

シオデ多芽体由来カルスからの体細胞胚形成

井内美砂・小川純一

Somatic embryogenesis from multiple shoot-derived calli of *Smilax riparia* A. DC.
var. *ussuriensis* (Regel) Hara et T. Koyama.

Misa IUCHI and Jun-ichi OGAWA

要約

井内美砂・小川純一(1995):シオデ多芽体由来カルスからの体細胞胚形成. 徳島農試研報, (31): 13~20.

シオデの体細胞胚利用による大量増殖法を確立するため,多芽体から切り取った不定芽を2,4-D 2mg/lを含むMS培地で培養し,体細胞胚形成能力の高いカルスすなわちエンブリオジェニックカルスを誘導した。得られたエンブリオジェニックカルスは,1~2mg/lの2,4-Dを含む液体および固形培地で増殖した。2,4-Dを含まない培地に移すことにより体細胞胚が発生し,水処理の後発芽がみられたが,発芽後の生長は遅く完全な再生植物体は得られなかった。エンブリオジェニックカルスは8 月の暗条件で,1年間程度保存することができた。

キーワード:山菜,シオデ,体細胞胚,エンブリオジェニックカルス,多芽体,大量増殖

はじめに

シオデの産地化を図るためには,優良系統の苗を大量に確保することが重要である¹⁾。このため,組織培養による大量増殖法が検討され,冬芽組織を材料とした連続多芽体培養法が確立している⁵⁾。しかし,この方法では,多芽体の分割,移植,発根培地への移植に多くの労力を必要とする。これに対し,カルス由来の体細胞胚を利用する方法は,増殖率を高くできること,液体培地と組み合わせれば培養の自動化が行いやすいこと,発根処理は不要等の特徴を持ち¹¹⁾,安定した系が確立できれば非常に有望な大量増殖法となりうる。

シオデと同じユリ科の野菜であるアスパラガスでは,カルス経由の体細胞胚利用による大量増殖法がほぼ確立している^{3,7,10)}。しかしシオデでは葉切片からの直接的な体細胞胚の発生や,節間および根の切片上でのカルス発生を経た体細胞胚からの植物体再生の報告¹²⁾があるのみで,不定胚形成能力の高いカルスすなわちエンブリオジェニックカルス(embryogenic callus,以後ECと略す)⁹⁾を液体振とう培養で増殖させてから体細胞胚を誘導する系は確立していない。

そこで,シオデにこの手法を適用し体細胞胚による大量増殖法の開発をすすめるため,EC誘導に適する培地の植物ホルモン濃度の種類と濃度について検討し,得られたECから体細胞胚を誘導し発芽させることに成功した。またECの継代培養の省力化や,継代培養の繰り返しによる変異の発生を防ぐための,ECの低温保存条件についても検討したので報告する。

試験方法

1 ECの誘導

1) 材料

材料として,優良系統の無菌材料を多数得られることから,連続多芽体培養法による多芽体を用いた。シオデ多芽体は徳島農試池田分場から譲渡されたものを増殖させて用いた。多芽体は,1988年12月に冬芽の茎頂以外の組織の厚さ約1mmの切片を,NAA(2-naphthalene acetic acid)0.05mg/l,BA(6-benzyl aminopurine)0.5mg/l,ショ糖30g/l,寒天7g/lを加えたMS(Murashige and Skoog, 1962)培地に置床して得られた¹⁾もので,同組成の培地で2~3ヵ月毎に継代することにより増殖

させた。これらの多芽体から、不定芽や伸長したシュートを切り取って材料とした。

2) 培地の植物ホルモンの種類と濃度

MS培地にシヨ糖を30g/l、寒天を7g/lに加え、オーキシンとしてNAAおよび2,4-D(2,4-dichlorophenoxyacetic acid)を、サイトカイニンとしてBAを第1表のように組み合わせて添加した。

培地はオートクレーブで滅菌した後、直径6cmのプラスチックシャーレに10mlずつ分注した。1991年12月10日に多芽体より切り取った長さ2~10mmの不定芽を各シャーレに1個ずつ置床した。シャーレ数は各区10枚ずつとした。培養は、25℃の暗条件下で行い、約1ヵ月毎に同じ組成の培地に継代した。

第1表 培地に添加した植物ホルモンの種類と濃度

オーキシン(mg/l)		サイトカイニン(mg/l)	
NAA	1.0	× BA	0 1.0
2,4-D	10.0		
	0.1		
	1.0		
	2.0		

3) 2,4-Dを含む培地に加えるBA濃度

2,4-D 2mg/lおよびBA 0, 0.1, 1.0mg/l, シヨ糖20g/l, 寒天8g/lを含むMS培地をオートクレーブ滅菌後、直径9cmのプラスチックシャーレに20mlずつ分注した。1992年10月27日に多芽体より切り取った不定芽を厚さ1~2mmの輪切りにし、各シャーレに16個ずつ置床した。シャーレ数は各区10枚とした。培養は、25℃の暗条件下で行い、約1ヵ月毎に同じ組成の培地に継代した。側芽から伸長したシュートなどは継代時に除去した。

2 ECの増殖

1) 材料

1の2)において2,4-D 2mg/l, BA 1mg/lを含むMS培地で誘導し、2,4-D 1mg/l, シヨ糖20g/l, ジェランガム2g/lを含むMS培地で1ヶ月毎に継代したECを用いた。培地は直径9cmのプラスチックシャーレに20mlずつ分注した。培養は25℃の暗条件下で行った。

2) 液体培地による増殖

2,4-D 2mg/l, シヨ糖20g/lを含むMS培地を30mlずつ入れた100ml三角フラスコに、誘導から約4ヵ月目のECをおよそ0.3mlずつ入れ、100rpmで巡回振とう培養し、1~2週間毎に継代した。培養は25℃, 約500lux, 14時間日長で行った。

3) 固形培地による増殖と光条件

光条件がECの増殖に及ぼす影響を知るため、直径25mm, 長さ120~150mmの試験管に継代培地を10mlずつ分注したものに、誘導から9ヵ月後のECを移植した。光条件は、約500luxの弱光および暗条件とした。培養は25℃で行った。

3 ECの再分化

1) 材料

2の2)において液体振とう培養により増殖させたECを用いた。

2) 再分化方法 1

Saitoら¹⁰⁾がアスパラガスで開発した方法に準じて行った。液体振とう培養を開始して約1ヵ月後、目開き1mmのふるいを通した直径1mm未満のECを、シヨ糖30g/l, ジェランガム10g/lを含むMS培地を30mlずつ入れた100ml三角フラスコに移植し、無菌通気膜でふたをした。40日後、発生した体細胞胚を、シヨ糖30g/l, ジェランガム2g/lを含む1/2MS培地を20mlずつ入れた直径9cmのプラスチックシャーレに移植した。培養は25℃, 約500lux, 14時間日長で行った。

3) 再分化方法 2

液体振とう培養を開始して約6ヵ月後、カルスを600μmおよび目開き1mmのふるいで分画し、シヨ糖

30g/l, ジェランガム2g/lを含む1/2MS培地を20mlずつ入れた直径9cmのプラスチックシャーレに移植した。36日後, 体細胞胚とカルスを選別し, Kunitake & Mii⁴⁾がアスパラガスで行った水処理の方法に準じて, 水を25mlずつ入れた100ml三角フラスコに移植し100rpmで振とうした。33日間の水処理の後, 再び1/2MS培地を20mlずつ入れた直径9cmのプラスチックシャーレに移植した。培養は25℃, 振とう時は約500lux, それ以外は約5000luxの14時間日長で行った。

4 ECの低温保存

2の3)の固形培地によるECの増殖と光条件において, 試験管に移植して3.5ヵ月目で継代2週間目のECを用いた。試験管を6℃および8℃の冷蔵ショーケースに入れ, それぞれ明条件, 暗条件を設定した。明条件は実験室内の光が当たるようにし, 暗条件はアルミ箔で覆った。試験管数は各区50本ずつとした。約1年後, 25℃の培養室に移し, 増殖の状態を調べた。

試験結果

1 ECの誘導

1) 培地の植物ホルモンの種類と濃度

置床から約4ヵ月後の状態を第2表に示した。不定形組織と表されているのは丸みを帯び表面が滑らかで硬く黄白色の不定形の組織で, 典型的な体細胞胚とは明らかに異なっていた(写真1)。これらは低濃度のNAAおよび高濃度の2, 4-Dを含む培地で比較的多く, NAAや0.1mg/lの2, 4-Dを含む培地では不定芽, 不定根や固い透明なカルスの発生が多く認められた。2, 4-D 2.0mg/lおよびBA 1.0mg/lを含む培地では褐変した切片が多かったが, 置床から約6ヵ月後, 褐変した組織の表面に黄白色のECの発生が認められた(写真2)。

第2表 培地の植物ホルモンの濃度と不定芽切片の反応

植物ホルモン濃度 (mg/l)			不定形組織形 成切片数(個)	不定芽形 成 切片数(個)	不定根形 成 切片数(個)	固いカルス形 成 切片数(個)	褐変枯死 切片数 (個)	EC形成 切片数 (個)
NAA	2, 4-D	BA						
1	-	-	2	5	4	7	2	0
10	-	-	0	6	1	2	4	0
-	0.1	-	0	8	3	2	2	0
-	1.0	-	3	1	0	4	5	0
-	2.0	-	3	6	0	3	1	0
1	-	1	1	6	0	7	3	0
10	-	1	0	5	0	2	4	0
-	0.1	1	0	5	0	7	3	0
-	1.0	1	0	4	0	1	5	0
-	2.0	1	0	2	0	0	8	1

注) 置床切片数は各区10個ずつ。EC形成切片数は置床から約6ヵ月後の数。

2) 2, 4-Dを含む培地に加えるBA濃度

置床から約5ヵ月後の状態およびEC発生に要した日数を第3表に示した。

不定形組織に加えて, 褐変した組織上に発生した粘性物質中に, 直接褐色の球状や棒状の体細胞胚の発生がみられた(写真3)。これらの体細胞胚はBAを含まない培地で多く見られ, BA濃度が高くなるほど少なく, BA 1.0mg/lではほとんど発生していなかった。また, BA 1.0mg/lでは固いカルスが多かった。

ECの発生は, BAを含まない培地で最も早く認められ, 次いでBA 1.0mg/l区, 0.1mg/l区の順であった。

第3表 培地のBA濃度と不定芽切片の反応

BA濃度 (mg/l)	不定形組織または 直接体細胞胚を形 成した切片数(個)	固いカルスを形成 した切片数(個)	不定芽を形成 した切片数(個)	EC発生に要し た日数(日)
0	95	6	0	202
0.1	76	47	20	303
1.0	37	74	37	248

注) 置床切片数は各区160個ずつ。

2 ECの増殖

1) 液体培地による増殖

液体培地に移して2週間後のカルスの状態は、褐変した塊状のカルスと粒状の黄白色のカルスとに分けられた。褐変したカルスはほとんど増殖しなかったが、黄白色のカルスは写真4-aに示したように小さく内容の充実した細胞からなっており、分裂が盛んであった。このカルスの増殖率は2週間でおよそ2倍以内であった。

液体培地に移して5ヵ月後に、一部の三角フラスコにおいて、肉眼で細かく白っぽい粉状に見えるカルスが多くなり、他のカルスに比べ増殖が速くなっているのが認められた(写真4-b)。増殖率は2週間で3~4倍であった。増殖の遅い粒状のカルスは大きさがおおよそ250 μm以上で、個々の細胞は直径約20 μmの内容の密な細胞からなっていた。これに対し粉状のカルスは、カルスの大きさは粒状カルスより小さいが、個々の細胞は30~100 μmと大きく、細胞内は充実していなかった。粒状のカルスのみを継代培養していても、継代培養中に一部が粉状の増殖の速いカルスに変化していく場合がみられた。

2) 固形培地による増殖と光条件

試験管に移して約3ヵ月後のカルスの状態を写真5に示した。明条件で培養したカルスは柔らかくくずれやすいカルスが多く、色は明るい黄色から白色が多かった。暗条件で培養したカルスは明条件に比べ固く粒の大きいカルスが多く、黄色が濃かった。光条件のちがいによる増殖率の差ははっきりしなかった。いずれの条件も継代間隔を長くすると、同一カルス中に柔らかい部分、固い部分、体細胞胚の発生などがみられ、均一でなくなる場合が多かった。

3 ECの再分化

1) 再分化方法 1

再分化培地に移植して約1ヵ月後、カルスの増殖と同時に、写真6-aに示したように球状で黄白色透明の体細胞胚状の組織が多数発生しているのが認められた。これらは集塊になっていたが、ピンセットでさわると1つずつ容易にはずれるものもみられた。これらの集塊を1/2MS培地に移植したが、正常な発芽はみられず、写真6-bに示したように一部が緑色を呈し、芽状の組織がわずかに伸長したのみで生長を停止した。

2) 再分化方法 2

カルスの大きさによる体細胞胚発生は1mm以上で最も多く、600 μm以上1mm未満のカルスからは体細胞胚の発生は少数で不定芽状組織の発生が多く、600 μm未満のカルスからは体細胞胚はほとんど発生しなかった。体細胞胚は写真7-a, 7-bに示したように球状からバナナ型で、再分化方法1で発生したものより不透明で大型であった。1mm以上のカルスから発生した体細胞胚をピンセットで拾い上げ、水処理の後再び1/2MS培地にまいた場合、写真7-c, 7-dのように最も多くの発芽が見られた。これらの胚は芽と根を一本ずつ持ち、根は2cm以上に伸長したが、発芽後の生長が悪く、完全な植物体は得られなかった。

4 ECの低温保存

低温保存後のカルスを25 ℃の培養室に移して42日後の状態を第4表に示した。6 ℃で保存した場合褐変枯死するカルスが多く、枯死しなかったカルスも増殖が遅れた。8 ℃で保存した場合はほとんどのカルスが速やかに旺盛な増殖を示した。特に暗条件で保存したカルスの増殖状態がよかった。

第4表 低温保存後のカルスの増殖状態

保存温度()	光条件	カルスの増殖状態注)			褐変枯死 カルス数(個)
		大(個)	中(個)	小(個)	
6	明	2	9	15	24
6	暗	5	6	26	13
8	明	34	8	0	8
8	暗	40	5	2	3

注) 大は元のカルスが完全に覆われている状態, 中は元のカルス量の2倍以上, 小はわずかに増殖している程度を表す。

考察

カルス由来の体細胞胚を利用した大量増殖法の確立のためには, まずECを誘導することが必要である。シオデと同じユリ科に属するアスパラガスでは, 桑原ら⁶⁾が2, 4-Dを2~4mg/l添加したMSジェランガム培地で未熟胚から, Saitoら¹⁰⁾が2, 4-Dを5 μ M添加したLS(Linsmaier and Skoog, 1965)寒天培地で実生鱗芽群または若茎側芽から, 甲村・井本³⁾が2, 4-Dを10 μ M添加したMS寒天培地で多芽集塊から, ECを誘導している。今回シオデで誘導条件を検討したところ, 2, 4-D 2.0mg/lを含むMS培地においてフライアブル(friable)なカルスが形成された。これらのカルスは再分化方法1により, 一部は体細胞胚状の組織を形成したが, この組織からの植物体再生はほとんどみられなかった。しかし, 再分化方法2により多数の球状あるいはバナナ型の体細胞胚を形成し, 発芽が観察されたことや, カルスを形成する細胞の特徴がアスパラガスなどのECと極めて似ていることなどから, これらのカルスはECであると判断された。

甲村ら²⁾はアスパラガスの茎切片からのEC誘導のための数種のオーキシンの添加について検討している。その結果, どのオーキシンにおいてもカルスが形成されたがNAA, IAAなどでは不定芽, 不定根が分化しやすいため, 2, 4-Dが適当としている。本報ではNAAを添加した培地ではECが誘導されず, 2, 4-Dの添加で誘導されたことから, オーキシンにはアスパラガスと同様2, 4-Dが適当と考えられた。また, 2.0mg/lの2, 4-Dを加えた培地では, BA濃度にかかわらずECが形成されたことから, BAはECの形成そのものにはあまり影響がないと考えられ, BA濃度が高いほど固いカルスや不定芽の形成率が高かったことから, ECの誘導には2.0mg/lの2, 4-D単独の添加が有効と考えられた。

液体振とう培養によるシオデのECの増殖率は, アスパラガスの液体振とう培養による増殖率が1週間に8~10倍¹⁰⁾であるのに比べかなり低く, 多いときで2週間に2倍程度であった。この増殖率の低さは大量増殖系を確立する上で問題点の1つになると思われる。やや増殖率の高い粉状のカルスが継代培養中に現れたが, このカルスからは体細胞胚の形成がほとんどなかったこと, 細胞の形態などから, アスパラガスなどで報告されているnon-EC¹⁰⁾ではないかと考えられた。

固形培地による増殖において, 光条件によるECの増殖率の差は明らかでなかった。光の強弱でECや不定胚の誘導が著しく影響されるという報告は少なく¹¹⁾, シオデの場合も特に影響はないと考えられた。固形培地では同一カルスの中に様々な状態を示す部分が混在するため, 継代時には良いカルスの選抜が必要である。このことは優良なカルスを選抜, 維持していく過程では固形培地が有利であることを示している。液体培地での増殖は固形培地で優良なカルスを充分選抜してから行うことが必要であると考えられた。

ECからの再分化には液体振とう培養により増殖させたECを用いたが, 再分化方法により結果が異なった。再分化方法1で得られた体細胞胚状の組織は, 形態は球状で体細胞胚と似ていたが, 芽状組織が伸長したのみで正常な発芽がみられず, 基部が全く他の組織から独立していたとはいえないことから, 体細胞胚ではなく不定芽を発生する組織であった可能性がある。しかし, 再分化方法2で得られた多数の体細胞胚は完全に他の組織から独立しており, 1つの胚から1本ずつの芽と根が発生したことから体細胞胚と判断された。

Saitoら¹⁰⁾は目開き1mmのふるいを通したECを用いて体細胞胚を誘導しているが, シオデでは1mm以上のカルスで体細胞胚の発生率が高かった。又, 水処理がアスパラガスの体細胞胚の発芽に有効と

いう報告⁴⁾と同様、シオデにおいても多数の発芽がみられたが、完全な植物体へと生長しなかったことから、さらに発芽率を上げ発芽後の生長を促す方法の検討が必要である。

ECの低温保存条件は8℃、暗条件が最も優れており、この条件で1年間程度は保存できると考えられた。従来、体細胞胚誘導法では培養変異が起きにくいといわれてきた¹¹⁾。しかし、中島ら⁸⁾はアスパラガスのECと再生植物で倍数性を調査し、ECの継代期間が長くなるほど倍数性変異の発生頻度が高くなることを明らかにし、中村ら⁷⁾もアスパラガスのECの液体振とう培養からの再生植物が高頻度で倍数化していることを見出した。今回のECの低温保存はこのような継代の繰り返しによる変異の発生を防ぐ上で非常に有効であると考えられた。

シオデの体細胞胚を利用した大量増殖法の確立のためには、さらに増殖率、再分化率の高い培養細胞系の選抜や増殖方法の改良、体細胞胚の効率的な誘導、発芽方法の開発が必要であると考えられた。

摘要

シオデの体細胞胚利用による大量増殖法を確立するため、多芽体よりエンブリオジェニックカルス(EC)を誘導する条件について検討し、得られたECから体細胞胚を誘導し発芽させた。ECの増殖、低温保存条件についても検討した。

- 1 材料はNAA 0.05mg/l, BA 0.5mg/lを含むMS培地で増殖した多芽体から切り取った不定芽切片を用いた。
- 2 切片を2,4-D 2mg/lを含むMS培地に置床することにより、6ヵ月から9ヵ月後に小型で球形の細胞からなるフライアブルなカルスが得られ、カルスの形態的特徴と体細胞胚を発生したことから、ECであると判断された。
- 3 EC誘導培地には植物ホルモンとして2mg/lの2,4-Dを単独で含むMS培地が適しており、BAの添加は効果が認められなかった。
- 4 2,4-D 2mg/lを含むMS液体培地によるECの増殖における増殖率はアスパラガスに比べて低く、一部でnon-ECと思われるやや増殖率の高い粉状カルスが発生した。
- 5 2,4-D 1~2mg/lを含むMS固形培地によるECの増殖では、光条件による増殖率の差は特にみられず、カルスの状態が均一でなくなる場合が多かった。
- 6 液体振とう培養で増殖したECを2,4-Dを含まない培地に移すと、1mm以上のECから多くの体細胞胚が発生し、1ヵ月間の水処理の後発芽したが、発芽後の生長が悪く完全な再生植物体は得られなかった。
- 7 ECの低温保存条件は8℃の暗条件がよく、2,4-Dを含む固形培地上で、1年間程度保存することができた。

引用文献

- 1) 川村泰史・黒田秧(1990):シオデの組織培養による大量増殖. 第1報. 組織培養による冬芽からの不定芽形成. 徳島農試研報, 27: 39~43.
- 2) 甲村浩之・長久逸・池田好伸(1990):アスパラガスの不定胚形成による大量増殖. 第2報. メリーワシントン500W実生からの不定胚形成と植物再生及び馴化条件の検討. 広島農試報, 53: 51~61.
- 3) 甲村浩之・井本征史(1994):アスパラガスの不定胚形成による簡易で効率的な苗生産法. 広島農技セ研報, 60: 55~63.
- 4) Kunitake, H. and M. Mii(1990): Somatic embryogenesis and plant regeneration of asparagus (*Asparagus officinalis* L.). Plant Cell Reports, 8: 706~710.
- 5) 黒田秧・川村泰史(1994):連続多芽体培養によるシオデの大量増殖. 四国農試報, 58: 69~83.
- 6) 桑原宏司・中島寿亀・田中政信(1989):胚様体, 苗条原基の利用法の開発. 1. アスパラガスの体細胞胚の誘導について. 佐賀農試研報, 25: 59~64.
- 7) 中村由紀・更科幸代・宇田川昭洋・嵯峨均・三位正洋(1991):アスパラガスの不定胚形成による大量増殖. 第12回植物組織培養学会講演要旨, 50.
- 8) 中島寿亀・國武久登・森欣也(1993):胚様体, 苗条原基の利用法の開発. V. 胚様体利用によるアスパラガスの大量増殖法の開発. 佐賀農試研報, 28: 11~29.
- 9) 斎藤猛雄(1990):不定胚誘導法. 野菜の組織・細胞培養と増殖. 農業図書(東京): 287~299.

10) Saito, T., S. Nishizawa and S. Nishimura(1991): Improved culture conditions for somatic embryo - ogenesis from *Asparagus officinalis* L. using an aseptic ventilativefilter. Plant Cell Reports, 10: 230 ~ 234.

11) 田部井豊(1990):不定胚誘導法. 野菜の組織・細胞培養と増殖. 農業図書(東京): 60 ~ 64.

12) Yamamoto, T., S. Oda(1992): Various methods for seedlings production of *Smilax oldhami* Miq. by tissue culture. Act Horticulturae, 319: 143 ~ 148.

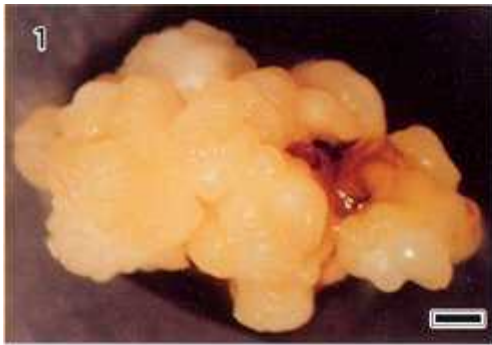


写真1 不定芽切片から発生した不定形の組織

写真2 褐変した組織上に発生したEC

写真3 粘性物質中に直接発生した体細胞胚

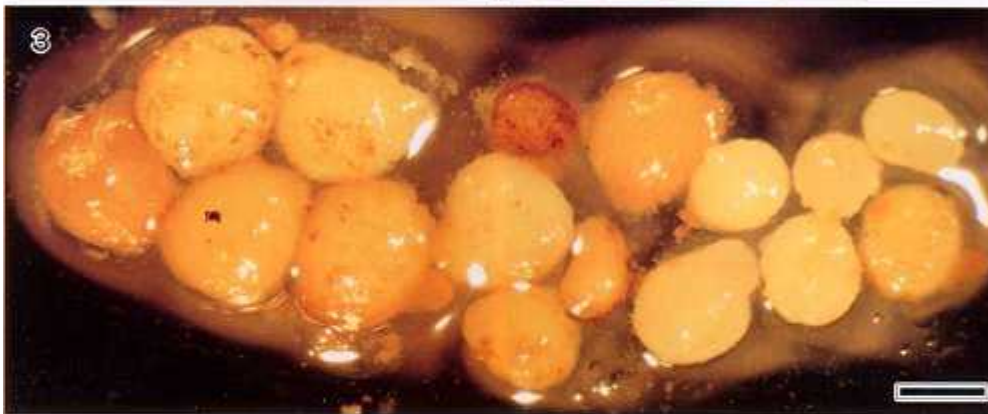


写真4 液体振とう培養におけるカルスの状態

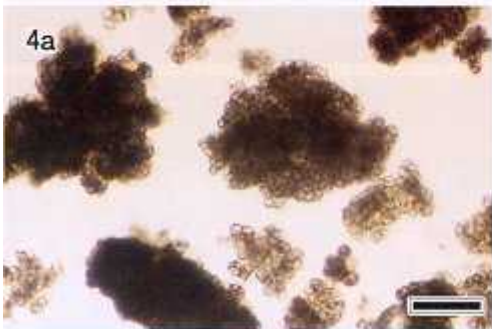
a 増殖の遅い黄白色の粒状カルス

b 増殖の速い白っぽい粉状カルス

写真5 固形培地による培養中のカルスの状態

a 明条件

b 暗条件



スケールは1mm(写真1, 2, 3), 200 μ m(写真4)



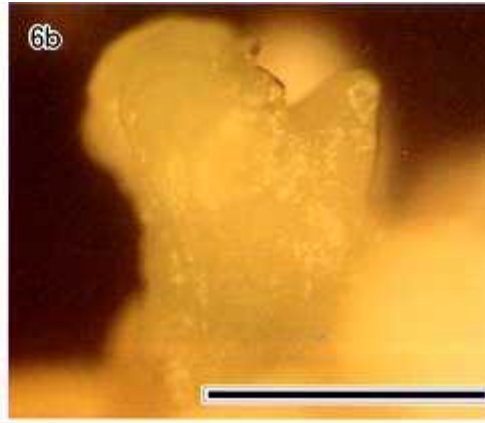


写真6 1mm未満のECからの再分化
 a カルスから発生した体細胞胚状の組織
 b 体細胞胚珠状組織から伸長した芽状の組織

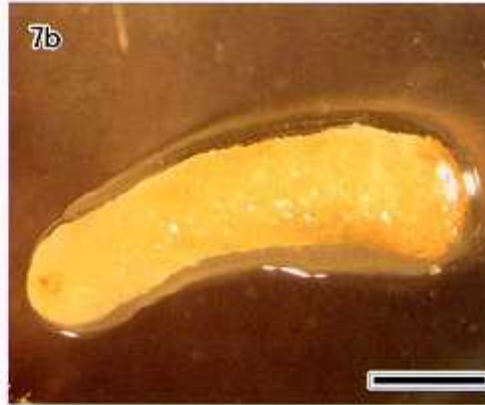


写真7 1mm以上のECからの再分化
 a 球状胚
 b バナナ型胚
 c,d 体細胞胚の発芽

スケールは1mm(写真6,7)

