

タマネギ組織培養における脱分化及び再分化 に及ぼす植物ホルモンの影響

高儀雅俊*・竹村真理・一井眞比古

EFFECT OF PLANT HORMONS ON DEDIFFERENTIATION AND REGENERATION IN ONION (*Allium cepa* L.) TISSUE CULTURE

Masatoshi TAKAGI*, Mari TAKEMURA, and Masahiko ICHII

Combinations of six plant hormones were carried out in onion (*Allium cepa* L.) tissue culture. NAA, 2,4-D and picloram were used as auxin, and kinetin, BA and 2ip were used as cytokinin. Onion tissue, which were seeds, bulbs and callus, were cultured with MS medium including sucrose, gerangagum, auxin and cytokinin at 25°C and continuous light. High differentiation was observed in the medium containing picloram. However, differentiation did not occur in the medium containing NAA. Adventitious bud and root were frequently observed. Forty seven percent of the callus occurred the adventitious bub in the favorite medium. Adventitious embryo was not observed in each combination of plant hormones.

植物ホルモンの種類と濃度がタマネギ組織の脱分化及び再分化に及ぼす影響について検討した。MS培地組成にショ糖及び合成寒天を加えた基礎培地にオーキシンであるNAA, 2, 4-D, Picloram並びにサイトカイニンであるカイネチン, BA, 2ipを添加し、それに外植片やカルスを置床した。

脱分化に適した外植片を見いだすために種子及び鱗葉片などを培地に置床したところ、カルスを安定的に獲得しうる外植片としては鱗葉より種子が優れていると思われた。そこで種子を無菌播種し、これを用いて最適脱分化培地のための植物ホルモンの組み合わせについて検討した。オーキシンのなかではPicloram添加区で脱分化率が最も高く、次いで2, 4-D添加区, NAA添加区であった。NAA添加区ではサイトカイニンの種類に拘らず脱分化がほとんど認められなかった。一方サイトカイニンの種類によって脱分化率はあまり変異せず、むしろサイトカイニンの添加が脱分化を抑制する傾向を示した。これらの結果から、種子カルスを効率よく得るためには基礎培地に10 μ M Picloramを加えるのが適当であると考えられた。次にカルス増殖に適した植物ホルモンを検討した結果、基礎培地に10 μ M Picloramを添加するのが適当であると推察された。さらにカルスからの再分化に適した植物ホルモン、すなわちPicloramとカイネチン, BA, または2ipとの組み合わせについて検討した。いずれの培地でも不定胚は観察されなかったが、Picloramが0.1 μ M以下で、かつサイトカイニンが10 μ M以下の区では最大40%の再分化率を示した。それらの区の数多くでは不定芽及び不定根が同時に観察された。種子カルスからの再分化植物体がかたりの高頻度で得られたことは、不定胚誘導法の確立にとってきわめて重要な指針を与えると考えられる。

* 香川県立農業経営高等学校 Kagawa Prefectural Agriculture Management High School

緒 言

タマネギ (*Allium cepa* L.) の栽培品種の多くは雑種強勢を利用した F₁ 品種である。F₁ 品種の種子は、雄性不稔株の中に花粉親となる株を一定割合で栽植し採取がされている⁽¹⁾。また雄性不稔株は鱗葉の分球などによって増殖されるが⁽²⁾、その生産効率は低く、遺伝的に安定した雄性不稔株の大量増殖法の開発が望まれている。

大量増殖法のひとつとしてカルスから多数の不定胚を同時に誘導する方法が考えられ、ニンジンやネギなどの多くの植物ではそのような不定胚誘導系が確立されている^(2,3,4,5,6)。しかしながら、タマネギではカルスから不定胚を誘導する、いわゆる不定胚誘導による大量増殖法はまだ確立されていない^(2,7,8,9,10)。一方、不定胚誘導法は個体を直接かつ短期間に増殖させることから育種年限の短縮につながると考えられ、優良品種の早期育成にとっても重要な手段である⁽¹¹⁾。

本実験ではタマネギにおける不定胚誘導法を確立するための基礎的地見を得るために、植物ホルモンとりわけオーキシシンとサイトカイニンの種類及び濃度がタマネギ組織の脱分化及び再分化に及ぼす影響について検討した。なお脱分化及び再分化に及ぼす遺伝子型の影響についても併せて検討した。

材料及び方法

タマネギ (*Allium cepa* L.) を供試し、脱分化に適した外植片を見出すための実験をまず行い、ついで脱分化、カルス増殖及び再分化に適した植物ホルモンを見いだすための実験を行った。これらの実験に用いた培地は、MS培地組成⁽¹²⁾に3%ショ糖及び、種々の植物ホルモンを添加した後、pH5.8に調整し、さらにゲル化材である0.2%合成寒天(ジェランガム)を加えたものであった。なお、MS培地組成に3%ショ糖及び0.2%ジェランガムを加えたものを基礎培地とした。供試した植物ホルモンはオーキシシンである1-naphtalenacetic acid (NAA), 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2, 4-D), 4-amino-3,5,6-trichloro-2-pyridinecarboxylic acid (Picloram) 並びにサイトカイニンである6-furfurylamino-purine (カイネチン), 6-benzylaminopurine (BA), N-isopentenyl-aminopurine (2ip) であり、基礎培地に添加した種類は実験ごとに異なった。また培養条件はいずれの実験においても同様であり、25℃, 1000lux連続照明であった。

(1) 脱分化に適した外植片

‘もみじ’の葉片(伸長した鱗葉の一部)、鱗葉片、鱗葉生長点部、鱗葉根盤部及び種子を70%エタノールに10秒、さらに3%アンチホルミンに15分それぞれ浸漬し、滅菌水で洗浄後、基礎培地に4.5μM 2, 4-Dを加えた培地に置床した。置床60日後に脱分化のようすを外植片ごとに観察した。

(2) 脱分化に適した植物ホルモン

予備実験及び(1)の実験結果により基礎培地に2, 4-Dのみを添加しても脱分化したが、より効率の良い脱分化培地を検討するため、植物ホルモンの種類とその濃度を組み合わせた90区を設定した。(1)の実験結果から、発芽種子の初生根生長点部からの脱分化が旺盛であったので、各区当り45~60個の種子を培地に置床した。置床後30日目に初生根生長点部から脱分化している数を調べた。なお脱分化に及ぼす遺伝子型の影響を併せて明らかにするため‘もみじ’、‘もみじ3号’及び‘くれない’の3品種を実験に供試した。供試した植物ホルモンは次のとおりである。オーキシシンとしてNAA, 2, 4-DおよびPicloram⁽¹³⁾をサイトカイニンとしてカイネチン, BA及び2ipを用い^(14,15)、オーキシシンの濃度は1, 10, 100μM, サイトカイニンの濃度は0, 0.1, 1, 10μMであった。

(3) カルスの増殖に適した植物ホルモン

(2)の実験結果を参考にし、サイトカイニンとオーキシンの組み合わせによる6区の培地に約0.3gのカルスを区当り30個置床し、1週間毎にカルス生重量を調査した。サイトカイニンとオーキシンの組み合わせは次のとおりである。0.1 μ M BAに10 μ MのNAA, 2, 4-D, 及びPicloramのいずれかを組み合わせた3区であった。なお供試したカルスは10 μ M Picloram及び1 μ M BAの脱分化用培地に‘もみじ’種子を置床して得られたものであった。

(4) 再分化に適した植物ホルモン

(2)及び(3)の実験結果を参考にし、Picloramと2ip,BA及びカイネチンのいずれかとの組み合わせによる30区の再分化用培地に約0.3gのカルスを区当り30個置床し、30日後に不定芽や不定根の出現状況を調査した。なおPicloramの濃度は0, 0.1, 及び1 μ Mであり、カイネチン, BA及び2ipの濃度は0, 1, 10及び100 μ Mであった。培地に置床したカルスは、前培養条件を同一にするため基礎培地に10 μ M Picloram及び1 μ Mカイネチンまたは1 μ M BAを添加した培地で30日間継代し、その後再分化培地に植え込んだ。

再分化用培地に置床したカルスは、‘もみじ’の種子を1~100 μ M Picloram及び0.1~1 μ M BA脱分化用培地に置床し、そこで脱分化したカルスを10 μ M Picloram及び1 μ M BAの培地で30日間継代したものであった。

結果及び考察

(1) 脱分化に適した外植片

鱗葉及び種子からの脱分化率について示したのが第1表である。葉片及び鱗葉片では脱分化が起こらなかったが、鱗葉生長点部、鱗葉根盤部及び発芽種子の初生根生長点部では脱分化が認められ、鱗葉生長点部及び初生根生長点部での脱分化率はそれぞれ87%及び81%であり、鱗葉根盤部でのそれより顕著に高かった。これらの結果は、中島ら⁽¹⁰⁾の結果とほぼ同様であり、脱分化が細胞分裂の盛んな組織で起こりやすいこと並びに2, 4-Dが非分裂組織の脱分化を誘導しにくいことを示唆している。また安定かつ容易にカルスを供給するために無菌播種した種子を利用するのが有効であることを示している⁽¹⁶⁾。

(2) 脱分化に適した植物ホルモン

無菌播種による種子の発芽率は100%であり、脱分化を観察するには全く支障がなかった。脱分化は、(1)の結果同様、種子の初生根の生長点より脱分化がおこった。オーキシニンとサイトカイニンの組み合わせによる脱分化率を各品種別に示したのが第2表である。オーキシニンであるNAA, 2, 4-D及びPicloramのうち、NAA添加培地では表から明らかのようにほとんど脱分化が起こらず、発根した根の先端が鱗葉状にふくらみ、さらにそれが一枚一枚裂けた状態になったのが多くみられ

第1表 タマネギ外植片からの脱分化率

器 官	脱分化数 (カルス化数/置床数)		脱分化率 計 (%)
	1回目	2回目	
葉 片 ¹⁾	0/15	0/11	0/26 0
鱗 葉 片 ²⁾	0/15	0/50	0/65 0
鱗葉生長点部 ³⁾	6/7	15/17	21/24 87
" 根盤部 ⁴⁾	0/15	4/9	4/24 22
種 子	12/15	30/37	42/52 81

1) 伸長した鱗葉の一部, 2) 貯蔵栄養体の部分, 3) 鱗葉基部の上部, 4) 鱗葉基部の下部。

第2表 タマネギ初生根からの脱分化率(%)に及ぼすオーキシン及びサイトカイニンの影響

	オ ー キ シ ン									
	NAA (μ M)			2, 4-D (μ M)			Picloram (μ M)			
	1	10	100	1	10	100	1	10	100	
品種：もみじ										
カイネチン	0	0	0	86	50	27	92	98	94	
(μ M)	0.1	0	0	79	38	10	88	71	58	
	1	0	0	41	50	14	67	48	33	
サイ	10	0	0	33	10	10	52	75	77	
イト	BA	0	(0	0	86	50	27	92	98	94)
カ(μ M)	0.1	0	0	0	89	39	9	81	89	43
イ	1	0	0	17	82	67	40	76	78	58
ニ	10	0	0	0	52	33	33	63	61	60
ン										
2iP	0	(0	0	0	86	50	27	92	98	94)
(μ M)	0.1	0	0	4	86	71	40	86	94	90
	1	0	0	0	68	38	65	83	92	90
	10	0	0	0	53	70	40	90	92	90
品種：もみじ3号										
カイネチン	0	0	0	2	61	43	9	95	100	96
(μ M)	0.1	0	0	9	64	54	0	86	76	77
	1	0	0	0	84	29	0	58	86	75
サイ	10	0	0	0	67	17	0	82	90	67
イト	BA	0	(0	0	61	43	9	95	100	96)
カ(μ M)	0.1	0	0	5	57	45	14	88	88	43
イ	1	0	0	0	67	58	42	76	78	67
ニ	10	0	0	0	42	58	42	71	71	79
ン										
2iP	0	(0	0	2	61	43	9	95	100	96)
(μ M)	0.1	0	0	29	74	68	16	93	82	50
	1	0	10	29	66	83	48	92	92	57
	10	0	0	6	86	69	44	75	83	67
品種：くれない										
カイネチン	0	0	0	1	69	59	60	96	97	95
(μ M)	0.1	0	0	0	50	71	33	86	78	77
	1	0	0	0	83	63	71	75	99	75
サイ	10	0	0	13	5	9	78	83	96	72
イト	BA	0	(0	0	69	59	60	96	97	95)
カ(μ M)	0.1	0	0	0	71	22	0	88	92	70
イ	1	0	0	0	42	20	0	81	86	54
ニ	10	0	0	0	0	60	0	58	77	58
ン										
2iP	0	(0	0	1	69	59	60	96	97	95)
(μ M)	0.1	0	0	4	88	79	62	99	94	50
	1	0	0	0	67	47	80	92	92	57
	10	0	0	0	60	50	70	92	94	67

た。しかしながらその細胞表面はなめらかであった。一方、初生葉の伸長は2, 4-D, Picloram添加区より著しく旺盛であった。このことより1~100 μ M NAAは茎葉の生育を促進すると考えられる。2, 4-D及びPicloramを添加したほとんどの区ではカルスを生じたが、Picloram添加区の脱分化率はサイトカイニンの種類や濃度に拘らず2, 4-D添加区のそれより高かった。また2,

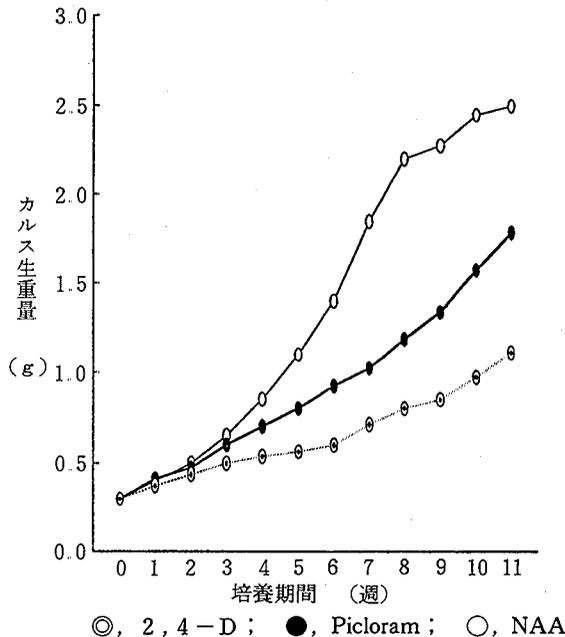
4-D濃度が高いほど脱分化は低くなったが、Picloramでは10 μ M添加区で最も高い脱分化率を示した。脱分化は、発芽後に根の先端が膨らむことから始まり、その後先端の表面にカルスが形成された。カルスが形成されると根の伸長はほぼ1~2cmで止まった。脱分化しない場合には根の一部が小球状の鱗葉を形成したが、初生葉は成長を続けるようであった。これらの結果は、2, 4-D及びPicloramが根の分裂細胞に作用して、根固有の細胞分裂を抑制し、未分化な細胞を形成する分裂へ誘導したことを推察させると共に、高濃度のオーキシンの正常な形態形成を抑制するとの考え⁽¹⁷⁾を支持するであろう。

サイトカイニン添加による脱分化への作用であるが、サイトカイニンの種類による一定の傾向は認められなかった。サイトカイニンの添加が脱分化を抑制する傾向を示し⁽¹⁷⁾、その傾向はオーキシン濃度が高いほど強く現れ、かつPicloramより2, 4-Dで顕著であった。即ちサイトカイニンはアデニンの誘導体で、オーキシンと共同して植物の細胞分裂を促進する能力を持っている⁽¹⁸⁾といわれているにもかかわらず、本実験の結果では添加の効果が必ずしも認められなかった。むしろ添加により脱分化を抑制するのが認められた。

脱分化率は‘もみじ’、‘もみじ3号’及び‘くれない’のいずれの品種においてもほぼ同様であった。NAAとサイトカイニンとの組み合わせ培地では、脱分化がどの品種においてもほとんど認められず、Picloram及び2, 4-Dとサイトカイニンとの組み合わせ培地ではどの品種においてもほぼ似通った脱分化率を示した。2, 4-Dとカイネチンとの組み合わせ及び2, 4-DとBAとの組み合わせ培地における脱分化率が品種間で異なる傾向が認められるが、試験区による実施期間の相異や少ない反復数を考慮しなければならぬだろう。また供試した3品種の遺伝的背景が大きく異なることを併せ考えると、本実験から脱分化に及ぼす遺伝子型の影響を明らかにすることは難しいと考えられる。

(3) カルスの増殖に適した植物ホルモン

カルスの増殖に及ぼす3種類のオーキシンの影響を示したのが第1図である。いずれのオーキシ



第1図 カルス増殖に及ぼすオーキシンの影響

ンにおいてもカルスは培養期間の経過に伴ってほぼ直線的に増大したが、その程度は2, 4-D, Picloram, NAA添加区の順に大きかった。培養開始後の10週間にカルス量が、2, 4-D, Picloram及びNAA添加区でそれぞれ3倍, 5倍, 8倍になった。NAA添加区ではカルス量の増大が顕著であったが、培養開始3週間目頃から不定根状の組織が発生し、その後もそれが増加した。2, 4-D及びPicloramの添加区ではそのような組織は認められなかった。以上の結果からカルスの増殖には、供試した3種類のオーキシンの中ではPicloramの添加が最も適すると考えられる。

(4) 再分化に適した植物ホルモン

Picloramとサイトカイニンとの組み合わせ培地における不定芽及び不定根再分化率を示したのが第3表である。いずれの培地においても不定胚の形成は認められなかった。サイトカイニンが10μM以下で、かつPicloramが0.1μM以下の区では不定根の再分化率が極めて高く、再分化率が100%の区も多くみられた。一方、不定芽の再分化がみられない区も多く、再分化率の最も高い区でも40%であった。不定芽の多くみられた区ではサイトカイニンが10μM以下で、かつPicloramが0.1μM以下であり、不定根の発生と並行することが認められた。3品種のうち、‘もみじ’及び‘もみじ3号’における再分化率はほぼ同様であったが、‘くれない’のそれとは異なっていた。‘もみじ’及び‘もみじ3号’における不定芽再分化率は‘くれない’におけるそれより1~10μM BA及び0~0.1μM Picloram添加区で高かった。一方1~10μM 2ip添加区では‘くれない’のカルスは不定芽を再分化させているが、‘もみじ’及び‘もみじ3号’のカルスは不定芽を再分化させなかった。これらの結果は、遺伝子型が不定芽等の再分化に影響することを示唆しており、不定胚形成と遺伝子型との密接な関係を認める⁽¹⁹⁾ものと思われる。

第3表 カルスからの不定芽及び不定根再分化率に及ぼすオサイトカイニンの影響

品種	Picloram (μM)	サイトカイニン									
		カイネチン (μM)				BA (μM)			2ip (μM)		
		0	1.0	10	100	1.0	10	100	1.0	10	100
もみじ	0	18/100 ¹⁾	20/67	27/100	0/0	40/100	7/87	47/13	0/100	13/100	20/93
	0.1	2/93	0/57	40/53	0/0	0/100	40/87	20/7	0/93	0/93	33/100
	1.0	2/0	0/0	7/0	0/0	0/0	7/0	0/0	0/0	7/0	0/0
もみじ 3号	0	2/97	7/67	13/100	0/0	33/100	7/100	8/8	0/100	0/100	8/17
	0.1	0/97	0/83	11/87	0/0	33/100	7/100	8/8	8/92	0/98	7/100
	1.0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
くれない	0	4/87	0/100	0/100	0/0	7/100	0/100	0/0	22/100	33/100	0/21
	0.1	0/84	0/93	13/87	0/0	0/100	0/67	0/0	0/83	0/100	7/13
	1.0	0/11	0/0	0/0	0/0	0/13	0/0	0/0	0/0	0/0	0/20

1) 不定芽の再分化率 (%) / 不定根の再分化率 (%)

引用文献

(1) 野菜種子生産研究会：‘ハイテクによる野菜の採種’，113-134，誠文堂新光社 (1988)。
 (2) 大越一雄：茎頂培養による分けつネギの大量増殖法，農業及び園芸，63，1，163-168 (1988)。
 (3) 折館寿朗：ネギ培養細胞からの不定胚形成と植物体再生，育種学雑誌，38，別2，32-33 (1988)。
 (4) SHAHIN, E. A., KANEKO : Somatic embryogenesis and plant regeneration from callus culture of Nonbubing Onions, *Hort Science*, 21 (2), 294

- 295 (1986).
- (5) 島田恒治, 宮崎貞巳, 田代洋丞, 新開隆博: 組織培養による倍数性育種に関する基礎的研究, (第1報) ワケギの茎頂培養産物の形態観察, 園芸学要旨, 48, 198-199 (1973).
- (6) 島田恒治, 宮崎貞巳, 田代洋丞, 新開隆博: 組織培養による倍数性育種に関する基礎的研究, (第3報) ワケギの茎頂培養産物の形態観察, 園芸学要旨, 49, 194-195 (1974).
- (7) CAMPION B., ALLONI C.: Induktion of haploid plants in vitro culture of unpollinated ovules, *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 20, 1-6 (1990).
- (8) 中島寿亀: タマネギの胚様体利用による大量増殖, 農業技術, 44, 117-121 (1987).
- (9) 中島寿亀, 桑原宏司, 田中政信: タマネギにおける胚様体形成と植物体再生, 園芸学雑誌, 58, 別2 (野菜), 232-233 (1989).
- (10) 中島寿亀, 桑原宏司, 田中政信: 胚様体, 苗状原基の利用法の開発, 胚様体利用によるタマネギの大量増殖法の開発, 佐賀県農試研法, 26, 119-132 (1989).
- (11) LU, C. C., CURRASH, L., PEFFELY, E. B.: Somatic embryogenesis and plant regeneration in diploid *Allium fistulosum* × *A. cepa* F₁ hybrid onions., *Plant Cell Reports*, 7: 696-700 (1989).
- (12) 竹中正幸, 中島哲夫, 古屋力: '植物組織培養の技術', 218-221, 朝倉書店 (1985).
- (13) PHILLIPS, G. C., LUTEIN, K. J.: Effect of picloram and other auxins on Onion tissue cultures, *J. Amer. Hort. Science*, 108 (6), 943-953 (1983).
- (14) NANDAI, S., FRIDBORING, G., ERIKSSON, T.: Effects of 6-(3-methyl-2-butenyl-ylamino purine) and cytology of root tips and callus in tissue cultures of *Allium cepa* var. *poliferum*, *Hereditas*, 85, 57-62 (1977).
- (15) 山田康之: '植物細胞培養マニュアル', 26-30 講談社 (1984).
- (16) 佐藤裕, 浦上敦子, 永井信: タマネギ葉肉プロトプラストからの不定胚形成, 育種学雑誌, 38, 別2, 30-31 (1988).
- (17) 柴岡弘郎: '現代植物生理学' 3 生長と分化, 2-11, 朝倉書店 (1990).
- (18) 高橋陽介, 長田敏行: '植物全能性の分子生物学', 脱分化の分子機構, 29-40, 朝倉書店 (1991).
- (19) 鎌田博, 原田宏: '植物遺伝情報の変換', 不定胚, 不定器官の制御, 173-210, 秀潤社 (1989).

(1991年11月30日受理)