

# カボチャにおけるオーキシンの誘導される発根とカルス化に及ぼす亜鉛の影響

横山 明 敏\*)

宮崎県総合農業試験場

佐伯 雄一・小口 慶子・長友 由隆・赤尾 勝一郎

宮崎大学農学部

高木 浩

宮崎大学農学部名誉教授

要 旨 : イネでは、オーキシン (2,4-D) による発根作用が亜鉛の添加によりさらに促進されるが、この作用が双子葉植物 (カボチャ) でも認められるか否かを検討した。カボチャでは、根をカルス化させるオーキシン濃度はイネよりも低く  $0.025\text{mgL}^{-1}$  であった。オーキシンとともに亜鉛を添加すると根のカルス化は抑制された。また、オーキシンのみで根重の増加とカルス化が同時に進行し、亜鉛の添加によりカルス化を抑制しても根重が増えることはなかった。以上のように、オーキシン誘導のカルス化を抑制する亜鉛の作用はカボチャにも認められた。しかし、オーキシン誘導の発根をさらに増加させるというイネで認められた亜鉛の作用は、カボチャでは認められなかった。

キーワード: 亜鉛, オーキシン, 発根, カルス化, カボチャ

Effect of Zinc on Rooting and Callus Induced by Auxin in Pumpkin : Akitoshi YOKOYAMA, Yuichi SAEKI, Keiko OGUCHI, Yoshitaka NAGATOMO, Hiroshi TAKAKI and Shoichiro AKAO (*Miyazaki Pref. Agric. Exp., Fac. Agric., Miyazaki Unive.*)

Abstract: We have found that auxin (2,4-D)-induced roots were further promoted by the addition of zinc in rice which is monocotyledonous plant. Therefore, we examined whether a similar phenomenon would occur in dicotyledonous plant such as pumpkin. Similarly, a change from root formation to callus induction was observed in pumpkin plant. However, the change to callus in pumpkin plant was induced at lower auxin concentration than that of the rice plant. The callus formation was also suppressed as that of rice plant with the addition of zinc. In rice, new roots were formed when callus formation was suppressed with zinc, but there was no new root formation in the pumpkin plant.

Keywords: auxin, callus, pumpkin, rooting, zinc

## 1. 結 言

植物におけるオーキシンの作用は地上部と地下部で異なり、茎の伸長には促進作用を示すオーキシンも、根では伸長を抑制することで知られている。それは、根の伸長を促すオーキシンの最適濃度が、茎の場合に比べて低く、通常の根ではオーキシンの最適濃度を若干上回るレベルのオーキシンが既に存在するためと考えられている (高橋・増田, 1994)。根の伸長に対しては抑制的に作用するオーキシンであるが、不定根の誘導には促進作用が認められ、挿し木の発根促進剤として、すでに実用化されている

(河合, 1999; 増田・神坂, 1972)。オーキシンと亜鉛との関係についてイネを供して調査した前報 (横山ら, 2004) では、オーキシンを添加しないで内生オーキシンレベルを維持した標準添加区では亜鉛を添加しても不定根量は増加しないが、オーキシンと一緒に亜鉛を添加すると、オーキシン単独よりも顕著に根量の増加することが確認された。さらに、オーキシン存在下における亜鉛による根量増加は、銀やコバルトのようなエチレン生成やその活性の阻害に基づく発根促進 (Pereira-Netto, 2001; Zobayed, S.M.A. et al., 1999) ではなく、オーキシン存

2004年5月27日受付 2004年10月19日受理  
\*連絡先 〒880-0212 宮崎県宮崎郡佐土原町大字下郡珂字家前 5851  
Fax: 0985-73-2127 E-mail: aki-yoko@pref.miyazaki

在下に誘導される亜鉛特有の、これまでには知られていない生理作用によるものと推定された。

オーキシシン存在下における亜鉛の添加が根量を増大させる現象はイネ(横山ら, 2004)の他にもマメ科の西洋ミヤコグサ「スーパールート」(小口ら, 2004)においても観察されている。そこで、ウリ科のカボチャについてこの現象が認められるのか検討したところ、イネ科やマメ科に比べオーキシシン(2,4-D)に対する感受性が高く低濃度のオーキシシンでもカルス化を誘導するものの、亜鉛の添加がカルス化を抑制する現象はいずれにも共通であることが認められた。しかし、イネ科やマメ科のようにオーキシシン誘導根をさらに増加させる作用は認められないなど、イネ科やマメ科とは異なる反応が見出されたので、その概要について報告する。

## 2. 材料と方法

### 1) 供試材料

材料にはブルームレス台木用カボチャ‘ストロングー輝’(埼玉原種育成会)の種子を用いた。種子の殻を取除いた後、70%エタノールに2分間、次いで5%次亜塩素酸ナトリウム溶液に10分間浸漬した後、滅菌水で3回洗浄することにより表面殺菌したものを供試した。これらの種子を、pH5.7に調整したMS寒天培地(Murashige, 1962)に無菌的に置床し、植物培養インキュベーターに移して自然光下、26~30℃で20~35日間培養した。

### 2) オーキシシン及び亜鉛の添加処理

オーキシシン作用を示す化合物としては2,4-D、亜鉛としては硫酸亜鉛を用いた。なお、2,4-D、亜鉛の処理濃度は、それぞれ2,4-D: 0, 0.01,

0.025, 0.05, 0.1, 0.2mgL<sup>-1</sup>, 亜鉛: 0.36, 2.0, 10, 36, 48, 56mgL<sup>-1</sup>とした。なお、培地中の亜鉛濃度2mgL<sup>-1</sup>はMS培地の標準組成濃度である。

### 3) 生育調査及び亜鉛含量の定量

培養後の試料は、根に付着した寒天を水中で除き、ろ紙上で水滴を取り除いた後に、草丈、根長を測定後、茎葉、根、カルスの別に区分してそれぞれの新鮮重を測定した。葉、根については、熱風乾燥機に移し110℃で一夜乾燥させた後に乾物重を測定した。次に、乾燥試料をマッフル炉に移し、550℃で4時間灰化した。亜鉛の測定には灰化物を10ないし20mlの1MHClで抽出し、そのろ液を100mlに定容し、原子吸光度計(島津, AA-646)により測定した。

## 3. 結果

第1図と第2図には、調査時点における各処理区の平均的な個体の生育状況を示した。第1表には、MS培地のオーキシシンと亜鉛の濃度を変えた場合におけるカボチャの生育調査の結果を示した。

草丈は低濃度のオーキシシン(0.01mgL<sup>-1</sup>)添加では増加したものの、これより高い濃度(0.025, 0.05mgL<sup>-1</sup>)では抑制された(第1表)。一方、根長は、濃度の如何に関わらずオーキシシン添加により確実に低下した。また、茎葉重はオーキシシン添加濃度が0.025mgL<sup>-1</sup>でピークを迎え、その後は低下に転じた。オーキシシンの添加濃度が低いレベルでは茎葉重は増加したのに対し、根重はオーキシシン濃度の増加に比例して増大した。このように茎葉重と根重は、培地中のオーキシシン濃度が0.025mgL<sup>-1</sup>までは共に増加する(第1

第1表 オーキシシン(2,4-D) 0, 0.01, 0.025, 0.05, 0.1mgL<sup>-1</sup>レベルで培養したカボチャの生育及び亜鉛含量に及ぼす培地中の亜鉛濃度の影響

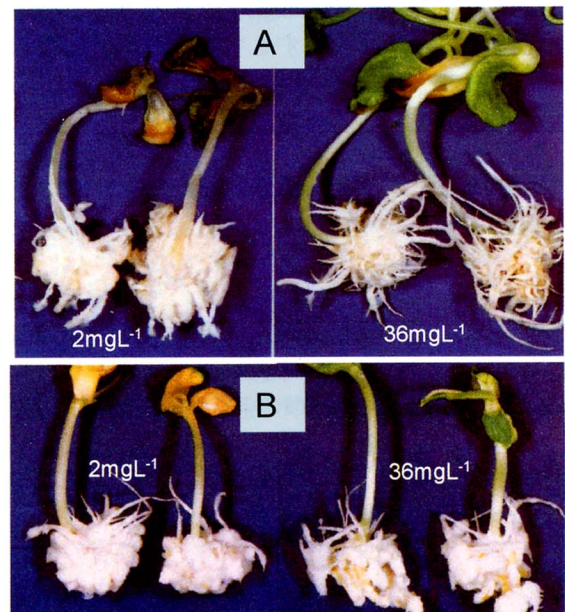
2, 4-D 濃度 (mgL <sup>-1</sup> )	培地中のZn 濃度 (mg L <sup>-1</sup> )	草丈 (cm)	根長 (cm)	新鮮重 (g plant <sup>-1</sup> )		Zn含量 (mg kg <sup>-1</sup> DW)	
				茎葉重	根重	茎葉	根
0.00	2.0	13.5	15.4	1.78±0.30	0.38±0.06	351	162
	36.0	13.7	14.8	1.96±0.34	0.41±0.16	2,090	3,850
0.01	2.0	16.4	8.79	2.07±0.12	0.76±0.11	65.1	150
	36.0	14.0	7.54	1.83±0.32	0.59±0.09	837	2,071
0.025	2.0	11.7	4.61	2.23±0.17	1.90±0.30	157	199
	36.0	8.4	6.12	1.76±0.41	1.28±0.32	2,498	2,330
0.05	2.0	11.4	3.44	1.64±0.26	1.88±0.27	112	90.8
	36.0	11.0	4.89	2.01±0.39	1.52±0.29	1,557	1,942
0.10	2.0	—	—	0.76	3.75	106	62.3
	36.0	—	—	1.67	2.41	917	1,221

標準誤差 (n=10)

図) が、培地へのオーキシシン添加濃度が  $0.05\text{mgL}^{-1}$  では、茎葉の生育が明らかに抑制されている。オーキシシン濃度をさらに高めると、茎葉の成長は子葉の展開までで停止し黄化した (第2図)。すなわち、オーキシシン濃度  $0.025\text{mgL}^{-1}$  までは、植物全体の生育量が増加するものの、この濃度を境に茎葉と根でオーキシシンに対する反応が異なることを示している。

このように、培地へのオーキシシンの添加はカボチャ根にカルス化を誘導し地上部の生育をも抑制した。しかし、オーキシシンとともに高濃度の亜鉛を添加すると、オーキシシンにより引き起こされたカルス化が軽減された。オーキシシンを添加していない  $0\text{mgL}^{-1}$  区では、亜鉛を高濃度 ( $36\text{mgL}^{-1}$ ) に添加しても根重に何らの影響も認められなかったが、オーキシシンを  $0.01\text{mgL}^{-1}$  添加した区では亜鉛の高濃度添加により明らかに根重が低下した。  $0.01\text{mgL}^{-1}$  のオーキシシン添加でも根の伸長は顕著に抑制されたがカルス化は認められず、亜鉛の添加による根量の増加も認められなかった (第1図A, B)。しかし、オーキシシンの添加濃度を  $0.025\text{mgL}^{-1}$  にまで高めると、根量の急増とともにカルス化を生じたが、高濃度の亜鉛添加によりカルス化が認められなくなった (第1図C)。オーキシシンを  $0.05\text{mgL}^{-1}$  添加すると、根のカルス化とともに茎葉の伸長も抑制されたが、亜鉛の高濃度添加によりカルス

化が認められなくなり茎葉の伸長も促進された (第1図D)。カルス化の軽減と茎葉の伸長促進



第2図 オーキシシン (2,4-D)  $0.1, 0.2\text{mgL}^{-1}$  レベルで培養したカボチャに及ぼす培地の亜鉛濃度の影響

オーキシシン (2,4-D) と亜鉛は播種時に添加、播種4週間後の調査。A, Bへの2,4-D添加濃度は、A  $0.1\text{mgL}^{-1}$  B,  $0.2\text{mgL}^{-1}$ 、であり、A, Bの左側には亜鉛  $2\text{mgL}^{-1}$  添加、右側には亜鉛  $36\text{mgL}^{-1}$  添加



第1図 オーキシシン (2,4-D) と亜鉛がカボチャの根の生育に及ぼす影響

オーキシシン (2,4-D) と亜鉛は播種時に添加、播種4週間後の調査。A, B, C, Dへの2,4-D添加濃度は、A:  $0\text{mgL}^{-1}$ 、B:  $0.01\text{mgL}^{-1}$ 、C:  $0.025\text{mgL}^{-1}$ 、D:  $0.05\text{mgL}^{-1}$  であり、A, B, C, Dの左側には亜鉛  $2\text{mgL}^{-1}$  添加、右側には亜鉛  $36\text{mgL}^{-1}$  添加



効果は、カルス化が激しく葉も黄化するに至る  $0.1\text{mgL}^{-1}$  のオーキシシン濃度においても認められた(第2図A)が、 $0.2\text{mgL}^{-1}$  では高濃度の亜鉛を添加しても葉は緑化するもののカルス化状態は改善されず茎葉も抑制されたままであった(第2図B)。

根の伸長やカルス化あるいは茎葉の発育と、根や茎葉の亜鉛含量との間には次のような関係が認められた。茎葉の亜鉛含量はオーキシシン無添加(内生オーキシシンレベル)の場合には、根のそれよりも高く、およそ2倍の  $351\text{mg kg}^{-1}$  を示したが、オーキシシン添加により茎葉の亜鉛含量及び茎葉-Zn/根-Zn比がいずれも低下した(第1表)。MS培地標準の亜鉛  $2\text{mgL}^{-1}$  区において、根の亜鉛含量が急激に低下したオーキシシン添加濃度は  $0.05\text{mgL}^{-1}$  であった。また、培地中のオーキシシン濃度  $0.05\text{mgL}^{-1}$  を越えると根のカルス化はさらに増大した。一方、高濃度の亜鉛添加は茎葉や根の亜鉛含量を著しく増大させ、茎葉では  $2\text{mgL}^{-1}$  添加区の2.4~7.1倍、根では7.5~23.8倍にまで増加させた。そして、亜鉛含量の著しく増大した区ではカルス化が緩和されたことは上述したとおりであり、その時の亜鉛含量は  $1,000\sim 2,000\text{mgL}^{-1}$  であった。

オーキシシン ( $2,4\text{-D } 0.1\text{mgL}^{-1}$ ) 作用により、カルス化した根の形状と著しく生育が阻害されて



第3図 オーキシシン ( $2,4\text{-D } 0.1\text{mgL}^{-1}$ ) 培地に添加した亜鉛がカボチャの根の生育に及ぼす影響(左から Zn  $2.0, 10.0, 36, 48, 72\text{mgL}^{-1}$ )

黄化した葉が、亜鉛添加 ( $2.0, 10, 36, 48, 72\text{mgL}^{-1}$ ) により変化する様子を示した(第3図)。MS培地標準の亜鉛濃度  $2.0\text{mgL}^{-1}$  では、第2図と同様に根部はカルス化し茎葉は黄化した。亜鉛添加濃度を高めることで、根としての形状が明瞭となり、地上部も旺盛な生育を示した。この時の草丈、茎葉重、根重および亜鉛含量を第2表に示した。草丈は、亜鉛添加濃度を高めることで高まり  $36\text{mgL}^{-1}$  レベルの  $12.00\pm 3.06$  をピークにその後はやや減少に転じた。茎葉重は、亜鉛添加濃度  $36\text{mgL}^{-1}$  以上ではほぼ頭打ちとなった。根重は亜鉛添加濃度を高めることで減少するが、亜鉛添加濃度  $36\sim 48\text{mgL}^{-1}$  までは根がカルス化から根としての形状を保った結果であると考えられる。しかし、これを超える培地中の亜鉛濃度は根や茎葉の生育に抑制的に作用したためと考えられる。これらの状況における根及び茎葉中の亜鉛含量から、亜鉛過剰障害を避けてオーキシシンの発根作用を機能させる濃度範囲は、根で  $1,500\sim 2,700$ 、茎葉で  $1,100\sim 2,600\text{mgkg}^{-1}$  であると考えられる。

#### 4. 考察

オーキシシンに対する感受性は、茎、芽、根などの器官により異なり、根ではピコモルオーダー、茎ではナノモルオーダー、芽ではその中間に位置しておりオーキシシンが過剰に存在するとそれらの生長が阻害される。特に、根においては、感受性が高く  $10^{-8}$  モルで阻害されるとされている(高橋・増田, 1994; 田村, 1977; 増田・神坂, 1972)。通常、根には十分な量のオーキシシンが存在するため、外部から与えるオーキシシン濃度が低濃度であっても根の伸長阻害が引き起こされる(高橋・増田, 1994)。

著者らが行ったイネの場合でも、根の伸長は僅か  $0.025\text{mgL}^{-1}$  のオーキシシン ( $2,4\text{-D}$ ) 添加で、オーキシシンを添加しなかった対照区に比べ、半分の長さまで抑制された(未発表)。本試験に用いたカボチャにおいても、低濃度のオーキシ

第2表 オーキシシン ( $2,4\text{-D } 0.1\text{mgL}^{-1}$ ) レベルで培養したカボチャの生育及び亜鉛含量に及ぼす培地の亜鉛濃度の影響

培地中の Zn濃度 ( $\text{mg L}^{-1}$ )	草丈 (cm)	乾燥重 ( $\text{g plant}^{-1}$ )		Zn含量 ( $\text{mg kg}^{-1}\text{DW}$ )	
		茎葉重	根重	茎葉	根
2.0	$6.83\pm 1.17$	0.12	0.65	82.6	63.1
10.0	$8.83\pm 1.20$	0.20	0.69	338	400
36.0	$12.00\pm 3.06$	0.25	0.51	1,106	1,504
48.0	$11.67\pm 1.20$	0.26	0.47	2,563	2,657
72.0	$9.57\pm 1.07$	0.24	0.32	2,906	3,041

標準誤差 (n=10)

ン(2,4-D)添加により根長は抑制され、 $0.01\text{mgL}^{-1}$ の添加で対照区の43%、 $0.025\text{mgL}^{-1}$ の添加では対照区の70%にまで抑制された(第1表)。このように、根の伸長抑制はイネとカボチャに共通したオーキシシン作用であったが、その程度には違いが認められ、イネよりもカボチャにおいて感受性の強いことが明らかとなった。根に与えるオーキシシン作用としてカルス化が知られている。イネのカルス化は培地中のオーキシシン(2,4-D)が $0.3\text{mgL}^{-1}$ になると現れるが、 $0.1\text{mgL}^{-1}$ では生じない(横山ら, 2004)。しかし、カボチャでは僅か $0.025\text{mgL}^{-1}$ のオーキシシン(2,4-D)濃度でもカルス化した。カボチャのオーキシシン感受性は、根の伸長抑制と同様にカルス化に対してもイネよりも高いことが明らかとなった。しかし、イネとカボチャにおける最も顕著な相違点は、オーキシシン存在下における亜鉛の作用であった。イネではオーキシシン存在下の亜鉛の添加は発根数を増加させる(横山ら, 2004)のに対して、カボチャでは、オーキシシンのみで発根数の増加とカルス化を同時に進行させた。カボチャでは、カルス化した時点で、すでに根数はオーキシシン無添加に比べ多くの根を発生させた状態でカルス化しており(第1図B, C)、そのことがカボチャでは、高濃度の亜鉛を添加しても根重の増加が認められない(第1表)という結果を与えたものと推定される。オーキシシン作用によるカルス化が高濃度の亜鉛の添加により根としての外観を示すようになることは、イネ、カボチャにおいて同様であった。しかし、オーキシシン作用による発根やカルス化に対する亜鉛の作用が、カボチャにおいても認められるが、その作用機作には相違点のあることが明らかになった。

以上のことから、オーキシシンにより誘導される根のカルス化は高濃度の亜鉛により根の伸長へと切り替えられると推察される。すなわち、培地のオーキシシン濃度は発根とカルス化を決定するスイッチとして重要な要素であるが、そのスイッチの制御には亜鉛も大きく関与していることを示唆している。今後、亜鉛とオーキシシンの相互作用について、さらに詳細な検討を実施することが重要である。

## 文 献

小口慶子, 井上昭彦, 明石良, 佐伯雄一, 長友由隆, 赤尾勝一郎, 高木浩 2004. 西洋ミヤコグサ由来 Super-growing Root (*Lotus corniculatus* L.) の発根・伸長に及ぼす亜鉛添加の効果. 土肥誌 75: 9-14.  
河合義隆 1999. 植物の根に関する諸問題 [75] 一挿

し木繁殖における不定根形成一. 農及園 74: 78~82.

Zobayed, S. M. A., Armstrong, J. and Armstrong, W. 1999. Evaluation of a closed system, diffusive and humidity-induced convective throughflow ventilation on the growth and physiology of cauliflower invitro. Ibid. 59:113-123.

高橋信孝・増田芳雄編 1994. 生理作用. 植物ホルモンハンドブック「上」. 培風館, 東京 pp357-396.

田村三郎 1977. オーキシシンと除草剤. 植物ホルモン. 大日本図書, 東京 pp98-155

増田芳雄・神坂盛一郎共訳 1972. オーキシシンと屈折. 発生生物学シリーズ 2 植物の生長制御. 丸善, 東京 pp71-77.

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Plant Physiol. 15: 471-497.

Pereira-Netto, A. B. 2001. Effect of inhibitions of ethylene biosynthesis and signal transduction pathway on the multiplication of in vitro-grown *Hancornia speciosa*. PlantCell. Tissue and Organ Culture. 66: 1-7.

横山明敏, 佐伯雄一, 小口慶子, 長友由隆, 高木浩, 赤尾勝一郎 2004. イネにおけるオーキシシンの発根促進に及ぼす亜鉛の影響. 土肥誌 75: 211-216.