



Title	馬鈴薯の組織培養に関する生理学的研究 : 第1報 Callus 形成および発根に及ぼす α -naphthaleneacetic acid および 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid の影響
Author(s)	桂, 直樹; KATSURA, Naoki; 岡沢, 養三 他
Citation	北海道大学農学部邦文紀要, 7(2), 301-306
Issue Date	1970
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/11800
Type	departmental bulletin paper
File Information	7(2)_p301-306.pdf



馬鈴薯の組織培養に関する生理学的研究

第1報 callus 形成および発根に及ぼす α -naphthaleneacetic acid および 2,4-dichlorophenoxyacetic acid の影響

桂 直樹・岡沢養三・田川 隆

(北海道大学農学部植物学教室)

Physiological studies on the potato tissue cultured *in vitro*

Part 1. Effect of α -naphthaleneacetic acid and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on the callus and root formation

Naoki KATSURA, Yoza OKAZAWA and Takashi TAGAWA

(Department of Botany, Faculty of Agriculture,
Hokkaido University, Sapporo, Japan)

Received August 16, 1969

緒 言

多くの植物の組織培養において、callus の生長に関し、auxin と cytokinin の相互作用が知られている^{2),6),7),9)}。これに関しては両者は相互依存的な関係にあるか、あるいはそれらの作用の総和にすぎないのかという点が問題とされている。これを解明するには、callus 形成におけ

るこれら生長物質の役割を検討することがきわめて重要なことである。また細胞の増殖を誘起するものが脱分化の要因であるとするれば³⁾ 脱分化とさらに器官形成における auxin と cytokinin の相互作用¹³⁾ についても詳細な検討を必要とする。

馬鈴薯の髄部柔組織の組織培養において、適当な濃度の auxin と cytokinin が callus や不定根の形成を誘起することはすでに報告した¹²⁾。前報において kinetin (KIN) は callus 形成には必ずしも必要ではないが、根の形成には不可欠であることを示した。その際 auxin として用いた α -naphthaleneacetic acid (NAA) と 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) の間に作用性の相違を認めた。本研究はその相違を cytokinin との相互作用との関連性について検討を加えたものである。

本研究を遂行するにあたり、種々実験上の御援助を賜わった北海道大学農学部喜久田嘉郎博士に深甚な謝意を表す。

材料および方法

収穫した馬鈴薯塊茎(品種男爵薯)を2°C暗処に貯蔵し、これを適宜材料に供した。培養方法は前報¹²⁾と同様である。また培養基は改良 White 培地 (Table 1) を用いた。培養基は pH 5.6 とし寒天末 (0.5% W/V) を添加したのち加熱溶解し、100 ml 容三角フラスコに 30 ml あて分注した。分注後アルミ箔で覆い120°C、1 kg/cm² で10分間加圧滅菌した。各フラスコには円盤状組織(生

Table 1. Formula of basal nutrient medium

MgSO ₄	360	Inositol	100
Ca(NO ₃) ₂	200	Thiamine HCl	5.0
Na ₂ SO ₄	200	Ca-pantothenate	5.0
KNO ₃	80	Pyridoxine-HCl	2.0
KCl	65	Nicotinic acid	1.0
NaH ₂ PO ₄	16.5	Biotin	0.001 mg/ℓ
MnSO ₄	4.5		
ZnSO ₄	1.5	Casamino acids	2.0 g/ℓ
H ₃ BO ₃	1.5		
KI	0.75	Sucrose	20.0 g/ℓ
Na ₂ MoO ₄	0.025		
CoCl ₂	0.025 mg/ℓ		
Fe-EDTA	5.0 ml/ℓ	Agar	5.0 g/ℓ
		pH . . . 5.6	

Fe-EDTA

FeSO₄·7H₂O (5.57 g) Na₂-EDTA (7.45 g)/ℓ

重 50 mg) を 2 枚 入 入 れ、25°C 暗 処 に て 培 養 し、生 重・乾 重 を 適 時 秤 量 し た。根 の 形 成 は 肉 眼 的 に 確 認 可 能 な 根 の 数 を 調 べ、組 織 あ た り の 平 均 発 根 数 と 全 組 織 に 対 す る 発 根 組 織 数 の 比 の 積 を 発 根 指 数 と し て 表 示 し た。

実 験 結 果

I. callus 形 成 に 及 ぼ す auxin 濃 度 の 影 響

(a) NAA

callus 形 成 に 及 ぼ す NAA 濃 度 の 影 響 に つ い て は 前 報¹²⁾ に 示 し た よ う に、培 地 中 の KIN の 濃 度 に よ り 左 右 さ れ た が、NAA は 単 独 で も callus を 誘 起 し た (Fig. 1)。こ の 際 NAA 濃 度 と し て は 0.3 mg/l が 最 適 濃 度 で あり、本 濃 度 の NAA に 対 し、KIN は 用 い た 全 濃 度 に お い て 強 い 抑 制 作 用 を 示 し た。KIN 無 添 加 の 場 合、高 濃 度 の NAA は callus 形 成 を 強 く 抑 制 し た が、こ の 抑 制 作 用 は KIN 添 加 に よ り 回 復 し、低 濃 度 で 両 者 の 均 衡 が と れ て いる 場 合 よ り も 良 好 な 生 育 が 認 め ら れ た。こ れ は auxin

濃 度 が 高 くな る ほ ど 高 濃 度 の KIN の 添 加 が 必 要 で あり こと を 示 し て いる。こ れ ら の 事 実 は KIN が NAA に 拮 抗 す る と 同 時 に、NAA の 作 用 に と っ て KIN が 相 補 的 (synergistic) に 働 く こと を 示 唆 す る も の で あり。す な わ ち 最 適 生 長 の た め の 両 者 の 濃 度 は 相 互 の 均 衡 に よ っ て 決 め ら れ、相 互 の 相 対 的 高 濃 度 で の 添 加 は 阻 害 作 用 を 示 し た。こ の 点 に 関 し Fox²⁾ は す で に タバ コ の callus を 用 い て 同 様 の 事 実 を 指 摘 し て いる。し た が っ て 本 実 験 に お い て、0.3 mg/l の NAA と 共 存 す る KIN が 全 濃 度 で callus 生 育 に 対 し 抑 制 作 用 を 示 し た こ と は、こ の 濃 度 の NAA に 対 し て は KIN 添 加 が す べ て cytokinin 過 剰 に よ る 阻 害 作 用 を 示 し た も の と 解 さ れ る。こ の NAA 単 独 に よ る callus 誘 起 に つ い て は 岡 沢^{10),11)} に よ り 明 ら か に さ れ た よ う に、体 内 の cytokinin が 本 濃 度 の NAA に 対 し callus 形 成 に 役 立 つ も の と 解 さ れ る。以 上 の 点 よ り、NAA の callus 誘 起 作 用 に 対 す る cytokinin の 存 在 の 必 要 性 が 認 め ら れ た。

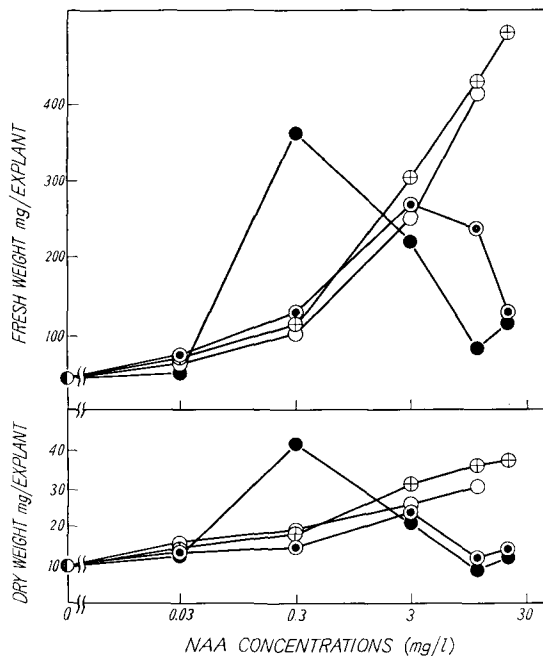


Fig. 1. Effect of various concentrations of α -naphthaleneacetic acid on synergistic promotion of callus growth with kinetin.

Slices were cultured on the medium with various concentrations of NAA and KIN at 0 (●—●), 0.03 (⊙—⊙), 0.3 (⊕—⊕) and 1.0 (⊗—⊗) mg/l. Fresh and dry weights were measured at the end of 8th week.

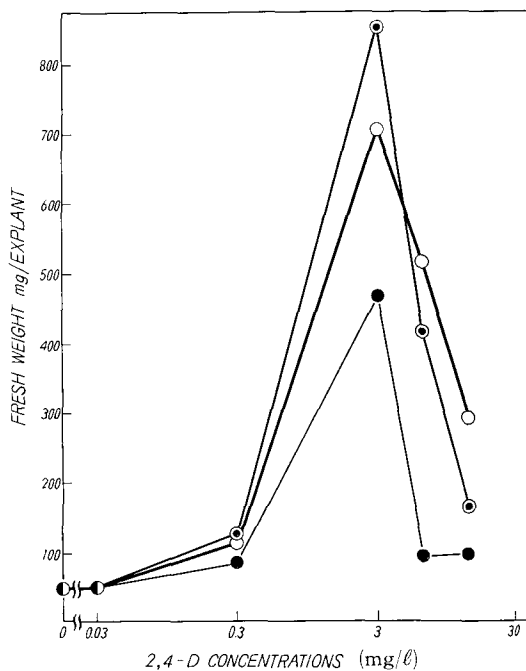


Fig. 2. Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on callus growth.

Slices were cultured on the medium with various concentrations of 2,4-D and kinetin at 0 (●—●), 0.1 (○—○) and 1.0 (⊙—⊙) mg/l. Fresh weight was determined at the end of 8th week.

(b) 2,4-D

callus 形成に及ぼす 2,4-D の作用は NAA の場合とは多くの点で異なっている。Fig. 2 より明らかなように、callus 形成には、NAA に比して高濃度の 2,4-D を必要とした。しかもその際形成された callus の生長は NAA を用いた培養より良好であった。また NAA と同様に KIN 無添加培養でも callus を誘起したが、その場合にも最適濃度範囲の狭いのが特徴であった。この最適濃度は KIN 濃度で変化せず、また高濃度の 2,4-D の阻害作用は KIN では回復しなかった。すなわち 1 mg/l の濃度までは KIN は 2,4-D に拮抗作用を及ぼさないことを示す。さらに最適濃度の 2,4-D に対し KIN が促進的に作用したことは NAA ともっとも異なる点であった。NAA 培養の場合、最適濃度の NAA に対し KIN が拮抗的に作用したことを考慮すると、callus 形成を誘起する auxin としての 2,4-D と NAA は KIN が関与する過程に関して異なった機作をもつことが考えられる。

II. callus の生長と auxin

(a) NAA

LINSMAIER ら⁵⁾ はタバコの培養において、組織の肥大という観点からは auxin のみが限定要因であるが、活発な生長という点からは cytokinin も必要であることを認めた。このため本実験 (Fig. 1 および 2) のように 8 週間という長期間の培養においては cytokinin の影響の方

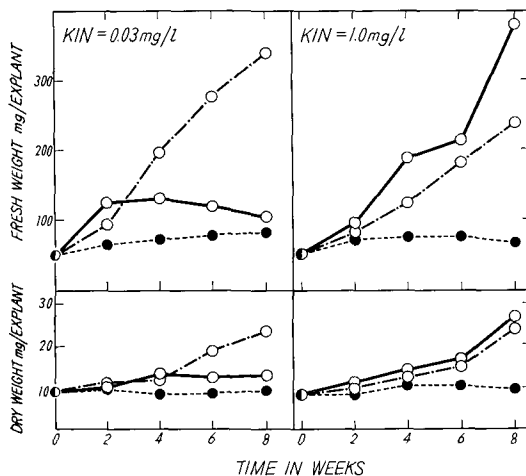


Fig. 3. Time course experiments of callus growth induced by α -naphthaleneacetic acid and kinetin.

Changes in fresh (top) and dry (bottom) weights with time are shown in combination with KIN (1.0 and 0.03 mg/l) and NAA (●—● 0 mg/l, ○—○ 3.0 mg/l, ○—○ 24 mg/l).

が大きいと考えられる。したがって auxin と cytokinin の相互作用を検討するためにはその生長の過程を考慮する必要がある。Fig. 3 は KIN と NAA を種々の濃度で添加した際の callus の生長を示す。KIN が低濃度の際には NAA 3.0 mg/l の濃度の方が良好な生長を示した。その場合、生重・乾重ともに 2 週間日以降目を追って増加した。他方 NAA 濃度が 24 mg/l の際にはきわめて特徴のある生長曲線が得られた。すなわち培養初期には急速な生重増加が認められ、2 週間目には 3.0 mg/l の区より良好な生長を示したが、その後の生重増加は認められず、それはむしろ低下した。

KIN が高濃度の場合には、このような傾向はなく、NAA 3.0 mg/l および 24 mg/l の両区ともに良好な生育を示したが、高濃度 NAA 区の方が良好であったことは Fig. 1 の結果とも一致する。したがって NAA と KIN の相互作用については拮抗作用および相補的 (synergistic) な促進作用が認められた。

ただ低濃度の KIN と共用した高濃度の NAA が誘起した初期の生重増加については別の説明が必要であると考えられる。すなわち、一般に馬鈴薯塊茎の柔組織切片は auxin 処理により吸水生長を示すことが知られている^{4,13)}。栄養培地上での同様の吸水生長の有無については検討の余地があるが、本実験により認められた高濃度の NAA による生重増加が乾重増加を伴っておらず、かつ培養後半になり生重の低下が認められた点などより上記の吸水生長と考えられる。ただ馬鈴薯にはこの吸水生長は、キクイモリなどとは異なり若干の細胞分裂も伴っている⁴⁾。したがって吸水生長と callus 形成を細胞群

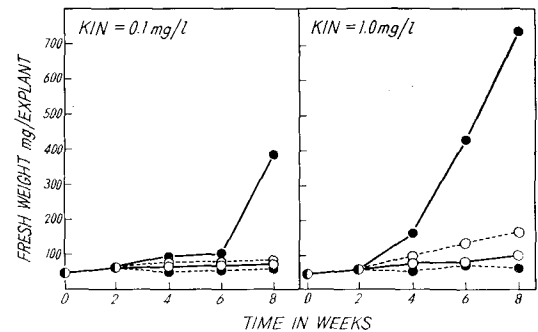


Fig. 4. Time course experiments of callus growth induced by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and kinetin.

Changes in fresh weight with time are shown in combination with KIN (0.1 and 1.0 mg/l) and 2,4-D (●—● 0 mg/l, ○—○ 0.2 mg/l, ●—● 6.6 mg/l, and ○—○ 33 mg/l).

の肥大生長と分裂生長として直接考えることができないが、吸水生長と callus 形成とを区別する必要があると考えられる。

(b) 2,4-D

2,4-D は callus 誘起の過程において NAA とは異なっていた。Fig. 4 より明らかなように、KIN が低濃度の場合、2,4-D 濃度が callus 形成に適当な濃度であれば6週間より急速な callus 形成が始まった。他方 KIN が高濃度の場合には同一濃度の 2,4-D で2週間日以降活発な生長が認められた。したがって 2,4-D は callus 形成までに NAA より長い lag-time をもち、KIN はその短縮化に働いたと考えられる。このことから結果的に 2,4-D 濃度が適当な時、KIN 濃度が高い程8週間目での生長量が多かったと考えられる。また低濃度の KIN 培養において、2,4-D は NAA 培養の際認められた培養初期の急速な生重増加を誘起しなかった。以上の諸点により、2,4-D と NAA の callus 誘起に関する相違性が認められた。

III. 発根に及ぼす NAA と 2,4-D の影響

前報²⁾でも述べたように、NAA と 2,4-D の相違は器官形成についても認められた、すなわち根の形成に際し、NAA は比較的高濃度の KIN とともに根の形成を誘起したが、2,4-D はこの作用を示さなかった。

Fig. 5 は前報²⁾に示したような発根濃度で添加した NAA (0.05 mg/l), または 2,4-D (0.03 mg/l) と種々の濃度の KIN を組合せた場合の組織の発根状況を示した。本図より明らかなように、NAA は 1 mg/l の KIN が存

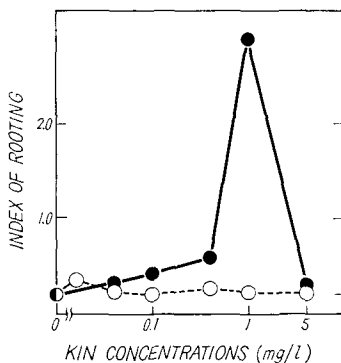


Fig. 5. Effect of kinetin on root formation of cultured tissue slices.

Slices were cultured on the medium in combination with various concentrations of KIN and 0.05 mg/l of NAA (●-●) or 0.03 mg/l of 2,4-D (○-○). The numbers of roots were measured at the end of 6th week.

在すの場合、もっとも多数の発根を誘起した。他方 2,4-D はいかなる濃度の KIN の存在下でもほとんど発根を誘起しなかった。NAA による根の形成には約3週間の期間が必要であった。その際組織の生重および乾重の増加が認められた (Fig. 6) が、これは培地中にと与えた KIN に依拠した (Fig. 1)。このような低濃度の auxin と共存する KIN にもとづく生重・乾重の増加は 2,4-D 培養の際には認められなかった (Fig. 2)。

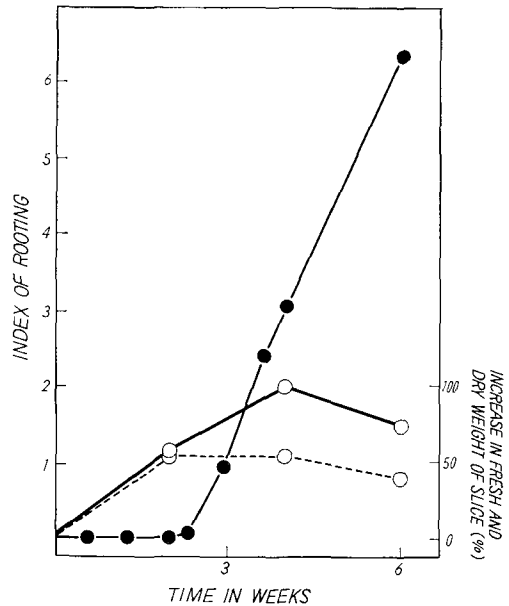


Fig. 6. Time course experiments of growth responses of tissues to NAA and KIN at optimal concentration for root formation.

Slices were cultured on the medium with NAA (0.05 mg/l) and KIN (1.0 mg/l). Then numbers of root (●-●), fresh (○-○) and dry (○-○) weight were measured. Increases in fresh and dry weight are represented by percentage to initial weight.

このように発根誘起に際してみられた 2,4-D と NAA の個々の特性はいずれも cytokinin の関与を通じて示されることから、これらが callus 形成における両者の作用性の相違と何らかの関連をもつと考えられる。

考 察

本実験結果より、馬鈴薯においては callus 形成と発根という二つの分化系において 2,4-D と NAA の作用性の相違点が cytokinin の関与を通じて現われることが

認められた。しかも NAA 培養では吸水生長による初期の生重増加、あるいは発根などのように、一般的な auxin 作用が確認されたが、一方 2,4-D はこれらの作用はなく、顕著な callus 誘起作用のみ認められた。このような組織培養における NAA と 2,4-D の作用の相違、とくに 2,4-D の特異的な callus 形成作用についてはすでに報告されている。たとえばサツマイモにおける 2,4-D と NAA の作用性の差は組織学的相違として認められている⁸⁾。またイネの芽生えについては NAA は正常な生長をおこすが、2,4-D は callus を誘起するといわれている⁶⁾。また 2,4-D のような強い作用力を示す auxin については、高濃度では単独で callus を誘起するが、低濃度では cytokinin と共存する場合に callus を誘起することが認められている¹⁵⁾。この 2,4-D と cytokinin の関連は Fox²⁾ が示した IAA と KIN の相互作用とはまったく異なる。したがってタバコにおいて、2,4-D と IAA は cytokinin との相互関係に関して異なる。この相違について、auxin がこの細胞分裂にとって不可欠な要因として働くが、cytokinin はその作用を強めるという前提にたつて、さらに効力の強い auxin の場合にはそれぞれ自身で callus を誘起しようという考えが提出された¹⁵⁾。しかし大豆の場合、高濃度の 2,4-D による callus 誘起作用は KIN により著しく抑制されることが認められている¹⁵⁾。馬鈴薯においては高濃度 2,4-D に対し KIN の促進作用が認められた。さらに 2,4-D の callus 誘起に際しては、長い lag-time が認められたが、KIN はその短縮化に働くことが明らかにされた。しかも 2,4-D は吸水生長や発根促進など本来の auxin 作用として知られる現象を誘起しない点から、馬鈴薯塊茎の培養についての NAA と 2,4-D の作用を単に auxin として同一視することはできない。したがって少なくとも本実験に関しては、2,4-D は NAA より高濃度において、それ自身 callus 誘起物質としての作用を示すといえる。

ただこの 2,4-D と NAA の相違性は auxin としての作用を通じて一般化することはできず、callus 形成が auxin と cytokinin によりおこる単なる細胞増殖とその肥大によってのみ決められるものではないことを示す。したがって Gautheret³⁾ の主張のように脱分化という観点より今後さらに追求する必要がある。

摘 要

馬鈴薯塊茎の髓部柔組織の組織培養を用いて、2,4-D と NAA の作用について検討を加えた。NAA は KIN と拮抗作用および相補的 (synergistic) な相互作用を示

したが、2,4-D では認められなかった。また NAA は低濃度では KIN と共に発根を誘起したが、2,4-D ではこれが認められなかった。他方 callus 誘起とは別に培養初期の急速な吸水生長が、高濃度の NAA 添加により得られたが、2,4-D では認められなかった。以上の結果より 2,4-D は単独で callus 形成を誘起するが、NAA は cytokinin の共存が必要であることを確認した。NAA と 2,4-D の作用の相違性には cytokinin の関与が推察される。したがって callus 形成に関しては NAA と 2,4-D は単に auxin として同一視することはできない。

参 考 文 献

- 1) ADAMSON, D. (1962): Expansion and division in auxin treated plant cells. *Can. Jour. Bot.*, **40**, 719-744.
- 2) FOX, J. E. (1964): Indoleacetic acid-kinetin antagonism in certain tissue culture systems. *Plant and Cell Physiol.*, **5**, 251-254.
- 3) GAUTHERET, R. J. (1966): Factors affecting differentiation on plant tissues grown *in vitro*. In: *Cell differentiation and morphogenesis*. (ed. by W. Beermann) North-Holland Publ. Comp. Amsterdam, 55-95.
- 4) HACKET, D. P. and K. V. THIMANN (1952): The nature of auxin-induced water uptake by potato tissue. *Amer. Jour. Bot.*, **39**, 553-560.
- 5) LINSMAIER, E. M. and F. SKOOG (1965): Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, **18**, 100-127.
- 6) 前田英三 (1965): イネにおけるカルスの形成および単細胞の分離に関する研究. *日作紀*, **34**, 139-147.
- 7) MILLER, C. O. (1961): Kinetin and related compounds in plant growth. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **12**, 395-408.
- 8) 中島哲夫・山口俊彦 (1968): サツマイモの塊茎組織を起源とするカルスの組織学的観察. *日作紀*, **37**, 619-623.
- 9) NITSCH, J. P. (1963): Naturally-occurring growth substances in relation to plant tissue culture. In: *Plant Tissue and Organ Culture A Symposium*. Catholic Press, Ranchi, India.
- 10) OKAZAWA, Y. (1968): Significance of native cytokinin in callus growth of potato tissue culture. *Proc. Crop. Sci. Soc. Japan*, **37**, 522-527.
- 11) 岡沢養三 (1969): 馬鈴薯塊茎のサイトカイニンについて. *日作紀*, **38**, 25-30.
- 12) OKAZAWA, Y., N. KATSURA and T. TAGAWA (1967): Effect of auxin and kinetin on develop-

ment and differentiation of potato tissue cultured *in vitro*. *Physiol. Plant.*, **20**, 862-869.

- 13) SKOOG, F. and C. O. MILLER (1957): Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured *in vitro*. *Symp. Soc. Exp. Biol.*, **11**, 118-131.
- 14) OVERBEEK, J. van, (1944): Auxin, water uptake, and osmotic pressure in potato tissue. *Amer. Jour. Bot.*, **31**, 265-269.
- 15) WITHAM, F. H. (1968): Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on the cytokinin requirement of soybean cotyledon and tobacco stem pith callus tissues. *Plant Physiol.*, **43**, 1445-1457.

Summary

The present investigation was performed in order to obtain a clear concept of the qualitative difference in characteristic behaviours between NAA and 2,4-D, by means of pith tissue culture of potato tubers (*Solanum tuberosum* L. cv. Irish Cobbler). The cultures were run at 25°C in darkness. The experimental results were summarized as follows:

Figures 1 and 3 revealed that KIN reversed, to certain extent, the inhibitory effect of high levels of NAA on the growth of the cultured tissue, and *vice versa*, indicating that an increase in NAA level in the medium required necessarily to increase KIN level for their optimal growth. Therefore, antago-

nism or synergism exists between NAA and KIN, as an inhibitory levels of one on the callus growth can be overcome by providing more of the other in the medium. By contrast, there was no similar evidence on 2,4-D in place of NAA.

When NAA (0.05 mg/l) and KIN (1.0 mg/l) were applied to the medium concurrently, many adventitious roots were formed on the cultured tissues. Unlike NAA, 2,4-D failed to produce roots even in any combination with various concentrations of KIN.

Somewhat different pattern of an increase in fresh weight of explants as compared with that of normal callus growth was observed during the early stage of culture by the application of relatively high concentration of NAA to the medium. Such type of growth seems to closely resemble to that of a simple cell expansion caused by auxin.

The callus growth induced by NAA, unlike 2,4-D, is supposed to be concerned with differences in activity of endogenous or exogenous cytokinin. While the callus growth induced by 2,4-D may be regarded as due to the effect of 2,4-D itself independent of the cooperation of cytokinin.

Taking evidences stated above into consideration, it seems very likely that mechanism of action of NAA and 2,4-D is quite different in spite of the two have something in common as auxin.