葉再分化培地に置床した。この培地にはφ25 mm × 100 mmの試験管にMS培地を基本とし, 1-ナフタレン酢酸(NAA), 6-ベンジルアミノプリン(BAP)をそれぞれ(1 mg · liter⁻¹, 0

2004年4月26日 受付。2004年8月24日 受理。

* Corresponding author. E-mail: kasumi@agri.pref.ibaraki.jp

第1表 グラジオラス根からのカルス形成および茎葉再分化に及ぼす NAA, BAP の影響

NAA (mg・liter ⁻¹)	BAP (mg・liter ⁻¹)	供試数	カルス形成 根片数 (%)	茎葉再分化 根片数 (%)	備 考
1	0	30	5.3 (17.7) a	3.3 (11.0) a	主にカルス經由不定芽
1	1	30	3.3 (11.0) a	3.7 (12.3) a	"
5	0	30	24.7 (82.3) b	3.7 (12.3) a	主にカルス經由不定胚
5	5	30	19.7 (65.7) b	7.3 (24.3) b	主にカルス經由不定芽
20	0	30	21.3 (71.0) b	7.7 (25.6) b	主にカルス經由不定胚

材料: 'トラベラー' の根先端部. 1区30個の3反復. 調査: 置床後100日.
異なるアルファベットはTukeyの多重検定により5%水準で有意な差のあることを示す.

第2表 グラジオラス根からの茎葉再分化に及ぼす培養部位の影響

培養部位	供試数	茎葉再分化根片数 (%)
根先端	48	10.0 (20.8) a
根中央	48	6.0 (12.5) ab
根基部	48	2.0 (4.2) b

品種: 'トラベラー'. 1区48個の3反復. 調査: 置床後150日.
培地: MSに5 mg・liter⁻¹・NAAと5 mg・liter⁻¹・BAPを添加.
異なるアルファベットはTukeyの多重検定により5%水準で
有意な差のあることを示す.

第3表 グラジオラス根からの茎葉再分化における品種間差異

品 種	供試数	茎葉再分化根片数 (%)
トラベラー	24	5.3 (22.1) a
紫峰の朝	24	4.0 (16.7) ab
富士の雪	24	2.3 (9.6) b

培養部位: 根先端. 1区24個の3反復. 調査: 置床後150日.
培地: MSに5 mg・liter⁻¹・NAAと5 mg・liter⁻¹・BAPを添加.
異なるアルファベットはTukeyの多重検定により5%水準で
有意な差のあることを示す.

mg・liter⁻¹), (1 mg・liter⁻¹, 1 mg・liter⁻¹), (5 mg・liter⁻¹, 0 mg・liter⁻¹), (5 mg・liter⁻¹, 5 mg・liter⁻¹), (20 mg・liter⁻¹, 0 mg・liter⁻¹)の5組合せで添加した. 培養条件は, 白色蛍光灯 (ネオライン白色 FL40S・W, 東芝ライテック社製) で 50 μmol・m⁻²・sec⁻¹, 16時間日長とした. 置床後 100 日目に 1 根片当たりのカルス形成数 (率) および茎葉再分化数 (率) を調査した.

実験 2. 根片からの茎葉再分化に及ぼす培養部位の影響

実験 1 に準じて 'トラベラー' を用い, 根の先端から約 1 cm の長さで切った先端部根片, 木子の付け根から約 1 cm の長さで切り取った基部根片, 根の先端部と基部のちょうど中間の位置から約 1 cm の長さで切り取った中央部根片の 3 つに分け, それぞれを 5 mg・liter⁻¹ NAA と 5 mg・liter⁻¹ BAP を添加した MS 培地に 1 区 48 個の 3 反復で置床した. 培養条件は実験 1 と同様とし, 置床後 150 日目に 1 根片当たりの茎葉再分化数 (率) を調査した.

実験 3. 根片からの茎葉再分化における品種間差異

'トラベラー', '紫峰の朝' および '富士の雪' の 3 品種の根先端部の根片を実験 2 と同様の培地に 1 区 24 個の 3 反復で置床した. 培養条件, 調査は実験 2 と同様とした.

実験 4. 根片からの再生個体の特性

実験 1 において 5 mg・liter⁻¹ NAA と 5 mg・liter⁻¹ BAP を添加した MS 培地で形成された 'トラベラー' の茎葉 10 本を, 植物生長調節物質無添加の MS 培地を 20 ml ずつ分注した 100 ml コニカルビーカーへ継代培養し, 発根と球茎の形成を図った. 培養条件は実験 1 と同様とした. 茎葉が枯れた時点で, 形成された球茎を取り出して風乾した. 休眠打破を促すため, 球茎を 2~5°C で 3 ヶ月以上処理後, 圃場で栽培し開花させて茎葉と花器における変異

発生の有無を観察した.

結果および考察

実験 1. 根片からのカルス形成および茎葉再分化に及ぼす NAA, BAP 濃度の影響

根片からのカルス形成および茎葉再分化に及ぼす NAA, BAP 濃度の影響を第 1 表に示した.

すべての区においてカルス形成が認められたものの, カルス形成率は, 5 mg・liter⁻¹ NAA 添加区, 5 mg・liter⁻¹ NAA と 5 mg・liter⁻¹ BAP 添加区, 20 mg・liter⁻¹ NAA 添加区でそれぞれ 82.3%, 65.7%, 71.0% となり他の区より有意に高かった. その後カルスから茎葉再分化が認められた. 茎葉再分化率は, 5 mg・liter⁻¹ NAA と 5 mg・liter⁻¹ BAP 添加区, 20 mg・liter⁻¹ NAA 添加区でそれぞれ 24.3%, 25.6% となり他の区より有意に高かった. また, 5 mg・liter⁻¹ NAA と 5 mg・liter⁻¹ BAP 添加区では, 茎葉は主に不定芽で再分化し, 調査後も新たに不定芽を形成したのに対し (第 1 図-A), 20 mg・liter⁻¹ NAA 添加区では, 茎葉は主に不定胚で再分化し, 褐変しやすかった (第 1 図-B).

荘司 (1999) は, グラジオラスと同じ球根花きのチューリップの根を 2, 4-D と BAP をともに 0.1 mg・liter⁻¹ 添加した MS 培地で 3 ヶ月間培養したとき, カルスに類似した緑化球体が生じ, これを 0.01 mg・liter⁻¹ 2, 4-D, 0.1 mg・liter⁻¹ BAP を添加した培地に継代培養することで茎葉再分化することを報告している. 培地に添加した植物生長調節物質の種類, 濃度, 処理方法などが異なるので, グラジオラスとチューリップを直接比較することはできないが, オーキシシンと BAP の両方を添加することで根片からカルス經由で茎葉再分化することが両者に認められた.

一方, 著者らはこれまでにグラジオラスの木子茎頂 (霞

第1図 グラジオラス‘トラペラー’の根からのカルス形成と植物体再生

A: 根片(R)からのカルス(C)および不定芽(AB)の形成, B: 根片(R)からのカルス(C)および不定胚(SE)の形成, C: 不定芽由来個体の開花様相, 元植物の特性と同一. バー: 5 mm

ら, 1999), 木子片(霞, 2001), 子房片(霞ら, 1998b), 葉片(霞ら, 1998a)を外植体に用いて不定胚培養系および不定芽培養系を確立した. これらの場合, MS培地に植物生長調節物質として, NAAを単独で添加すると不定胚, NAAとBAPをともに添加すると不定芽が形成された. 本研究の根片を外植体として用いた場合もそれらとほぼ同様の結果が得られていた.

実験2. 根片からの茎葉再分化に及ぼす培養部位の影響

根片からの茎葉再分化に及ぼす培養部位の影響を第2表に示した. 茎葉再分化率を外植体に用いる根の部位別に比較すると, 先端部が20.8%で最も高く, 次に中央部, 最も低いのは基部となり, 根の先端に近い部位ほど高い傾向にあった. 一般に花きにおいて根を外植体に用いる場合には, 先端部を外植体とすることが多い(千田ら, 1974; 莊司, 1999; 竹本ら, 1994).

一方, 安木(1989)は, シンビジウムを用いて根を部位ごとに先端部, 中央部, 基部の3つに分けて培養特性を比較した結果, 基部だけから茎葉再分化が認められたとしている. この結果は本研究のグラジオラスと異なるものであり, 今後植物の種類ごとに根の部位と茎葉再分化との関係を解明する必要がある.

実験3. 根片からの茎葉再分化における品種間差異

根片からの茎葉再分化における品種間差異を第3表に示した. 根片からの茎葉再分化率は, ‘トラペラー’と‘富士の雪’の間に有意な差があり, 品種間差異が認められた. 莊司(1999)は, チューリップの2品種を用いて根端

培養を実施した結果, 片方の品種だけが茎葉を再分化し, 品種による違いを認めている. また, 著者らはこれまでにグラジオラスの種々の外植体を用いた茎葉再分化系において品種間差異を認めているが(霞ら, 1998a; 霞ら, 1998b; 霞ら, 1999), 根片においても同様に品種間差異のあることが示唆された.

実験4. 根片からの再生個体の特性

根片から形成された茎葉を前報(霞ら, 1998b)に準じて養成して得た10個体を圃場に展開したところ, 茎葉の形態, 開花様相は元植物と同一で, 変異は認められなかった(第1図-C). 竹本ら(1994)は, カラジウム3品種で葉身および根端を外植体に用いた場合の再生体の変異を検討した結果, 葉身から再生した植物体に高い割合で葉色に変異が認められた品種では, 葉身培養をクローンの増殖法として用いることはできないが, 根端から再生した植物体では変異が少ないので, 根端培養によるクローンの増殖法が可能であるとしている. また, 花き以外のパイナップル(Wakasa, 1979), 食用ギク(遠藤ら, 1990)では, 培養変異の出現頻度と出現する型が外植体に用いた器官の種類により異なることが示されている. グラジオラスでは, 木子茎頂からの不定胚における培養変異は検討されているものの(霞ら, 1999), 器官ごとの培養変異の出現頻度, 方向性について検討されていない. 従って, ここで開発した根を用いた培養系も含め, いろいろな器官を外植体とした場合の培養変異の出現頻度と出現する型の関係を解明することでグラジオラスの効率的なクローン増殖系や効果的な培養変異の作出法の開発が期待できる.

摘 要

グラジオラスの木子を実験培養して得られた根片を外植体として、MS培地にNAAの単独添加区でカルスと不定胚、NAAとBAPの両方の添加区でカルスと不定芽が形成された。5 mg・liter⁻¹NAAと5 mg・liter⁻¹BAPの両方を添加した区で最も不定芽形成率が高かった。この不定芽をMS培地に継代培養することで植物体が再生し、球茎を形成した。この球茎を低温処理して休眠打破後、圃場で栽培した結果、再生個体の茎葉の形態、開花様相は元植物と同一であった。また、根片外植体からの不定芽形成には品種間差異が認められた。

引用文献

- 遠藤元庸・佐々木 力・稲田委久子. 1990. 食用ギクの組織培養による変異体の作出に関する研究. 岩手大農報. 20: 17-33.
- Kamo, K., J. Chen and R. Lawson. 1990. The establishment of cell suspension cultures of *Gladiolus* that regenerate plants. In vitro Cell Dev. Biol. 26: 425-430.
- 霞 正一. 2001. 放射線照射および組織培養によるグラジオラス花色変異体の作出に関する研究. 茨城農総生工研報. 4: 1-49.
- 霞 正一・高津康正・友常秀彦・佐久間文雄. 1998a. グラジオラス無菌植物の葉からの不定胚および不定芽形成による植物体再生. 茨城農総生工研報. 2: 83-89.
- 霞 正一・高津康正・友常秀彦・佐久間文雄. 1998b. グラジオラス花蕾子房からのカルス形成と植物体再生. 園学雑. 67: 951-957.
- 霞 正一・高津康正・友常秀彦・佐久間文雄. 1999. グラジオラス木子茎頂からの不定胚形成と花色変異. 園学雑. 68: 168-175.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497.
- 大城 閑・奥本裕昭・塚本洋太郎. 1974. グラジオラス花茎の無菌培養による器官分化. 園学要旨. 昭49春: 364-365.
- 千田良信・田中道男・長谷川 亨. 1974. 根の組織培養によるラン科植物の繁殖に関する研究(予報). PhalaenopsisおよびVandaの根端培養による繁殖の可能性について. 園学要旨. 昭49春: 360-361.
- 莊司和明. 1999. チューリップ根端培養による大量増殖の可能性. 育種学研究. 1(別2): 274.
- Stefaniak, B. 1994. Somatic embryogenesis and plant regeneration of *Gladiolus* (*Gladiolus hort.*). Plant Cell Rep. 13: 386-389.
- 竹本哲行・朱 玉・矢澤 進. 1994. カラジウムの根端培養による再生植物体の変異の回避. 園学雑. 63(別1): 500-501.
- Wakasa, K. 1979. Variation in the plants differentiated from the tissue culture of pineapple. Japan. J. Breed. 29: 13-22.
- 安木三郎. 1989. シンビジュームの根片培養による植物体再生及び諸要因の影響. 園学雑. 58(別2): 544-545.