

トウガラシの不定芽形成に及ぼす子葉外植体及び培養条件の影響

林 喜三郎・楊 志慶・加藤 鎌司

(農学部作物・育種学研究室)

The Effects of Cotyledon Explant and Culture Condition on *in vitro* Formation of Adventitious Buds in Red Pepper (*Capsicum annuum* L.)

Kisaburo HAYASHI · Zhiqing YANG · Kenji KATO

Laboratory of Crop Science and Plant Breeding, Faculty of Agriculture

Abstract : Since Gunay and Rao¹⁾ first achieved *in vitro* plant-formation from cotyledon in red pepper, several researchers²⁻⁵⁾ have reported the formation by using different media or tissues. Several experiments were conducted to know the most suitable method or explant for *in vitro* adventitious bud formation.

Adventitious bud-forming capacity of leaf piece trimmed from cotyledon decreased with the age of seedling, that is, the days after germination of seed. This decrease was lightened when the seedlings were grown for six days under low temperature condition at 8 °C (Table 1). And the bud-forming capacity also showed decreasing tendency from the proximal to the distal end of cotyledon and depended significantly on the size of leaf piece trimmed from cotyledon (Table 2). From the results described above, it was concluded that the most suitable explant for adventitious bud-formation was the proximal 1/4 part of cotyledon trimmed from young seedling just after cotyledon-unfolding. Nagao's medium, MS inorganic salts supplemented with 5 mg/l of zeatin, was superior in the bud-formation to any other media which had already proposed by several researchers (Table 3 & 4). *In vitro* formation of adventitious buds was also influenced considerably by light intensity during the culture and the highest number of the buds was observed when the culture was conducted under 3,800 lux (Fig. 1).

結 言

トウガラシの組織培養については、Gunay & Rao¹⁾が1978年に初めて子葉からの植物体の分化に成功して以来、Phillips & Hubstenberger²⁾、長尾³⁾、葛ら⁴⁾、Sripichitt *et al.*⁵⁾らが、子葉からの植物体の分化に成功している。さらに長尾³⁾は子葉培養による増殖体系を提案している。しかしながら、以上の報告では最適とする培地組成、外植体に用いる器官や苗令あるいは供試品種が異なっているのみならず、不定芽や植物体の形成頻度についても具体的な数値が示されていない場合もあって、どの培養方法が最適かを決定するための培養効率や増殖効率の相互比較は困難である。

このような現状に基づき、増殖効率をより高める方法を開発する基礎資料とするために、外植体としての子葉や、培養条件を検討するとともに、従来最適とされている培地の相互比較を行った。以下はそれらの検討結果の概要である。

材料及び方法

1. 供試品種及び種子の殺菌

日本在来トウガラシの品種“ダルマ”を用いた。この品種は“鷹の爪”群に属する小型、多数の果実をつける品種である。京大附属亜熱帯植物実験所の藤本光宏博士より分譲されたものである。記してお礼申し上げる。

種子は70%アルコールで10秒、3%次亜塩素酸ナトリウムで20分浸漬して表面殺菌し、滅菌水で3回洗浄した後、0.8%寒天のみの培地に置床し、25℃、900ルクス、16時間照明のもとで発芽させた。

2. 培養方法及び調査方法

培養効率に影響すると思われる各種条件については、その都度記載するように種々に変えたが、特記しない限り以下の条件によって培養した。

外植体の採取：発芽後4日、子葉展開直後に、子葉の葉身部のみを切り離し、その基部から全長の1/4を外植体として供試した。

培地及び培養方法：長尾³⁾が最適とする Murashige & Skoog の無機塩に5 mg/1 のゼアチン、30 g/1 のショ糖、10 g/1 の寒天を添加した培地をプラスチック製の培養箱(5×5×10cm)に入れて用いた。1箱には12切片、1処理区には2箱を供試した。これらの培養箱は25±2℃、2,500～3,500ルクス、16時間照明の恒温器内に置いた。

調査方法：培養開始後21日に、それぞれ置床切片数(EO)、不定芽が形成された切片数(EF)及び形成された全不定芽数(NAB)を数え、

不定芽形成外植体率： $PE = EF/EO \times 100$ (%)

外植体当り形成不定芽数： $AE = NAB/EF$

置床100外植体当り不定芽数： $A100 = PE \times AE$

等を算出した。但し、以下本文中ではPE、AE及びA100をそれぞれ形成率、不定芽数及び形成効率と略称する。

実験結果及び考察

1. 外植体としての子葉の条件

1) 苗令：発芽後4、10、16、22、28及び60日目の苗から採取した子葉を用いて培養した結果はTable 1上段のとおりである。

発芽後4日の子葉を用いた場合には、ほぼ全ての外植体に平均10の不定芽が形成されるが、苗令が進むとともに形成率、不定芽数ともに減少する。なかでも、当初の4～10日の減少程度は著しく、この間に形成効率はほぼ半減している。

以上の事実は、発芽日数の経過と共に子葉の不定芽形成能が次第に失われることを物語るものであり、これは子葉の養分が喪失してゆくためと考えられ、特に本実験のように種子の発芽培地に無機塩をなんら加えない場合に、その影響が著しいものと考えられる。

2) 実生の低温処理：前項の実験で発芽10～28日後に採取した子葉の場合、採取前の6日間8℃の低温に置いた区を設けた結果は、Table 1下段のとおりである。

同表からも明らかなように、苗令が進むとともに不定芽形成能が低下することは、前項と同じであるが、その減少傾向は極めて緩やかとなっている。従って、苗令が同じ場合には、低温処理区が優り、低温によって不定芽形成能の低下が軽減されたと考えられる。そこで、低温処理開始前の採

Table 1. Effect of seedling age on adventitious bud formation from cotyledon explant¹⁾

Items ²⁾	Number of days after germination					
	4	10	16	22	28	60
Non-treatment						
EF	23	21	20	20	15	6
PE	(95.8)	(87.5)	(83.3)	(83.3)	(62.5)	(25.0)
NAB	222	114	97	93	65	12
AE	9.7	5.4	4.9	4.7	4.3	2.0
Low temperature treatment						
EF	—	23	23	21	20	—
PE	—	(95.8)	(95.8)	(87.5)	(83.3)	—
NAB	—	155	151	109	101	—
AE	—	6.7	6.6	5.2	5.1	—

1) Medium: MS medium supplemented with 5 mg/1 of zeatin

Explant: The proximal 1/4 part of cotyledon

2) EO: Number of explants observed (24 in this case)

EF: Number of explants which formed adventitious bud

PE: Percentage of "EF" to "EO"

NAB: Number of adventitious buds formed in each plot

AE: Average number of adventitious buds formed from one explant

取日と比較したところ、例えば、不定芽数でみると、処理10日の6.7は無処理4日の9.7より低いが、処理16、22及び28日の6.6、5.2及び5.1は無処理10、16及び22日の5.4、4.9及び4.7よりそれぞれ優れている。従って、低温は単に形成能の低下を防ぐのみでなく、むしろ微弱ながら形成能を増加させる効果があると考えることが出来る。

3) 外植体の採取部位及び大きさ: 発芽後4日の幼苗を用い、その子葉をそのままあるいは2-16等分に切断して(以下1/1-1/16と表示)、部位別に培養した結果はTable 2のとおりである。なお、どの切断回数の場合にも、子葉基部の切片を第1切片、以下子葉の先端に向かって、第2、第3切片……と呼んだ。

同表によれば、どの子葉切断の場合にも、基部から先端に向かうにつれて形成率及び不定芽数ともに低下する。たとえば、1/8切片では、最基部の第1切片は91.7%、6.8であるが、先端に行くほど次第に低下し最先端部の第8切片では29.2%、3.0となり、基部に比べると1/3-1/2ほどに低下してしまう。この傾向は1/2及び1/4切片の場合にも窺える。

一方、同じ子葉部位では切片を細切するほど、不定芽形成能が低くなる。例えば1/4の第1切片の形成率と不定芽数は95.8%、9.7と高いが、同じ部位を更に2分した1/8の第1及び第2切片は91.7%、6.8及び69.6%、5.8、あるいは、それらの平均値80.9%、6.4など、何れの数値も、先述の1/4の第1切片の値より低い。同様の傾向は切片のどの大きさ及び部位の場合にも認められる。

さらに形成能の高い第1切片のみを比較すると、1/4が最も高く、これより切断回数が増えても減っても形成能が低下して行く。

以上を総合すると、1/4の第1切片が他の場合に比し、形成率、不定芽数ともに高く、各種培養実験の検討には好適と思われる。一方、一枚の子葉から出来るだけ多数の不定芽を形成させて、多くの植物体を得ようとする場合には、個々の外植体の不定芽形成能は多少落ちるが、一枚の子葉から得られる切片数が増える1/8切片が最適と考えられる (Table 2)。

2. 培養条件

1) 培養時の照度: 0 (暗黒) - 16,000ルクスの間, 種々に照度を変えた計7区について, 9日間培養した結果は Fig. 1 のとおりである。

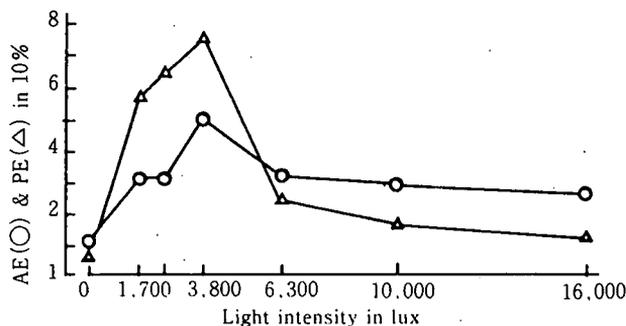


Fig. 1. Effect of light intensity on adventitious bud formation from cotyledon explant. AE : Average number of adventitious buds formed from one explant, PE : Percentage of explants which formed adventitious buds.

暗黒状態では不定芽は殆ど形成しないが, 照度の増加に伴い形成率, 不定芽数はともに増加し, 3,800ルクスで最高に達するが, その後は照度の増加とともに逆に低下して行く。即ち, 3,800ルクスを最適とするが, それ以上の照度では不定芽形成に有害なことを物語っている。

なお, Fig. 1の結果を得た後, 全材料を最適の3,800ルクスに移すと, その後に生じる不定芽数は区間に大きな差異がなかったので, 上記の照度の過不足による不定芽形成数の減少は, あくまで培養条件の不適當による一時的な障害と考えられる。

2) 従来報告で用いられた培地の比較: 従来報告において, 子葉培養によって植物体形成に成功している培地は Table 3 に示した4つである。これらの培地を用いて培養したところ, 次のような差異が認められた。

Table 3. Media used in the present experiment¹⁾

Media	IAA	NAA	BA	Z	CH	Researchers
A	—	—	—	5	—	NAGAO, 1985
B	1	—	2	—	—	GUNAY & RAO, 1978
C	0.05	0.1	6.6	—	600	GE <i>et al.</i> , 1986
D	—	—	3	—	—	SRIPICHITT <i>et al.</i> , 1987

1) Basal medium : MS inorganic salts + 30 g / 1 of sucrose + 10 g / 1 of agar, pH 5.8

2) IAA : Indoleacetic acid, NAA : Naphthaleneacetic acid, BA : Benzyladenine, Z : Zeatin, CH : Casein hydrolysate. Figures are shown in mg / l.

どの培地でも外植体が置床されて5, 6日よりカルスが生じ始め, 8, 9日頃には不定芽が観察されるようになり, 以後日数の経過と共にその数を増してゆく。但し, B培地ではカルスの生長が著しいために, 20日頃から不定芽を覆うようになって不定芽数は逆に減少してくる。また, この培地では不定芽以外に発根もしばしば認められるのに対し, B培地以外の培地での発根は極めて稀である。

また、AとD培地では各切片の切口のうち、子葉の基部側方向のみに不定芽が形成され、先端側切口には殆ど形成されない。これに対し、B、C培地では先端側切口にも多数の不定芽を形成し、培地による形成状況に著しい差異が認められた。このような関係をより詳細に検討するために、培養21日後の不定芽形成数を示すとTable 4のとおりである。

Table 4. Effect of growth regulating substances in media on adventitious bud formation¹⁾

Media ²⁾	Side ³⁾	EF	PE	NAB	AE	A 100
A	1	31	86.1	159	5.1	442
	2	2	5.6	6	3.0	17
	Sum	31	86.1	165	5.3	458
B	1	14	38.9	44	3.1	122
	2	8	22.2	15	1.9	42
	Sum	16	44.4	59	3.7	164
C	1	26	72.2	90	3.5	250
	2	19	52.8	48	2.5	133
	Sum	29	80.6	138	4.8	383
D	1	21	58.3	91	4.3	253
	2	0	0	0	0	0
	Sum	21	58.3	91	4.3	253

1) 36 explants, the proximal 1/4 part of cotyledon, were used in each plot.

2) The abbreviation of media is shown in Table 3.

3) Side : Cut sides of leaf blade trimmed from cotyledon, "1" and "2" meaning proximal and distal side, respectively.

3) EF, PE, NAB, AE & A 100 : See the notes in Table 1.

同表によれば、上記の関係は数的にも明かであるが、不定芽形成総数からみれば、A培地が最も多く、次いでC、D、B培地の順に少なくなってゆく。

以上よりA培地が不定芽数で優り、生長も良いことから、他の培地より優っていると言える。但し、A培地では発根が認めがたいので、不定芽がある程度大きくなった培養約1か月後にはB培地に移し、発根を促すのが適当と考えられる。

結論および要約

1. 外植体：以上の実験の結果よりトウガラシの子葉を外植体とする培養においては、子葉は発芽直後の出来るだけ若い苗から採取するのがよいことが確認された。このことは従来多くの研究者が採用しているところとも一致し、妥当と思われる。同時に、①子葉先端部より基部に向かって不定芽形成能が優ること、及び ②低温処理によって苗の老化による不定芽形成能低下の防止効果あるいは向上効果を認めたことは、不定芽形成能が細胞分裂能の大小と関係することを窺わせるものである。

何れにしても不定芽の形成効率を高めるためには、発芽直後の出来るだけ若い苗の子葉の基部を用いるのが最適である。しかし一方増殖効率の点から言えば、1枚の子葉から採取できる外植体数も関係するので、子葉を8分割した切片を外植体とするのが最も良さそうである。このことは長尾³⁾が1～2mm幅に切断した切片を最適として提案しているところとも一致する。

2. 培養方法：既報の4培地を検討した結果、長尾³⁾のMS + Zeatin 5 mg/1培地が最高の不定芽

形成数を示した。今後はこの培地を中心に形成効率の向上あるいは形成された不定芽からの成苗獲得数を増加させる方法について検討の必要があろうかと考えられる。

なお、照度が不定芽形成に大きな影響を与え、3,800ルクスを最適とする本実験結果は培養条件を検討する場合、注意すべき点であろう。

文 献

- 1) GUNAY, A. L. and RAO, P. S. : In vitro plant regeneration from hypocotyl and cotyledon explants of red pepper (*Capsicum*) *Plant Sci. Lett.* 11, 365-372 (1978).
- 2) PHILIPS, G. C. and HUBSTENBERGER, J. F. : Organogenesis in pepper tissue cultures. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 4, 261-269 (1985).
- 3) 長尾照義：組織培養の雄性不稔系統増殖への利用。昭和59年度技術情報調査報告書，日本種苗協会編，48-58 (1985)。
- 4) 葛 扣麟・笹隈哲夫・田中正武：トウガラシ属の組織培養の研究。I. 育種36別冊(1), 16-17(1986)。
- 5) SRIPICHITT P., NAWATA, E. and SHIGENAGA, S. : In vitro shoot-forming capacity of cotyledon explants in red pepper (*Capsicum annuum* L. cv. Yatsufusa). *Japan. J. Breed.* 37, 133-142 (1987).

(昭和63年9月29日受理)

(昭和63年12月27日発行)

