

アズキ (*Vigna angularis*) 品種丹波大納言の上胚軸切片 およびカルスからの植物体再分化

高橋亘¹⁾・松下准城¹⁾・小林孝子²⁾・田中修^{*1)}・別府敏夫³⁾

(¹⁾甲南大学・²⁾(株) 本高砂屋・³⁾帝京科学大学)

要旨: アズキ (品種丹波大納言) 上胚軸切片に, *Agrobacterium rhizogenes* を感染させると, 植物ホルモン無添加の培地で, 不定芽と毛状根が形成された. 形成した毛状根では, ミキモピンと *rol* 遺伝子が検出されたが, 不定芽を育てて得た植物体では, ミキモピンも *rol* 遺伝子も検出されなかった. それ故, アズキ上胚軸切片が植物ホルモン無添加の培地で不定芽を分化する能力を持つことになる. そこで, その可能性を検討すると, 上胚軸切片は, 植物ホルモンをまったく含まない培地上で不定芽を分化し, シュートとして発育させる能力を持っていた. この不定芽の分化は, $2\mu\text{g L}^{-1}$ ベンジルアデニンと $0.02\mu\text{g L}^{-1}$ ナフタレン酢酸という低濃度の植物ホルモンにより, 促進された. 上胚軸切片から分化した不定芽は, 茎が伸長しシュートとして成長した. また, 植物ホルモンを含む培地上で誘導されたカルスは, 植物ホルモンをまったく含まない培地に移されることが刺激となって, 多数の小葉を分化しながら増殖するカルスを形成した. 特に, このカルスの形成率は, 不定芽を分化したカルスにおいて高かった. このカルスからのシュート形成は, ゲランガムを含む培地に, ナフタレン酢酸を添加すると促進された. このシュートや上胚軸切片から形成されたシュートは植物ホルモンを含まない培地に移植すると, 根を分化し, 試験管内で, 幼植物体として成長を続けた. 本論文で得られた知見は, 今後, バイオテクノロジー的な手法を用いて, この品種の改良を進める上で, 有用である.

キーワード: アズキ, オルガノジェニックカルス, 丹波大納言, 不定芽分化.

土壤微生物である *Agrobacterium rhizogenes* が植物に感染すると, 感染部位から毛状根が形成される. この毛状根を *in vitro* 培養すると, 植物種によっては, 比較的容易に植物体の再分化が起こる. この毛状根からの再分化個体は, 根の分化が著しかったり, 頂芽優勢が失われたり, 矮化した草型となったり, 花成反応の性質が変化したりすることがいくつかの植物種で報告されている (Davidら 1984, Tepfer 1984, Oonoら 1990, Kamadaら 1992). これらの形質の発現は, アズキの栽培上, 興味深いものである. たとえば矮化することは, 機械栽培向きとして, 最下着莢位置の低いことや倒伏抵抗性などに育種目標がおかれているアズキにおいて有用であると考えられる (星川 1996). それ故, 著者らは, アズキの主要品種である丹波大納言に *A. rhizogenes* を感染させ, 形質が転換した植物体を得る目的で実験を始めた. 結果的に現時点では, 形質転換植物体はまだ得られていない. しかし, この実験をきっかけに, 品種丹波大納言において, 組織培養や遺伝子導入などに使用可能な不定芽分化およびオルガノジェニックカルスを経る再分化の系が得られた.

「オルガノジェニックカルス」という語は, バイオテクノロジー辞典などにも見あたらないが, 本論文のキーワードの一つとなっているので, ここで説明しておく. アズキの再分化条件について研究した佐藤 (1995) は, 「培養中のカルスから, 不定芽まで分化していないが, 緑色で葉の塊の様な形態をした組織が形成されることがあった. この組織だけをカルスからかきとってホルモンフリー培地に移植するとそのままの形態で増殖した. そして増殖中に時と

して不定芽の形成をみたことから潜在的に再分化能を有する組織と考えられた.」と述べ, このカルスに対し, オルガノジェニックカルスという名を与えている. 本論文でも, 品種丹波大納言が, 植物ホルモン無添加の培地上で, 小葉を分化しながら増殖し, 1カ月で直径が約1.5~2倍になるカルスをつくるのが見い出され, このカルスは, 直径約1センチメートルの大きさのもので, 約40枚ぐらいの小葉をもっていた. しかし, いくら小葉を分化しても, 複葉が分化することはなく, また, シュートが分化してくることもなかった. それ故, このカルスが, 佐藤らがオルガノジェニックカルスと命名したものに該当すると考え, 本論文では, その名称をそのまま用いることにした.

アズキの不定芽分化は, 尾崎 (1985) が4品種の上胚軸および上胚軸由来カルスを用いて試み, 植物体の再生に成功した. その後, 足立ら (1990) は品種エリモショウズで上胚軸からの分化を詳細に検討し, 佐藤ら (1990) は北海道の主要15品種で, 上胚軸および上胚軸由来カルスの再分化条件を検討し, 再分化個体を得た. これらの研究を通して, アズキの上胚軸および上胚軸由来カルスの再分化条件は品種間で異なっていることが明らかとなり, 佐藤ら (1990) は, ある特定の品種ごとに効率的な再分化培地組成などを検討する必要性を述べている. それ故, 本報において, 品種丹波大納言における, 不定芽分化およびオルガノジェニックカルスを経る再分化の系について報告する.

材料と方法

1. 供試材料

品種丹波大納言の種子を、株式会社タカヤマシード（京都）から購入し、実験に用いた。クリーンベンチ内で、5%次亜塩素酸ナトリウム溶液（有効塩素濃度約0.5%）に10分間浸漬して滅菌し、滅菌水で5回洗浄後、培地に播種した。基本培地は、ムラシゲスクーグ培地（Mura-shige and Skoog 1962）に、3%ショ糖、0.8%寒天を添加（pH 5.8:以後、MS培地という）し、 1.2 kg cm^{-2} で、10分間高圧滅菌したものを用いた。オルガノジェニックカルスからのシュート形成は、0.8%寒天と、0.2%ゲランガムを添加した培地で比較実験を行った。

2. アグロバクテリウムの接種

Agrobacterium rhizogenes は、ミキモピン型 1724 株を用いた。菌を、LB 培地（ 10 g L^{-1} ペプトン、 5 g L^{-1} 酵母抽出粉末、 10 g L^{-1} 塩化ナトリウム、pH 7.0）で一晩培養し、感染率を高めるため、アセトシリンゴン（3',5'-dimethoxy-4'-hydroxy-acetophenone）を菌培養液に添加した。初生葉切片（ $7 \text{ mm} \times 7 \text{ mm}$ ）を、この液に10分間浸漬して、濾紙で余分な菌を除き、植物ホルモンをまったく含まない（以後、ホルモンフリーという）MS 培地に移した。上胚軸切片（長さ約1 cm）は、ホルモンフリーのMS 培地に立て、その上部にアセトシリンゴンを含む菌培養液を $20 \mu\text{L}$ のせた。これらを、2日間、 25°C の暗黒下で培養した後に、 500 mg L^{-1} のクラフォランを添加したホルモンフリーのMS 培地に移植した。形成された根は、除菌培地で3週間ごとに継代した。

3. ミキモピンの検出

ミキモピンの検出は、ろ紙電気泳動法（Petit ら 1986）で行った。植物体を1 N 塩酸で摩砕後、遠心して30分以上放置し、上清を濾紙にスポットした。その濾紙を500 Vで40分間、電気泳動（バッファーは5%ギ酸、15%酢酸、pH 1.8）した。泳動後、乾燥させた濾紙に1%スルファニル酸と5%亜硝酸ナトリウムの当量混合液を噴霧し、再び乾燥して、15%炭酸ナトリウム溶液を噴霧し、橙黄色～赤色のスポットとして検出した。ミキモピン標品は、ヒスチジン（1 g）と α -ケトグルタル酸（1.25 g）を5 mLの2 M 水酸化ナトリウム液に溶解し、 80°C で4時間反応させて生成させた。

4. PCR

DNA は CTAB 法（Rogers and Bendich 1985）で抽出した。乳鉢で、200 mg の植物体を $600 \mu\text{L}$ CTAB バッファー（3%臭化セチルトリメチルアンモニウム、1.4 M 塩化ナトリウム、0.2% 2-メルカプトエタノール、20 mM EDTA、100 mM Tris-HCl, pH 8.0）で摩砕し、12000 rpm

で1分間遠心分離した。上清を、 60°C で30分間保温した後、 $500 \mu\text{L}$ クロロフォルムを加えて混合し、5000 rpmで5分間、室温で遠心分離した。水層に、 $300 \mu\text{L}$ イソプロパノールを加えて混合し、室温に15分間放置し、5000 rpmで5分間、室温で遠心分離した。沈殿物に、 $500 \mu\text{L}$ 75%エタノールを加え、5000 rpmで5分間、室温で遠心分離し、沈殿物を減圧乾固し、 $20 \mu\text{L}$ の TE バッファー（10 mM tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0）に溶かした。

PCR 法の反応液（ $30 \mu\text{L}$ ）は、抽出した DNA $1 \mu\text{L}$ 、緩衝液（ $\times 10$ ） $3 \mu\text{L}$ 、プライマー（ $5 \text{ pmol}/\mu\text{L}$ ） $1.2 \mu\text{L}$ ずつ、dNTP $2.4 \mu\text{L}$ 、Taq ポリメラーゼ $0.15 \mu\text{L}$ 、滅菌水 $21.05 \mu\text{L}$ とし、ミネラルオイルを1滴添加後、 94°C で30秒、 55°C で2分、 72°C で2分の反応を30回繰り返した。反応後、1%アガロースゲルで100 V、20分間、電気泳動し、 $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$ エチジウムブロマイド溶液に45分間浸漬後、紫外線下で遺伝子の増幅について検定した。

プライマーは、ミキモピン型およびアグロピン型 Ri プラスミドにおける *rol* 遺伝子群に存在するホモロジーを有する配列を基に選ばれた2種の20ヌクレオチド（5'-GT-GCTTTCGCATCTTGACAG-3', 5'-TCTCGCGAGAA-GATGCAGAA-3'）を用いた（清川ら 1992）。二つのプライマーで増幅される断片は、1636塩基対であった。

5. カルス化誘導と再分化

発芽後約1週間の幼植物（長さ約8 cm）の上胚軸切片を用いた。上胚軸の上部3 cm以下の部分から長さ約1 cmの上胚軸切片を切り出した。それらを、再分化実験培地に横にして置床し、培養した。

培養条件は、 25°C で24時間連続照明（照度約 8 Wm^{-2} ）とした。培養容器は、ガラスシャーレ（ $90 \text{ mm} \times 20 \text{ mm}$ ）またはポリプロピレン製キャップでふたをした試験管（ $25 \text{ mm} \times 125 \text{ mm}$ ）を用いた。

カルス形成率やシュート形成率を求める実験は、各処理区に10個以上の茎切片や5個以上のカルス（直径約1 cm）を用い、少なくとも2回の実験を繰り返し、同一の傾向を確認した。

結 果

1. 毛状根と不定芽の分化率

葉切片に、アセトシリンゴンを種々の濃度で含む *A. rhizogenes* 1724 株の培養液を、接種した。その結果、早い場合には10日後に、毛状根が誘導された。培養開始後30日目、60日目の葉切片からの毛状根分化率は、第1表の通りであった。葉切片からは、不定芽の分化は認められなかった。

同様の接種処理を行った上胚軸茎切片からも、10日後から、毛状根が誘導された。培養開始後30日目を過ぎると、一部の上胚軸切片に不定芽が分化してきた（第1図）。60日目の上胚軸切片からの不定芽分化率は、第1表のよ

第1表 アズキ品種丹波大納言の葉切片、上胚軸切片からの、*Agrobacterium rhizogenes* 1724 株による、毛状根および不定芽形成の誘導。

アセトシリングゴンの濃度 (mM)	葉切片		上胚軸切片
	毛状根形成率 (%)		不定芽分化率 (%)
	30 日目	60 日目	60 日目
0	30.8	30.8	17.0
0.03	23.1	30.8	16.7
0.3	30.8	46.2	14.9
1.0	38.5	38.5	12.5

葉切片、上胚軸切片に、種々の濃度のアセトシリングゴンを含む菌の培養液を接種した。培養は、25°C暗黒で行った。

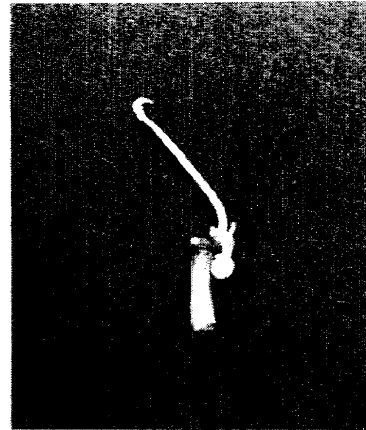
うであった。葉切片からだけでなく上胚軸切片からも毛状根の分化が認められたが、アズキの上胚軸切片からは、不定根が比較的容易に分化する。上胚軸切片から分化してきた根が、たんなる不定根か、*A. rhizogenes* の感染によって誘導された毛状根かは、この時点で、識別できない。そのため、上胚軸切片からの毛状根の形成率は算出しなかった。

A. rhizogenes の感染は、アセトシリングゴンにより促されることがいくつかの植物で知られている（浅尾ら 1994）。そのため、接種する菌培養液に種々の濃度のアセトシリングゴンを添加した。しかし、葉切片からの毛状根の分化および上胚軸切片からの不定芽の分化に対し、その効果は認められなかった（第1表）。

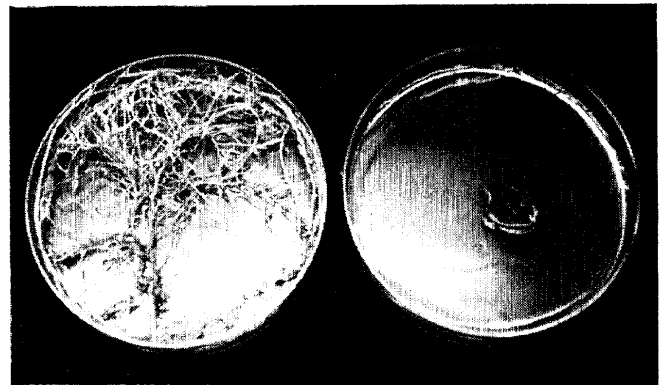
上胚軸切片から分化した不定芽は、茎が伸長しシュート（以後、不定芽の茎が1 cm 以上伸長したものにこの語を使う）として成長した。シュートはホルモンフリーの MS 培地に移植すると、根を分化し、試験管内で、幼植物体として成長を続けた。

葉切片から誘導された毛状根の中から増殖力の強い5クローンと、シュート由来の植物体20クローンを選び、アンチホルミン（2%，5分間処理）で無菌化し、ホルモンフリーの MS 培地で継代培養した。*A. rhizogenes* の接種処理をしていない上胚軸切片から生じた不定根は、この培地ではほとんど増殖しなかった。しかし、*A. rhizogenes* の接種処理をした葉切片から分化した毛状根は、この培地でも、かなりはやい速度で増殖した（第2図）。

継代培養した毛状根、シュート由来の植物体に、*A. rhizogenes* の Ri プラスミドの T-DNA に含まれるミキモピン合成遺伝子および *rol* 遺伝子が導入されているかを、ろ紙電気泳動法、PCR 法により調べた。その結果、毛状根では、ミキモピンと *rol* 遺伝子が検出され、*A. rhizogenes* の Ri プラスミドの T-DNA 領域が導入されたことが示された（第3図、第4図）。一方、シュート由来の植物体では、ミキモピンも *rol* 遺伝子も検出されなかった。この結果は、毛状根の分化は、*A. rhizogenes* の Ri プラスミドの T-DNA 領域が導入されて誘導されたこと、および、上胚軸切片からの不定芽は、Ri プラスミドの T-DNA 領域の導入とは無関係に分化したことを示している。



第1図 アズキ品種丹波大納言の上胚軸切片に形成されたシュート。
アズキ上胚軸切片は、ホルモンフリーの MS 培地で、25°C、暗黒下、60 日間培養するとシュートを分化する能力を持っている。



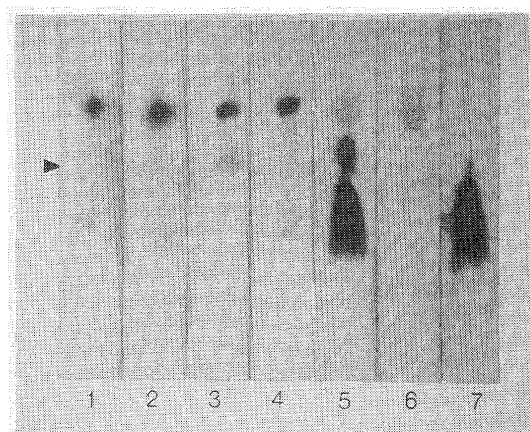
第2図 アズキ品種丹波大納言の不定根（右）と *Agrobacterium rhizogenes* 1724 株により誘導された毛状根（左）。不定根と毛状根を、ホルモンフリーの MS 培地に置床し、25°C、暗黒下、2 週間培養した。

2. ホルモンフリー培地での不定芽の分化

上胚軸切片は、*A. rhizogenes* の Ri プラスミドの T-DNA 領域が導入されないにもかかわらず、ホルモンフリーの培地上で不定芽を分化した。しかし、芽を持たない茎切片がホルモンフリーの培地上で不定芽を分化する現象は容易に起こり得ないものである。アズキの上胚軸切片がそのような性質を持つことは現在まで知られていない。

そこで、*A. rhizogenes* を感染させるために行った処理が上胚軸切片からの不定芽分化を促した可能性が考えられた。上胚軸切片からの不定芽の分化に対する *A. rhizogenes* と LB 培養液組成の効果を調べた結果が、第2表である。不定芽の分化は、*A. rhizogenes* という菌が存在していなくても起こった。また、LB 培養液組成には不定芽分化を促す効果は認められなかった。

以上の結果は、品種丹波大納言の上胚軸切片がホルモンフリーの培地で不定芽を分化しシュートとして発育させる能力を持つことを示唆している。そこで、ホルモンフリーの培地およびきわめて低濃度のベンジルアデニン（0.2–20 $\mu\text{g L}^{-1}$ ）、ナフタレン酢酸（0.02–0.2 $\mu\text{g L}^{-1}$ ）を含ん



第3図 アズキ品種丹波大納言の上胚軸切片および葉切片に *Agrobacterium rhizogenes* 1724 株を接種して得られた毛状根のろ紙電気泳動法によるミキモビンの検出。

1, 2: 菌接種後, 上胚軸切片から形成された不定芽由来の植物体の根,
3: 菌接種後, 葉切片から形成された毛状根,
4: 非形質転換体 (継代培養している植物体) の根,
5: ミキモビン (▶印の位置),
6: ミキモビン合成に用いた α -ケトグルタル酸,
7: ミキモビン合成に用いたヒスチジン。

第2表 アズキ品種丹波大納言の上胚軸切片からの不定芽分化に及ぼす *Agrobacterium rhizogenes* 1724 株の培養液の効果。

上胚軸切片上部に添加した液	不定芽分化率 (%)
—	20.0
LB培養液	21.0
菌培養液	16.3
菌をろ過除菌した培養液	21.3

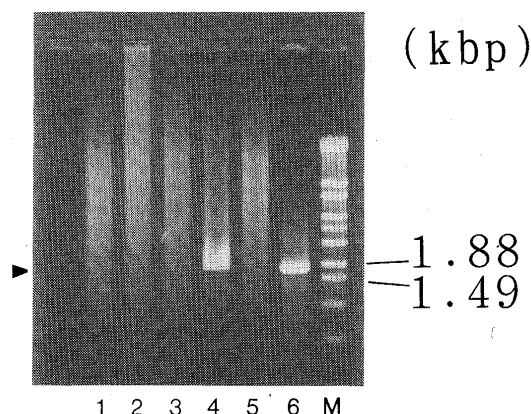
種々の培養液を上胚軸切片に接種後, 60 日間培養した。培養条件は第1表と同じ。

だ培地で, 上胚軸切片からの不定芽分化, および, カルス形成率を調べた。培養開始後, 30 日目の結果は, 第3表のようであった。

ホルモンフリーの培地では, カルス形成があまり行われなかったが, 不定芽が形成され (形成率約 11%), シュートとして成長した。これにより, アズキ上胚軸切片からの不定芽分化, シュート形成には, 必ずしも植物ホルモンが必要でないことが明らかになった。しかし, 低濃度のベンジルアデニン ($2 \mu\text{g L}^{-1}$) とナフタレン酢酸 ($0.02 \mu\text{g L}^{-1}$) の存在により, カルス形成は促され, 不定芽形成率は約 30%と上昇した。また, 不定芽は, 1 切片あたり平均で 2 本ほど形成された。第1表の結果と比べて不定芽形成率が低いのは, 第1表が 60 日目の結果であり, 第3表は 30 日目の結果であるためである。

3. オルガノジェニックカルの形成条件

上記の実験中に, 植物ホルモンを含んだ培地で不定芽を分化したカルスを, ホルモンフリー培地に移すと, 多数の小葉を分化しながら増殖するカルスに変化するものがあった (第5図)。このカルスは, 佐藤ら (1990) により, オ



第4図 アズキ品種丹波大納言の上胚軸切片に *Agrobacterium rhizogenes* 1724 株を接種して得られた毛状根の PCR 法による *rol* 遺伝子 (▶印の位置) の検出。

1, 2, 3: 菌接種後, 上胚軸切片から形成された不定芽由来の植物体の根,
4: 菌接種後, 葉切片から形成された毛状根,
5: 非形質転換体 (継代培養している植物体) の根,
6: *Agrobacterium rhizogenes* 1724 株の DNA,
M: マーカー。

第3表 アズキ品種丹波大納言の上胚軸切片からの不定芽分化に及ぼすベンジルアデニン (BA) およびナフタレン酢酸 (NAA) の効果。

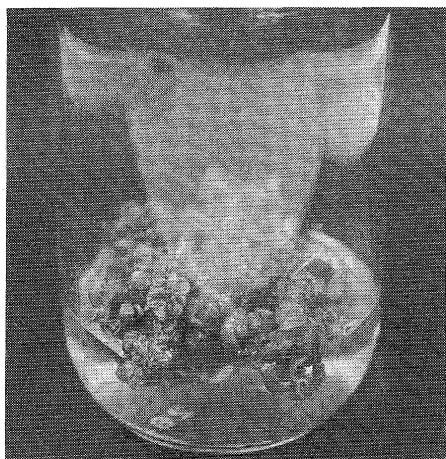
BA の濃度 ($\mu\text{g L}^{-1}$)	NAA の濃度 ($\mu\text{g L}^{-1}$)		
	0	0.02	0.2
0	11.4	20.0	13.3
0.2	10.0	20.0	5.0
2.0	16.7	30.0	3.3
20.0	16.7	16.7	3.3

上胚軸切片をそれぞれの培地に置床し, 30 日間培養した。培養条件は, 約 8 W m^{-2} の 24 時間連続光下で行った。不定芽形成率の単位は %。

ルガノジェニックカルスと呼ばれたものに該当するので, 以下このカルスにその名を用いる。このカルスの特徴は, 緒言に書いた通りである。

不定芽を分化していないカルスからのオルガノジェニックカルス形成率は低いように思われた。そこで, 不定芽未分化のカルスをホルモンフリー培地に移した場合と, 不定芽を分化したカルスをホルモンフリー培地に移した場合のオルガノジェニックカルス形成率を比較した (第4表)。不定芽を分化したカルスの場合, 移植前に不定芽部分は取り除いた。30 日後のオルガノジェニックカルス形成率は, 不定芽未分化のカルスの場合, 約 10~30%であったのに対し, 不定芽を分化したカルスの場合, 約 50~100%であった。それ故, オルガノジェニックカルの形成は, 不定芽を分化したカルスで起こりやすいと考えられる。

ホルモンフリーの培地に置かれた上胚軸切片は, 約 11%が不定芽を分化しシュートを形成する (第3表) けれども, 60 日間培養しても, オルガノジェニックカルスを形成しなかった。それに対し, 0.02 mg L^{-1} ベンジルアデニンを含んだ培地で 30 日間培養されて不定芽を分化した上胚軸切片由来カルスのオルガノジェニックカルス形成率



第5図 アズキ品種丹波大納言の不定芽を分化したカルスをホルモンフリーのMS培地に移して形成されたカルス。このカルスは、ホルモンフリーのMS培地で不定芽様の組織を分化しながら増殖する。

第4表 アズキ品種丹波大納言の不定芽未分化のカルスおよび不定芽を分化したカルスからのオルガノジェニックカルス形成率。

カルスを形成させた条件 (mgL ⁻¹)	オルガノジェニックカルス形成率(%)	
	不定芽未分化カルス	不定芽分化カルス
ホルモンフリー	0	0
BA (0.02)	0	50
BA (0.02) + NAA (0.00002)	30	75
BA (0.2)	20	50
BA (0.2) + NAA (0.0002)	10	100

上胚軸切片をホルモンフリーおよびホルモンを含む培地で30日間培養し、形成した不定芽未分化、あるいは不定芽分化カルスを、ホルモンフリーの培地に移した。培養条件は第3表と同じであり、30日培養後の結果である。

BA：ベンジルアデニン，NAA：ナフタレン酢酸。

第5表 アズキ品種丹波大納言のオルガノジェニックカルス形成におよぼすベンジルアデニン (BA) の効果。

BAの濃度 (mgL ⁻¹)	オルガノジェニックカルス形成率 (%)
0	60
0.01	20
0.1	0

上胚軸切片を、0.02 mgL⁻¹ BAを含む培地で30日間培養し、不定芽分化カルスを誘導後、BAを種々の濃度含む培地に移して30日間培養した。培養条件は第3表と同じ。

は、0.01 mg L⁻¹ ベンジルアデニンを含んだ培地に移して30日培養した場合、20%であった。同じカルスをホルモンフリー培地に移した場合、30日後には、約60%がオルガノジェニックカルスになった (第5表)。それ故、オルガノジェニックカルスの形成は、ホルモンが存在する条件からホルモンフリーの条件に移されることが刺激となって誘導されるものと考えられる。

4. オルガノジェニックカルスからのシュート形成

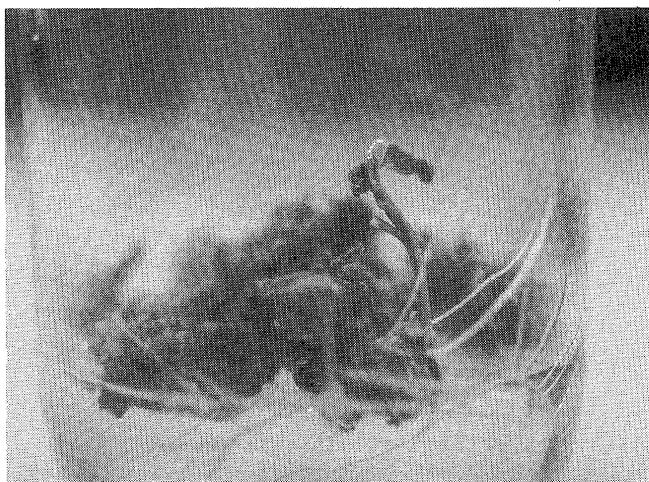
ホルモンフリー培地で形成されたオルガノジェニックカルスは、その培地で多数の小葉を分化しながら、増殖を続

けた。しかし、シュートの形成はみられなかった。それ故、オルガノジェニックカルスから不定芽が分化するためには、植物ホルモンが必要と考えられた。

そこで、ホルモンフリーの培地上で継代培養したオルガノジェニックカルスを種々の濃度のベンジルアデニン、ナフタレン酢酸を含む寒天培地に移し、シュート形成率を調べた。しかし、いずれの処理区でもシュート形成には至らなかった。また、継代培養中にオルガノジェニックカルスが褐変することがあった。それ故、これらの条件はオルガノジェニックカルスからの再分化には適していないと思われる。

培地に含まれる寒天に代え、ゲランガムを用いた場合、根の形成が促され、植物の再分化率が上昇することがある (Shigeta ら 1996)。そこで、MS培地に加えていた寒天 (0.8%) の代わりにゲランガム (0.2%) を用いたところ、時としてシュート形成が確認できた (第6図)。このことから、オルガノジェニックカルスの培養には、ゲランガムが適していることが示唆された。また、この時シュート形成したオルガノジェニックカルスは、ほとんどが不定根を形成していた。それ故、オルガノジェニックカルスからのシュート形成には、不定根が形成されることが必要であると考えられた。

ゲランガムを含んだMS培地に、種々の濃度のベンジルアデニン、ナフタレン酢酸を組み合わせる添加した培地を使用してオルガノジェニックカルスからのシュート形成実験を行った。その結果 (第6表)、ホルモンフリーで10%、ベンジルアデニンを含まない0.1 mg L⁻¹ ナフタレン酢酸の処理区で37.5%、1 mg L⁻¹ ナフタレン酢酸処理区では13%のシュート形成率が得られた。形成されたシュート数は、1カルス当たり平均2本であった。ベンジルアデニン単独では、オルガノジェニックカルスが褐変することがあり、ベンジルアデニンはシュート形成には不適であった。さらに、2,4-Dや、IAAなど、他のオーキシン



第6図 オルガノジェニックカルスから形成されたシュート。オルガノジェニックカルスを0.1 mg L⁻¹ ナフタレン酢酸を含むMS培地 (0.2%ゲランガムを含む) で培養すると、根の分化を伴い、シュートが形成されてくる。

第6表 アズキ品種丹波大納言のオルガノジェニックカルスからのシュート形成に及ぼす植物ホルモンの効果。

BA の濃度 (mgL ⁻¹)	オーキシンの濃度 (mgL ⁻¹)					
	NAA		IAA		2,4-D	
	0	0.1 1	0.1 1	0.1 1	0.1 1	0.1 1
0	10	37.5 13	0 0	0 0	0 0	0 0
3	0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0

ホルモンプリーのMS培地(0.8% 寒天培地を含む)で継代培養したオルガノジェニックカルスを、ベンジルアデニン(BA)、ナフタレン酢酸(NAA)を含むMS培地(0.2% ゲランガムを含む)で、30日間培養した。

培養条件は第3表と同じ。シュート形成率の単位は%。

類は、多少、不定根形成を促進したが、シュート形成は促進しなかった。以上の結果、オルガノジェニックカルスからのシュート形成には、ナフタレン酢酸が最も適していると考えられる。

考 察

アズキ(品種丹波大納言)上胚軸切片は、植物ホルモンをまったく含まないMS培地(0.8%寒天を含む)上で不定芽を形成し、シュートとして発育させる能力を持つことが、本論文で明らかになった。ホルモンプリーの培地上での不定芽形成は、他の品種では報告されていない。というより、アズキの組織培養的研究を報告した尾崎(1985)、佐藤ら(1990)のデータをみる限り、調べられていない。それ故、この現象が、品種丹波大納言に特有の現象であるか、アズキに普遍的な性質であるのかは、今後調べられなければならない。

低濃度の植物ホルモンの存在により、カルス形成は促され、不定芽形成率は上昇した。カルス化した部分は茎切片の下部であり、ほとんどの不定芽分化はその部分から起こった。茎切片上部より下部がカルス化しやすい性質は佐藤ら(1990)によって他品種でも観察されており、アズキ上胚軸切片には、カルス形成および不定芽分化能力に強い極性が存在していることが品種間の共通性と考えられる。

誘導されたカルスは、ホルモンプリーの培地に移されることが刺激となって、オルガノジェニックカルスに変化した。特に、オルガノジェニックカルスの形成率は、不定芽を分化したカルスで高かった。しかし、ホルモンプリーの培地上で形成された上胚軸切片由来のカルスをホルモンプリーの培地に移しても、オルガノジェニックカルスは形成されなかった(第4表)。それ故、植物ホルモンが存在する条件から存在しない条件に移されることが刺激となって、オルガノジェニックカルスが誘導されることが考えられる。しかし、低濃度の植物ホルモンを含む培地上では、不定芽を分化したカルスを放置すると、オルガノジェニックカルスの形成が観察された。これは、低濃度の植物ホルモンが消費されたためかも知れない。

オルガノジェニックカルスからの再分化条件を検討した結果、オルガノジェニックカルスからのシュート形成は、

寒天(0.8%)をゲランガム(0.2%)に置き換えたMS培地にナフタレン酢酸を添加した場合に促された。ナフタレン酢酸を添加しない場合でも、ゲランガムを含む培地で、シュートが形成されることがあったが、その場合、不定根が形成されていた。また、培地に添加したナフタレン酢酸は、不定根形成を促進した。それ故、オルガノジェニックカルスからのシュート形成には、不定根の誘導が不可欠であり、ナフタレン酢酸は、不定根の形成を介して作用していると考えられる。

他品種のアズキでは、カルスを経ての再分化系が知られ(佐藤ら 1990)、品種丹波大納言においてもその可能性が考えられる。しかし、アズキカルスの再分化能は、培養期間が長くなるとともに、著しく低下することが知られている(佐藤 1995)。それに対し、オルガノジェニックカルスは、培養期間が長くなっても、その再分化能を高く維持し続ける(佐藤 1995)。また、本報で示したように、オルガノジェニックカルスから形成されたシュートは、すでに不定根を分化しているため、発根させる必要がない。さらに、オルガノジェニックカルスから分化した不定芽様の組織には、多数の白色のアルビノが含まれている場合があった。それ故、オルガノジェニックカルスから分化したシュートには、かなりの変異が期待でき、その中には有用な変異も起こり得る可能性が考えられる。それ故、オルガノジェニックカルスからの再分化系は、カルスからの再分化系とは、違った価値を持つものと位置づけられる。

本論文は、アズキ上胚軸切片からの不定芽の分化、オルガノジェニックカルスの誘導条件、および、オルガノジェニックカルスからのシュートの形成条件を明らかにした。遺伝資源の比較的乏しいアズキでは、従来の交配による品種改良では、大きな効果は期待できない(佐藤 1995)。特に、冷害や、除草剤高感受性による薬害などは、アズキの栽培において、品種間に共通した害であり、これらを克服することが、アズキ育種の重要な課題の一つであるといえる(星川 1996)。その手段として、有用な外来遺伝子導入などのバイオテクノロジー的な手法は、有効である。今回得られた知見は、バイオテクノロジー的な手法を行う上での基礎技術であり、アズキの品種改良を進める上で有用である。

引用文献

- 浅尾浩史・荒井滋・佐藤隆徳・平井正志・日比忠明 1994. *Agrobacterium tumefaciens* によるイチゴ形質転換体の作出. 植物組織培養 11: 19-25.
- 足立大山・喜久田嘉郎・岡沢養三 1990. アズキ「エリモショウズ」の上胚軸カルスからの植物体再生. 北農 57: 63-65.
- David, C., M.D. Chilton and J. Tempe 1984. Conservation of T-DNA in plants regenerated from hairy root cultures. Bio/Technology 2: 73-76.
- 星川清親 1996. 新編食用作物 改訂第13版. 養賢堂, 東京. 460-479.

- Kamada, H., A. Ono, T. Saitou and H. Harada 1992. No requirement of vernalization for flower formation in Ri-transformed *Cichorium* plants. *Plant Tissue Culture Letters* 9: 206–208.
- 清川繁人・菊池泰弘・鎌田博・原田宏 1992. PCR 法による Ri プラスミド *rol* 遺伝子の検出と形質転換確認への応用. *植物組織培養* 9: 94–98.
- Murashige, T. and F. Skoog 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473–497.
- Oono, Y., K. Kanaya and H. Uchimiya 1990. Early flowering in transgenic tobacco plants possessing the *rolC* gene of *Agrobacterium rhizogenes* Ri plasmid. *Jpn. J. Genet.* 65: 7–16.
- 尾崎厚一 1985. アズキの上胚軸ならびに上胚軸由来カルスからの植物体の再生. *植物組織培養* 2: 59–62.
- Petit, A., A. Berkaloff and J. Tempe 1986. Multiple transformation of plant cells by *Agrobacterium* may be responsible for the complex organization of T-DNA in crown gall and hairy root. *Mol. Gen. Genet.* 202: 388–394.
- Rogers, S.O. and A.J. Bendich 1985. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mumminified plant tissue. *Plant Mol. Biol.* 5: 69–76.
- 佐藤毅 1995. アズキ (*Vigna angularis* OHWI & OHASHI) の細胞育種に関する基礎研究. 北海道立農業試験報告 第 87 号: 1–74.
- 佐藤毅・安積大治・原田竹雄・松川勲 1990. アズキ上胚軸および上胚軸由来カルスからの植物体再分化. 北海道立農試集報 61: 51–60.
- Shigeta, J., K. Sato, S. Tanaka, M. Nakayama and M. Mii 1996. Efficient plant regeneration of asparagus by inducing normal roots from in vitro multiplied shoot explants using gellan gum and glucose. *Plant Sci.* 113: 99–104.
- Tepfer, D. 1984. Transformation of several species of higher plants by *Agrobacterium rhizogenes*: Sexual transmission of the transformed genotype and phenotype. *Cell* 37: 959–967.

Plant Regeneration from Epicotyl Segment and Callus of *Vigna angularis* (cv. Tanbadainagon): Wataru TAKAHASHI¹⁾, Junjo MATSUSHITA¹⁾, Takako KOBAYASHI²⁾, Osamu TANAKA^{*,1)} and Toshio BEPPU³⁾ (¹⁾*Faculty of Science, Konan University, Kobe 658-8501, Japan*; ²⁾*Hontakasagoya Co. Ltd.*, ³⁾*Teikyo University of Science and Technology*)

Abstract: Epicotyl segments (approximately 1 cm in length) of *Vigna angularis* (cv. Tanbadainagon) inoculated with *Agrobacterium rhizogenes* produced hairy roots and/or adventitious buds. Mikimopine and the predictable PCR band for *rol* gene were detected in the hairy roots, and plantlets obtained from the adventitious buds were negative for both products. These results suggested that the segments can induce the formation of adventitious buds without an infection of *A. rhizogenes*; therefore this possibility was examined. As a result, adventitious buds were formed from the segments on a hormone-free medium and promoted by low concentrations of 6-benzyladenine (BA) and l-naphthaleneacetic acid (NAA). When the calli induced on the medium containing BA and/or NAA were transplanted onto the hormone-free medium, they induced an organogenic callus, which was growing with the formation of a green leaflike structure. Especially, the frequency of organogenic callus formations was very high in calli that had once produced adventitious buds. The development of shoots from organogenic callus was induced on the medium containing gellan gum with NAA. Shoots (more than 1 cm in length) cut from epicotyl segments and organogenic callus produced roots and developed actively on the hormone-free medium. The procedures obtained in the present study are useful for the genetic improvement of the plant via biotechnology.

Key words: Organogenic callus, Regeneration, Tanbadainagon, *Vigna angularis*.