

# ミヤマタタビ (*Actinidia kolomikta*) 培養体由来根組織からの器官形成, 不定胚誘導ならびに植物体再生

劉 永立・増田 清・原田 隆

北海道大学農学部 060 札幌市北区北9条西9丁目

Plantlet Regeneration, Organ Formation and Somatic Embryogenesis from in Vitro-Cultured Root Tissue  
of *Actinidia kolomikta*

Yong-Li Liu, Kiyoshi Masuda and Takashi Harada  
Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo 060

## Summary

Root segments derived from cultures of *Actinidia kolomikta* were cultured in vitro on BW medium (Sugawara et al., 1994). Twelve combinations of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) (0, 0.1, 1 and 10 $\mu$ M) and zeatin (0, 1 and 10 $\mu$ M) were tested at 25°C, under a 16-hr photoperiod with a light intensity of 70  $\mu$ mol $\cdot$ m<sup>-2</sup> $\cdot$ s<sup>-1</sup>. Calli formed from root segments at all concentrations of 2,4-D and zeatin. Of the adventitious buds which formed from the callus, 92% developed into shoots with a combination of 0.1 $\mu$ M 2,4-D and 10 $\mu$ M zeatin. Root segments excised from cultures formed the most somatic embryos when cultured with 10 $\mu$ M of 2,4-D and zeatin. When young leaflets with roots were cultured on the BW medium with zeatin, adventitious buds formed on the root tip. The rate of adventitious bud formation increased with an increase in zeatin concentration.

The adventitious buds developed into shoots; shoots rooted and grew into vigorous plantlets when transferred onto Miller's medium with 1 $\mu$ M 1-naphthaleneacetic acid (NAA).

**Key Words:** *Actinidia kolomikta*, Adventitious bud, Somatic embryos.

## 緒 言

北海道内の山地に自生しているミヤマタタビ (*Actinidia kolomikta* Maxim.) は、耐寒性が強く、果実は無毛で品質もよく、特有の芳香をもち、生食されるとともに果実酒の原料にもなる有用な野生果樹である。ミヤマタタビは、マタタビ属果樹の育種素材としても活用できるほか、栽培化することにより食用として広く利用されるようになるが、この場合には、優良系統の選抜および品種改良が必要となる。品種改良には、交雑育種や組織・細胞培養系を利用した変異の拡大、細胞融合、遺伝子導入などの方法が用いられるが、そのためには、適切な培養系を作出しておくことが必要である。マタタビ属植物の中で組織培養が試みられたものとしては、キウイフルーツ (*Actinidia chinensis* Planch.) (Harada, 1975; Barbieri・Morini, 1987), サルナシ (*Actinidia arguta* Planch.) (劉ら, 1995), マタタビ (*Actinidia*

*polygama* Miq.) (Sugawara ら, 1994) などがある。ミヤマタタビについては、著者ら (劉ら, 1997) が新梢節間部の培養において形成された不定芽からの植物体再生について報告したのみで、不定胚を経由する植物体再生経路は現在まで確立されていなかった。本研究においてミヤマタタビの培養体根組織の in vitro 培養における不定胚および器官の形成ならびに植物体再生の基本的な経路を見出すことができたので報告する。

## 材料および方法

**実験1. 培養体の根切片からの器官および不定胚の形成に及ぼす生長調節物質の影響**  
前報 (劉ら, 1997) のミヤマタタビ (*Actinidia kolomikta*) 無菌培養系で形成されたシュートおよび根をもつ培養体から根の切片 (長さ0.5cm) を切り出して培養した。外植片は、容器 (100ml 三角フラスコ) 当たり4個、区当たり20個を用い、水平に置床した。

培地は、Broad-Leaved Tree 培地と Woody Plant 培地の各成分を 1/2 ずつ混合した BW 培地 (Sugawara ら,

1994), ショ糖 $30\text{g} \cdot \text{liter}^{-1}$  およびゲルライト $2\text{g} \cdot \text{liter}^{-1}$  を基本とし, 生長調節物質を添加したのち, pH5.7に調整したものをを用いた. 生長調節物質については 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) 0, 0.1, 1 および  $10\mu\text{M}$  とゼアチン 0, 1 および  $10\mu\text{M}$  とを組み合わせた 12 区を設けた. 容器当たり 25 ml の培地を注入し, オートクレーブにより滅菌した ( $1.2\text{kg} \cdot \text{cm}^{-2}$ ,  $120^\circ\text{C}$ , 15 分間). 培養は  $25^\circ\text{C}$ ,  $70\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  (白色蛍光灯), 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について, また, 培養 13 週間後にはシュート, 根および不定胚の形成について調査した.

## 実験 2. 培養体由来幼葉の培養における根の形成および根からのシュートの直接分化

### 1. 培養体由来幼葉の培養における根の形成に及ぼす生長調節物質の影響

ミヤマタタビ培養体の葉は葉脈が多く, オーキシンの含む培地で培養した場合, 幼葉の葉脈部から容易に発根することが予備実験によって確認された. 本実験では, ミヤマタタビ培養体の幼葉 (葉長 1.5~2cm) を切り取り, 実験 1 と同様に 2,4-D 0, 0.1, 1 および  $10\mu\text{M}$  とゼアチン 0, 1 および  $10\mu\text{M}$  とを組み合わせ添加した BW 培地に水平に置床した. 外植片は容器 (100ml 容三角フラスコ) 当たり 3 個, 区当たり 18 個を用いた. 培養は実験 1 と同様に行い, 培養開始 7 週間後に根の形成について調査した.

### 2. 培養体由来幼葉の培養によって形成された根からのシュートの直接分化に及ぼすゼアチンの影響

ミヤマタタビ培養体の幼葉 (葉長 1.5~2cm) を切り取り, 2,4-D  $1\mu\text{M}$  を含む BW 培地に水平に置床し, 上述の条件下で 4 週間培養して, 根を多数形成させた.

次に, カルスと根が付いている幼葉を半分に切断して, カルスおよび根をもつ外植片を作った. BW 培地にゼアチン 0, 0.1, 1 および  $10\mu\text{M}$  を添加した培地を用いた. 外植片は, 容器 (100 ml 三角フラスコ) 当たり 3 個, 区当たり 12 個とし, 根にカルスを形成させないため根が培地に接触しないように水平に置床した. 培養は実験 1 と同様に行い, 培養開始 60 日後に調査した.

## 結果および考察

### 実験 1. 培養体の根切片からの器官および不定胚の形成に及ぼす生長調節物質の影響

#### 1. カルスおよび器官形成

根切片からのカルス形成については, 生長調節物質を添加した区のすべての切片でみられ, 生長調節物質無添加区でもカルス形成率は高かった. カルスの生長は 2,4-D およびゼアチンの濃度が高くなると旺盛になった (第 1 表). また, 2,4-D 高濃度の培地では白色を帯びたカルスが形成されたが, ゼアチン高濃度の培地では緑色を帯びた硬いカルスが形成された.

培養体の根切片に形成されたカルスの表層に不定芽が形成され, この不定芽が発育してシュートとなった (第 1 図). ゼアチン無添加の培地ではシュートは形成されなかった. 第 1 表に示したように, シュート形成率は, ゼアチン  $10\mu\text{M}$  と 2,4-D  $0.1\mu\text{M}$  とを組み合わせたとき最も高かった. シュート数は, シュート形成率と同じ傾向を示し, ゼアチン濃度が高くなるに従って外植片当たりのシュート数が多くなった.

また, 根切片からは, カルスを經由して不定根も形成された. 不定根形成率は, ゼアチンの濃度が高くなるに従って低くなった. また, 2,4-D  $0.1\mu\text{M}$  添加区において高い発根率が得られた. 根数は,  $0.1\mu\text{M}$  添加区においてやや多かったが, 根数に及ぼすゼアチンの影響につ

Table 1. Effects of 2,4-D and zeatin on callus, organ and somatic embryo formation from root segments of *A. kolomikta*.

2,4-D ( $\mu\text{M}$ )	Zeatin ( $\mu\text{M}$ )	Number of explants tested <sup>z</sup>	% of callus formation <sup>z</sup>	callus formation <sup>x</sup>	% of shoot formation <sup>y</sup>	Number of shoots per explant <sup>y</sup>	% of root formation <sup>y</sup>	Number of roots per explant <sup>w</sup>	% of somatic embryo formation <sup>y</sup>	Number of somatic embryos <sup>w</sup>
0	0	16	94	+	0.0	0	56.3	$2.2 \pm 0.5$	0.0	0
0	1	16	100	++	6.3	$1 \pm 0^w$	43.8	$1.0 \pm 0.2$	0.0	0
0	10	16	100	++	31.3	$3.2 \pm 0.9$	37.5	$1.5 \pm 0.5$	0.0	0
0.1	0	16	100	++	0.0	0	75.0	$2.1 \pm 0.4$	0.0	0
0.1	1	16	100	+++	37.5	$2.3 \pm 0.6$	62.5	$2.2 \pm 0.5$	0.0	0
0.1	10	16	100	+++	91.7	$2.5 \pm 0.4$	41.7	$3.4 \pm 1.0$	0.0	0
1	0	20	100	+++	0.0	0	55.0	$1.7 \pm 0.4$	0.0	0
1	1	20	100	+++	5.0	$2 \pm 0$	40.0	$1.9 \pm 0.4$	5.0	0
1	10	20	100	+++	5.0	$2 \pm 0$	33.3	$1.6 \pm 0.7$	0.0	0
10	0	20	100	+++	0.0	0	45.0	$2.1 \pm 0.4$	0.0	0
10	1	20	100	+++	0.0	0	10.0	$1.0 \pm 0.3$	10.0	$1.5 \pm 0.5$
10	10	20	100	+++	5.0	$2.3 \pm 0.6$	25.0	$1.5 \pm 0.4$	15.0	$1.3 \pm 0.4$

<sup>z</sup> Data were taken after 7 weeks of culture.

<sup>y</sup> Data were taken after 13 weeks of culture.

<sup>x</sup> Diameter of callus: +  $\leq 5$  mm, 5 mm < ++  $\leq 10$  mm, 10 mm < +++.

<sup>w</sup> Mean  $\pm$  SE.



Fig. 1. Shoots formed via callus induced from root segments of *A. kolomikta* cultures.

いては一定の傾向が認められなかった。

## 2. 不定胚形成

ミヤママタタビ培養体の根を培養した場合には、カルスの表層に球状胚が形成された。球状胚の細胞は、カルス細胞より緻密であり、細胞質で満たされ、核が大きかった (第2図-A)。球状胚は、心臓型胚、魚雷型胚を経由し、やがて子葉および根をもつ幼植物になった (第2図-BおよびC)。このような不定胚由来の幼植物体は1. の不定芽由来のシュートと容易に区別することができた。

ミヤママタタビ培養体の根由来の不定胚は、2,4-D  $1\mu\text{M}$  とゼアチン  $1\mu\text{M}$  との組合せおよび2,4-D  $10\mu\text{M}$  とゼアチン  $1$  または  $10\mu\text{M}$  との組合せにおいてのみ得られた。不定胚の形成率は低く外植片当たりの数は少なかったが、不定胚を経由する植物体再生が可能であることが確認された。

ミヤママタタビでは、培養体からの根切片を 1-naphthalene acetic acid (NAA) と 6-benzyladenine (BA) またはゼアチンとを組み合わせた培地または2,4-D と BA とを組み合わせた培地で培養すると、不定芽のみが形成されることが予備実験により確認された。しかし、本実験の2,4-D とゼアチンとの組合せ添加区では不定胚の形成が確認され、この不定胚が幼植物となった。このことからミヤママタタビの組織切片からの不定胚形成には、2,4-D とゼアチンとの組合せが最適であると考えられる。

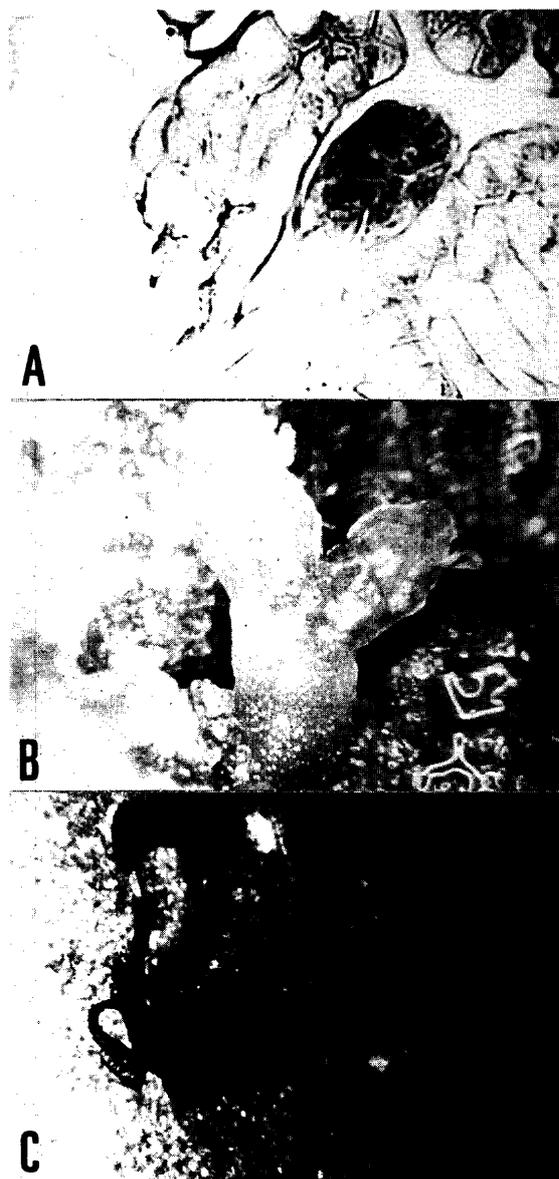


Fig. 2. Plantlet regeneration via somatic embryo from root segments of *A. kolomikta* cultures. (A) Globular-stage embryo, (B) and (C) plantlet regenerated from somatic embryo.

不定芽形成と不定胚形成が同時に起こる例は他の植物でも報告されている (Rao ら, 1973; Sangwan・Harada, 1975; Tanimoto・Harada, 1980; Barwale ら, 1986) が、ミヤママタタビ培養体の根切片を培養すると不定胚と不定芽が同じ培地で形成されることは本実験において初めて見出された。これらの培養系における植物体再生の各経路は、生物工学的な手段による品種改良の際に利用できるものと考えられる。

### 実験2. 培養体由来幼葉の培養における根の形成および根からのシュートの直接分化 1. 培養体由来幼葉の培養における根の形成に及ぼす生長調節物質の影響

ミヤママタタビ培養体の葉を培養した場合、葉脈および葉縁から根が形成された。根形成率は2,4-D の濃度

が高くなるに従って上昇したが、ゼアチンの濃度が高くなるに従い形成が抑制される傾向がみられた(第2表)。また、切片当たりの根数は、2,4-D 無添加および0.1 $\mu$ M 添加の場合にはゼアチン濃度との組合せの間に大きな差はみられなかった。2,4-D 1および10 $\mu$ M 添加区では、根数は多かったが、ゼアチンの添加により減少した。

以上のように、葉からの不定根形成は、2,4-D およびゼアチン添加の影響を受け、2,4-D 1および10 $\mu$ M の単独添加区では不定根形成率が高く、根数が多かった。また、2,4-D 1 $\mu$ M 添加区では、切片から形成されたカルスが2,4-D 10 $\mu$ M 添加区より小さくなり、移植後の培養では根の生長が良好であった。また、2,4-D 10 $\mu$ M 添加区のカルスは移植後に褐変し易く、2,4-D 1 $\mu$ M 添加区で形成されたカルスの方が移植に適していると考えられる。

## 2. 培養体由来幼葉の培養によって形成された根からのシュートの直接分化に及ぼすゼアチンの影響

根を形成した幼葉を、ゼアチン添加培地に移植して培養することにより、その根の先端部から、カルスを経由することなく、不定芽が形成された(第3図)。移植3週間後には、根の先端の一部分が肥大して不定芽となり、5週間後にシュートになった。

ミヤマタタビ培養体に形成された不定根からの直接的な不定芽形成はゼアチンにより誘起されることがわかった(第3表)。添加したゼアチン濃度が高くなるに伴い、不定芽形成率が高くなり、切片当たり不定芽数が多くなった。この不定芽は伸長してシュートを形成した。不定根からの不定芽形成は、ギョウジャニンニク種子の無菌培養によって得た芽生えの幼根においても報告されている(金澤ら, 1991; Kanazawaら, 1992)。

**Table 2.** Effects of 2,4-D and zeatin on callus formation from juvenile leaflets of *A. kolomikta* plantlets regenerated in vitro<sup>z</sup>.

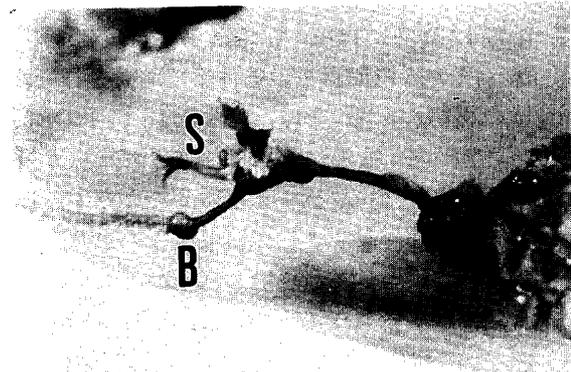
2,4-D ( $\mu$ M)	Zeatin ( $\mu$ M)	Number of explants tested	% of root formation	Number of roots per explant <sup>y</sup>
0	0	18	11.1	1.5 $\pm$ 0.7
0	1	18	16.7	1.0 $\pm$ 0.5
0	10	18	11.1	1.5 $\pm$ 0.7
0.1	0	18	27.7	1.8 $\pm$ 0.6
0.1	1	18	22.2	1.2 $\pm$ 0.2
0.1	10	18	11.1	1.0 $\pm$ 0.0
1	0	18	100.0	7.3 $\pm$ 0.6
1	1	18	66.7	7.0 $\pm$ 1.5
1	10	18	33.3	1.0 $\pm$ 0.0
10	0	18	100.0	11.6 $\pm$ 1.0
10	1	16	75.0	4.8 $\pm$ 0.9
10	10	16	50.0	4.9 $\pm$ 0.6

<sup>z</sup> Data were taken after 7 weeks of culture.

<sup>y</sup> Mean  $\pm$  SE.

実験1および実験2において得られたシュートを基部から切り取り、NAA 1 $\mu$ M を添加した Miller 培地 (Miller, 1965) へ移植して培養したところ、発根がみられ、5週間後にはすべてのシュートが発根し、健全な幼植物となった(第4図)。

以上のように、ミヤマタタビ培養体の幼葉の葉身部を切り取って培養すると葉脈部および葉縁から直接的に根が形成された。根を形成した幼葉を移植すると根の先



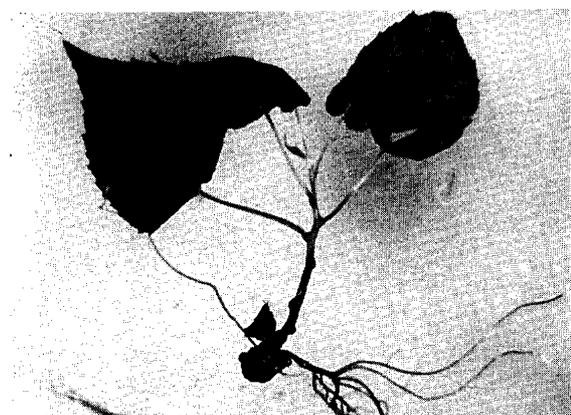
**Fig. 3.** Adventitious bud and shoot formed directly from a root of *A. kolomikta* cultures. B: bud, S: shoot.

**Table 3.** Effects of zeatin on adventitious bud formation from roots of *A. kolomikta*<sup>z</sup>.

Zeatin ( $\mu$ M)	Number of explants tested	% of adventitious bud formation <sup>y</sup>	Number of adventitious buds per explant <sup>y</sup>
0	12	0	0
0.1	12	7.6 $\pm$ 3.8	1.4 $\pm$ 0.4
1	12	28.5 $\pm$ 3.9	2.1 $\pm$ 0.4
10	12	45.1 $\pm$ 5.1	2.7 $\pm$ 0.3

<sup>z</sup> Data were taken after 7 weeks of culture.

<sup>y</sup> Mean  $\pm$  SE.



**Fig. 4.** Roots formed from the basal portion of a shoot which was derived from *A. kolomikta* root culture on Miller's medium with 1 $\mu$ M NAA.

端近傍部において直接的に不定芽が形成され、さらに、移植後の培養により幼植物になることなどが明らかになった。この培養系は、ミヤマタタビの生物工学的な手段による品種改良のほかに、大量増殖にも利用できる。

### 摘 要

ミヤマタタビ (*Actinidia kolomikta*) の培養体から切り出した根切片を培養し、器官形成、不定胚形成および植物体再生について検討した。BW 培地 (Sugawara ら, 1994) を基本とし、2,4-D (0, 0.1, 1 および 10  $\mu\text{M}$ ) とゼアチン (0, 0.1 および 1  $\mu\text{M}$ ) とを組み合わせて添加した 12 種の培地を用い、25 °C, 70  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , 16 時間日長の条件下で培養を行った。

培養体の根切片からのカルス形成は、2,4-D およびゼアチン濃度が高くなるに従って促進された。カルスから不定芽が形成され、やがてシュートにまで生長した。シュート形成率は、ゼアチン 10  $\mu\text{M}$  と 2,4-D 0.1  $\mu\text{M}$  とを組み合わせて添加したとき最も高くなった。

培養体の根を培養した場合には、2,4-D 1  $\mu\text{M}$  とゼアチン 1  $\mu\text{M}$  との組合せ添加区および 2,4-D 10  $\mu\text{M}$  とゼアチン 1 または 10  $\mu\text{M}$  との組合せ添加区において不定胚形成が観察された。

培養体から切り取った幼葉を培養すると葉脈および葉縁から発根し、このような状態の幼葉をゼアチンを含む BW 培地に移植して培養すると、その根の先端部から不定芽が形成された。この場合、ゼアチン濃度が高くなるに従って不定芽形成率が高くなった。

不定芽から形成されたシュートを切り出して NAA 1  $\mu\text{M}$  を添加した Miller 培地へ移植したところ、すべてのシュートが発根し、旺盛に生長する健全な幼植物になった。

### 引用文献

Barbieri, C. and S. Morini. 1987. Plant regeneration from

*Actinidia callus culture*. J. Hort. Sci. 62 : 107-109.

Barwale, U. B., H. R. Kerns and J. M. Widholm. 1986. Plant regeneration from callus cultures of several soybean genotypes via embryogenesis and organogenesis. Planta 167 : 473-481.

Harada, H. 1975. In vitro organ culture of *Actinidia chinensis* Planch. as technique for vegetative multiplication. J. Hort. Sci. 50 : 81-83.

金澤俊成・荒木 肇・八鍬利郎. 1991. ギョウジャニンニクの根からの不定芽の形成. 園学雑. 60 (別2) : 232-233.

Kanazawa, T., H. Araki and T. Yakuwa. 1992. Plant regeneration from tissue cultured-root in *Allium victorialis* L. ssp. *Platyphyllum* Hult. Acta Horticulturae. 319 : 209-214.

劉 永立・笠井 登・原田 隆. 1995. サルナシ (*Actinidia arguta* Planch.) 組織の in vitro 培養における器官形成および個体再生. 園学雑. 64:261-265.

劉 永立・並木弘毅・笠井 登・原田 隆. 1997. ミヤマタタビ (*Actinidia kolomikta* Maxim.) 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. 65 : 671-676.

Miller, C.O.: 1965. Evidence for the natural occurrence of zeatin and derivatives: compounds from maize which promote cell division. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 54 : 1052-1058.

Rao, P. S., W. Handro and H. Harada. 1973. Hormonal control of differentiation of shoots, roots and embryos in leaf and stem cultures of *Petunia inflata* and *Petunia hybrida*. Physiol. Plant. 28 : 458-463.

Sangwan, R. S. and H. Harada. 1975. Chemical regulation of callus growth, organogenesis, plant regeneration, and somatic embryogenesis in *Antirrhinum majus* tissue and cell cultures. J. Exp. Bot. 26 : 868-881.

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.

Tanimoto, S. and H. Harada. 1980. Hormonal control of morphogenesis in leaf explants of *Perilla frutescens* Britton var. *Crispa* Decaisne f. *Viridi-crispa* Makino. Ann. Bot. 45 : 321-327.