

デルフィニューム (*Delphinium. elatum*)

の組織培養による大量増殖

第2報 不定胚誘導条件の検討

天谷正行・米内貞夫*

I 緒言

前報では、開花株を材料とした組織培養法について報告した。サイトカイニンにより不定芽を出芽させ、これを株分けにより増殖する方法では、品質の良い苗は生産できるものの、大量に増殖するには非常に手間がかかるため、より効率の良い大量増殖法の確立が望まれている。

植物の組織培養技術は1950年代に急速に発達し、Haberlandt⁵⁾が1902年に提唱した、分化全能性 (totipotency) という植物に固有の特性を証明する知見が蓄積されてきた。そして体細胞から起こる植物の再分化が、種子胚と形態的に非常に類似したステージを経ることをsteward¹⁵⁾が初めて示し、以後この形態を体細胞不定胚 (somatic embryogenesis: 以下、不定胚とする) と呼ぶようになった。遺伝子型が全く同一な個体を大量増殖することが可能であるなど、農業生産性を飛躍的に向上させる効果が期待されるため、現在までに不定胚誘導は実に様々な植物において試みられている。しかし、不定胚を誘導するための方法論を追求した報告は多いものの、その基礎原理については未だに明らかではなく、つい最近になってやっと、分子生物学的アプローチによって不定胚分化に関する遺伝子が単離され、機能解析が始まったところである^{16,20)}。また、不定胚分化に関する新たな方向性を示すものとして、Biddington³⁾はエチレン生合成阻害が不定胚誘導率を向上させる

ことを見だし、De Jong⁴⁾は不定胚分化能力の無い突然変異型のニンジンの培養細胞に、根粒菌が作り出す多糖脂質を加えることで、不定胚分化能力が復帰することを明らかにしており、今後の研究の進展が期待される場所である。

さて、不定胚誘導に供試する部位の選択は、特に開花選抜後の株を培養する場合には、次のような点を考慮しなくてはならない。すなわち1) 元株を維持しながら、2) 多量の材料を供給することが可能であることに加えて、3) 雑菌の除去が容易に行える部位であることである。大橋¹²⁾は有菌植物であるシクラメンの雌蕊から不定胚誘導に成功したが、この一連の研究の中で蓄内組織の雑菌密度が他の組織と比較して低いことを指摘している¹³⁾。このほかにも蓄内組織から不定胚を誘導した例としてはライムギ¹⁸⁾、ユーカリ¹⁹⁾、オーチャードグラス¹⁰⁾、リンドウ¹¹⁾などがあり、いずれも蓄内組織が培養に適していることを報告している。また、Hatano⁶⁾はデルフィニュームと同じキンポウゲ科のトリカブトの葯を培養し、同様に飯塚⁷⁾は雄蕊から不定胚誘導に成功している。そこで今回筆者ら¹⁾は、デルフィニューム (*D. elatum*) の無菌植物株、及び開花株組織を材料として不定胚誘導条件を検討した結果、培養植物の側根や花器組織からカルスを誘導し、不定胚を分化することに成功したので報告する。

II 無菌植物組織からの不定胚誘導

1. 目的

株分割法による継代増殖中の組織を材料とし

* 現栃木県農業大学校

た不定胚の誘導法を検討する。

2. 試験方法

1) 供試材料

デルフィニューム (*D. elatum*) の品種ブルーバードからの選抜株(BB), ブルースプリングス×ブルースプリングスの人工交雑系統から選抜した花色が淡青色の個体 (BS1) 及び花色が黄色の個体 (yd), 親品種不詳の人工交雑集団から選抜した花色が紫色で雌蕊と雄蕊が花弁化した個体 (SP1) の無菌培養植物の葉身, 葉柄, 塊根, 側根組織を供試した。

2) 材料の調製

葉身は5mm, 葉柄及び側根長は1cm, 塊根部は生長点を含めて1mm幅の切片とし, それぞれカルス誘導のための培地に置床した。

3) 不定胚誘導条件の検討

MS培地¹¹⁾の無機塩成分のうち KNO_3 , NH_4NO_3 及び KH_2PO_4 の量を1/3に減量し, ショ糖3%, ジェランガム0.25%を加えたものを基本培地とした。これに第1表に示す2,4-DとBAを組み合わせ加え, pHを5.6に調製した後, 先に調製した移植片を置床して反応を観察した。このとき培地は試験管(φ25×100mm)に10mlを分注し, 移植片をそれぞれ1個ずつ置床した。培養条件

は20℃一定の暗黒条件下で行った。

3. 結果

培養を開始してから30日後と60日後に実体顕微鏡下で観察したところ, 培養30日の時点で供試した系統の全ての組織から灰色あるいは白色のフライアブルカルスが形成された。カルスははじめは組織の切断面から分化し, 状態の良いものでは移植片全体がカルス化した。さらに培養60日目にはBBでは葉身, 塊根, 側根から不定胚が観察された。また, BS1とydでは置床した全ての部位から不定胚形成が観察されたが, 特にydの側根の反応がよく, 置床数の85%以上が不定胚を分化した。これらの不定胚は乳白色の粒状をしており, おもにカルスの表面に形成されていた(写真1)。径約1mmの不定胚を1/3MS(KNO_3 , NH_4NO_3 及び KH_2PO_4 の量を1/3に減量し, ショ糖3%, ジェランガム0.25%を加え, pH5.6に調製)に移したところ, 種子の発芽と同様の形態を示し, 極性を有することが明らかとなった(写真2)。しかし, 側根由来の不定胚からは低頻度ながら正常な生育を示す発芽個体が得られたが, ほとんどは水浸状かあるいは2次胚を分化しながら奇形となった(写真3)。これに対し, BS2からは不定胚は形成されなかった。

第1表 無菌植物体の部位毎のカルス形成及び不定胚誘導結果

品種・系統名	基本培地調製	葉身				葉柄				塊根				側根					
		2,4-D	BA	外植	カルス化数	外植	カルス化数	外植	カルス化数	外植	カルス化数	外植	カルス化数	外植	カルス化数				
		(ppm)	(ppm)	片数	30日目	30日目	60日目	片数	30日目	30日目	60日目	片数	30日目	30日目	60日目	片数	30日目	30日目	60日目
	1/3MS,SUC3%	0.5	0									11	6	0	0				
ブルーバード	gellangum0.25%	0.5	1.0									13	9	2	0				
(BB)	pH5.6	1.0	0.1	14	14	0	2	11	11	0	0	24	23	2	8	15	15	0	6
		1.0	1.0									10	10	0	2				
		0.1	0.1	10	0	0	0	10	0	0	0	10	8	0	0	10	7	0	0
ブルースプリングス		0.1	1.0	10	0	0	0	10	0	0	0	10	10	0	0	10	8	0	0
×	//	0.5	0.1	10	10	0	0	10	8	0	2	10	3	0	0	10	9	0	0
ブルースプリングス		0.5	1.0	10	8	0	0	10	9	0	0	10	5	0	2	10	2	0	0
(BS1)		1.0	0.1	10	9	0	1	10	10	0	0	10	9	0	0	10	10	0	0
		1.0	1.0	10	9	0	2	10	10	0	3	10	10	0	0	10	10	0	1
交配不詳 (SP)	//	1.0	0.1	9	8	0	0	27	20	0	0	11	10	0	0	41	38	0	0
ブルースプリングス																			
× (yd)	//	1.0	0.1	7	7	0	5	11	1	0	0					20	20	7	17
ブルースプリングス		1.0	1.0	9	7	0	3	11	10	0	3					21	21	10	19

また、不定胚誘導には2,4-D 1.0ppmとBA0.1または1.0ppmを組み合わせた培地が適していた(第1表)。

Ⅲ 開花株の花器組織からの不定胚誘導

1. 目的

開花株の花器組織を用いた不定胚誘導方法を検討する。

2. 試験方法

1) 供試材料

組織培養により増殖したBB, BS 1, ydの開花株から花蕾を採取し、試験に供試した。BB及びBS 1の花蕾は0.6~1.2cmの範囲にあるものを用い、大きさによって3段階に分けた。ydの花蕾は1.0~3.0cmの範囲にあるものを用い、同様に4段階に分けた。

2) 材料の調製

花蕾を70%エタノールで10秒間の表面殺菌し、滅菌水で洗浄した後、花弁、雌蕊、葯及び花糸を摘出して移植片とし、第2表に示した培地に置床した。ydの葯については花糸と分離せず雄蕊として供試した。

3) 花器組織からの不定胚誘導条件の検討

(1) MS培地の無機塩を1/3に減量した基本培地(Ⅲ-3)参照)に第2表に示す2,4-DとBAを組み合わせる加え、pHを5.6に調製した後、移植片を置床して反応を観察した。培地は試験管(φ25×100mm)に10mlを分注し、雌蕊及び花弁は1個を置床した。また、葯及び花糸は5~6本ずつ置床した。このとき各移植片は、それを採取した蕾の大きさごとに区別した。培養条件は20℃一定の暗黒条件下で行い、30日目に調査を行った。

(2) ydの雄蕊は採取した蕾の大きさごとに区別し、第3表に示した48種類の培地に4本ずつ置床した。培地は試験管(φ25×100mm)に10mlを分注したものを用い、培養条件は20℃、

2200ルクス一定の明条件下で80日間行った。

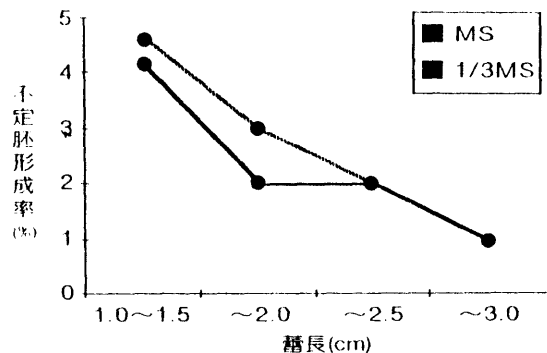
3. 結果

1) 雌蕊からは培養30日の時点でカルスの表面に不定胚を確認することができた(写真4)。花弁においても同様に不定胚が誘導できたが、効率はやや低かった。また、雌蕊からの不定胚誘導率は蕾長と関係があり、今回採取した蕾長の範囲では、蕾長が小さい程不定胚誘導率は高い傾向が認められた(第1図)。しかし、30日という短期間の培養であったため、カルスの生育はあまり旺盛ではなく、得られた不定胚の数も1つの置床片から2~5個程度であった。供試した3系統のうち、ydはカルスの生育が最も旺盛であった。

培地は基本培地に2,4-D 0.5か1.0ppmとBA0.1か1.0ppmを組み合わせた区が適していた(第2表)。

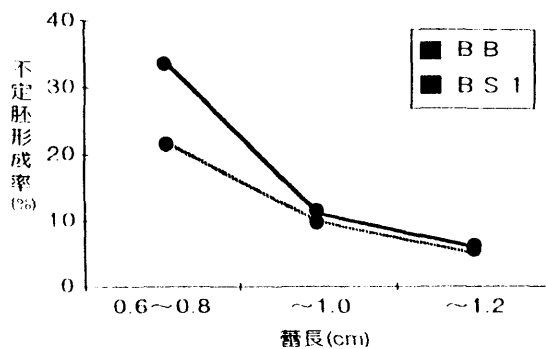
花糸も非常に容易にカルスを形成した。また葯を培養しても、結局カルス化するのは花糸との接合部であった(写真5)。しかし、これらの雄蕊組織培養から不定胚が得られたのはBS 1のみで、最も高い分化率を示した区でも2.9%と極めて低いものであった。花器組織の培養は、概してⅡ章で述べた黒褐色物質の分泌が少ないため、長期間の培養が可能であると思われた。

2) 系統ydの雄蕊を培養したところ、先に述べた系統BBや、BS 1のとくと同様にカルス形成は花糸自体か、あるいは花糸と葯との接合部位



第1図 雌蕊からの不定胚形成と蕾長との関係

から起こるものがほとんどであった。また不定胚分化率の最も高い区では25%にも達し、BS 1の8.6倍であった。培養80日目にはクリーム色のやや堅いカルスが形成されており、表層には表面が滑らかな白色の球状やカップ状をした不定胚が発達して(写真6)、中には既に緑色シュートを伸長しているものもあった。また、培地はやや黄色に変化しているものの透明であり、BBやBS 1の培養時にみられた黒褐色物質の分泌は認められなかった。球状胚を1/3MS(KNO₃,



第2図 ydの雌蕊培養における不定胚形成の蕾長との関係

第2表 花器組織培養によるカルス形成及び不定胚誘導結果

品種・系統名	基本培地組成	花 弁				雌 薬				花 糸					
		2,4-D (ppm)	BA (ppm)	外糖 片数	カルス化数	不定胚形成数	外糖 片数	カルス化数	不定胚形成数	外糖 片数	カルス化数	不定胚形成数	外糖 片数	カルス化数	不定胚形成数
フレスプリングス × gellanum0.25%	1/3MS.SUC3%	0.5	0.0	5	0	0	1	1	1						
	pH5.6	1.0	0.1	5	0	0	1	1	1						
(yd)	1.0	1.0	4	3	2	1	1	1							
	0.1	0.1	33	0	0	21	5	0	141	0	0	135	0	0	
アムバード (BB)	0.1	1.0	32	0	0	26	6	0	149	0	0	141	0	0	
	0.5	0.1	39	9	0	29	15	6	166	1	0	158	31	0	
	0.5	1.0	35	16	4	28	20	9	169	0	0	151	56	0	
	1.0	0.1	34	13	0	26	11	4	166	2	0	151	79	0	
	1.0	1.0	24	10	1	18	10	3	106	1	0	96	64	0	
	0.1	0.1	19	0	0	25	5	0	125	0	0	105	14	0	
フレスプリングス × //	0.1	1.0	20	2	0	24	9	0	125	0	0	103	22	0	
	0.5	0.1	22	3	0	30	12	4	115	10	0	91	60	0	
フレスプリングス (BS 1)	0.5	1.0	18	5	2	28	13	6	124	13	0	105	66	3	
	1.0	0.1	17	7	1	25	15	4	131	7	0	104	69	1	
	1.0	1.0	16	7	0	27	13	5	117	19	1	104	68	0	

第3表 系統ydの雌蕊培養におけるカルス化及び不定胚形成

基本培地組成	2,4-D ppm	BA ppm	SUC %	外糖 片数	カルス化数	不定胚形成数	基本培地組成	2,4-D ppm	BA ppm	SUC %	外糖 片数	カルス化数	不定胚形成数
MS	1	0	3	16	1	0	1/3MS	1	0	3	16	0	0
			6	16	0	0				6	16	0	0
			9	16	0	0				9	16	1	0
		3	16	1	1	3			16	2	1		
		0.01	6	16	0	0			0.01	6	16	0	0
		9	16	4	2	9			16	1	0		
	2	0.1	3	16	3	2		2	0.1	3	16	6	3
			6	16	4	1				6	16	3	1
			9	16	0	0				9	16	1	1
		3	16	5	4	3			16	7	3		
		1.0	6	16	2	1			1.0	6	16	4	1
		9	16	3	2	9			16	2	0		
2	0	3	16	1	0	2	0	3	16	2	1		
		6	16	0	0			6	16	0	0		
		9	16	0	0			9	16	1	0		
	3	16	4	1	3		16	3	0				
	0.01	6	16	2	0		0.01	6	16	4	1		
	9	16	1	1	9		16	1	0				
2	0.1	3	16	5	0	2	0.1	3	16	6	2		
		6	16	2	2			6	16	3	0		
		9	16	1	0			9	16	2	0		
	3	16	4	2	3		16	5	1				
	1.0	6	16	2	0		1.0	6	16	3	0		
	9	16	2	1	9		16	2	1				

注 基本培地はgellanum0.25%を含み、pH5.6に調整

NH_4NO_3 及び KH_2PO_4 の量を 1/3 に減量し、シヨ糖 3%，ジェランガム 0.25% を加え、pH 5.6 に調整) に移植したところ 3 日後には伸長してやがて極性を分化しながら発芽した。しかし、正常に生育するものは少なく、水浸状になるか奇形となった。

培地の違いと培養の状況を見ると、カルス形成はオーキシンとサイトカイニンを併用した培地区が良好であり、シヨ糖濃度が 9% の培地区ではこれを抑制することがわかった。また、基本培地の塩濃度の差は、カルス形成と不定胚誘導には影響しなかった(第 3 表)。蕾長と不定胚誘導率との関係は、採取した蕾が小さい程誘導率は高い傾向にあることがわかった(第 2 図)。

IV 総合考察

前報でも報告した、培養時に起こる褐色物質の分泌は、塊根や側根をはじめ葉身や葉柄など地上部の組織を培養しても顕著に認められたことから、これらの組織を長期間培養することは困難であると思われた。

雌蕊や花卉では基部側からカルス形成が認められ(写真 7)、雄蕊では特に花糸が反応したことから、花床部には培養に適した不定胚分化能に富んだ組織が存在していることが示唆された。加えて、移植片が大量に得られるということ、比較的雑菌の密度が低いという点でも蕾内の組織は培養部位に適するものであると考えられた。また、今回の葯あるいは雄蕊培養によって得られた不定胚は、供試した蕾の大きさから推定される花粉のステージと、カルス形成の起こる部位から判断して、体細胞由来である可能性が極めて高いと考えられる。

今回の試験結果の中で不定胚誘導に関して品種・系統間差異が認められたが、これについては飯塚⁸⁾も指摘している。カルス増殖や不定胚形成率の最も高かった系統 yd が他の品種・系統と比較して特徴的であったことは、先述した黒

褐色物質の分泌が極めて少ないということである。このことから黒褐色物質の分泌と不定胚形成には何らかの関係があるものと推定された。黒褐色化を軽減させるためには、フェノール化合物の抗酸化剤を培地に添加することや、活性炭のような多孔質物質によって分泌物を吸着させることが有効である。そこで今後はポリビニルピロリドンや活性炭の培地への添加を検討しているところである。

また、今後検討すべき結果として移植組織を採取する蕾の大きさが不定胚誘導率と関係があったことがあげられる。実際に、供試した蕾の最小区と最大区では雌蕊で 4~6 倍、雄蕊で 4 倍もの差がみられた。これと同様のことは既に知られており、Konar ら⁹⁾ はキンボウゲ科のタガラシを材料として、花器組織が分化したばかりの蕾が培養に適していると報告し、Vazquez ら¹⁸⁾ はライ麦の花穂を培養して不定胚の誘導を行い、蕾の長さが 20mm 以上になると、不定胚分化能が極端に低下することを報告している。また、Pierik ら¹⁴⁾ はペゴニアの各花器組織を培養して不定芽の誘導を行った際に、やはり移植片組織を採取した蕾の大きさと不定芽分化頻度には関係があることを指摘している。組織分化の途上にあつて、しかも細胞分裂が活発な状態が培養には適していると考えられるので、培養適性が花芽分化のステージとどのような関係にあるのかを調べることは、安定した不定胚誘導を行うためにも必要であると思われる。

不定胚による大量増殖は、株分割に比べて培養にかかる労力と培養面積を大幅に削減できるが、一方で同調培養が難しいことや、高次胚分化を利用して増殖を行うため、突然変異が一度生じると被害が迅速に拡大してしまう危険が指摘されている。また、前述したような品種間差異の問題も残されており、供試株すべてを培養できるまでにはまだ相当な時間がかかるものと思われる。このように実用化までには解決しな

ければならない問題は山積しているが、今後はさらに多くの品種・系統を供試することで、品種間差異の根本的な要因を明らかにしていかなければならない。

V 摘要

1. 無菌植物体の組織を培養したところ、不定胚誘導には品種・系統間で差異が認められたが、系統ydのように非常に培養しやすいものでは供試した部位全てを利用することが可能であることがわかった。特に側根の反応がよく、培養60日後には置床数の85%以上から不定胚の分化が確認された。

2. 花器組織を培養したところ、雌蕊の基部から形成したカルスは、高い不定胚分化能力を有することが明らかとなった。また、不定胚分化の頻度は供試する蕾のステージと関係しており、蕾長0.6~0.8mmのものが高い分化率を示した。

3. 系統ydの雄蕊を培養したところ、カルスは花糸と葯の境界部分から形成することが多かった。不定胚分化率は、雄蕊を採取した蕾長が小さい区程高い傾向にあった。

謝辞

本研究を行うにあたり、農業試験場生物工学部及び、花き部の方々に有益な御助言を賜った。ここに記して厚く感謝する次第である。

VI 引用文献

1. 天谷正行・米内貞夫(1991)：育雑 第41巻別 2:288-289.
2. _____・岡部陽一・米内貞夫(1992)：栃木農試研報 39:43-52
3. Biddington, N. L., H. L. Robinson (1991)：Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 25:169-177
4. De Jong, A. J. et al(1993)：Plant Cell, 5:615-620.
5. Harberlandt, G. (1902)：Akad. Wiss. Wien., Math. Nat. Class III, Abt. 1: 69-92
6. Hatano, K., Y. Shoyama & I. Nishioka (1987)：Plant Cell Rep. 6:446-448.
7. 飯塚正英等 (1991)：園学雑 60 別1：452-453.
8. 飯塚正英 (1991)：園学雑 60別2：500-501.
9. Konar, R. N., K. Nataraja. (1965)：Phytomorphology. June:132-137.
10. Longstad, D. D & B. V. Conger(1986)：Amer. J. Bot. 73:989-992.
11. Murashige, T., Skoog, F. (1962)：Physiologic. Plant. 15:473.
12. 大橋一夫・峯岸長利・米内貞夫(1992)：栃木農試研報 39:53-56.
13. _____・和久井隆・_____ (1992)：栃木農試研報 39:57-74.
14. Pierik, R. L. M., F. A. A. Tetteroo (1987)：Plant Cell, Tissue and Organ Culture 10:135-142.
15. Steward, F. C., Mapes, M. O. & Mears, K. (1958)：Amer. J. Bot. 45:705-708.
16. Sterk, P. et al(1991)：Plant Cell, 3:907-921.
17. 田平弘基(1991)：育雑 41別2:280-281.
18. Vazquez, A. M. et al(1991)：Plant Cell Rep. 10:265-268.
19. Warrag, E., M. S. Lesney & D. J. Rockwood. (1991)：Plant Cell Rep. 9: 586-589.
20. Zimmerman, J. L. (1993)：Plant Cell, 5:1411-1423.

In vitro propagation of *Delphinium* (*Delphinium elatum* L.) by tissue culture

2. Efficient culture conditions inducing somatic embryogenesis

Masayuki AMAGAI and Sadao YONAI

Summary

Four strains of *Delphinium* (BS1, BB, SP1, yd) were used to determine the culture condition for somatic embryogenesis. Leaf blades, petioles, tuberous roots and secondary roots were isolated as the explants from the cultured plants. And also, pistils, stamen and petals were isolated from the flower buds.

The efficient culture conditions were obtained, when the explants were incubated in a dark condition at 20 °C for 60 days on the modified MS medium, in which KNO_3 , NH_4NO_3 and KH_2PO_4 was decreased to 1/3 of original concentration, 1ppm 2,4-D, 1ppm benzyladenin, 3% sucrose and 0.25% gellan gum were added, at pH 5.6. All of the tissues of a strain, yd, which shows a remarkable ease of *in vitro* tissue culture, were applied to somatic embryogenesis. The induction rate of somatic embryoids differed with each strains and tissues. The secondary roots of a strain, yd, showed the highest frequency of somatic embryogenesis, and its induction rate was approximately 85%.

In the culture of flower buds, embryonic callus and globular embryos were differentiated from the bottom part of pistil and the gap between the filament of stamen and anther. In this case, the potency of somatic embryo differentiation was related to length of the flower buds, and the frequency of the short flower bud (6 to 8mm) was four times as high as that of the long flower bud (10 to 12mm).

[Bull. Tochigi Agr. Exp.
Stn. No.42 : 45~52 (1994)]

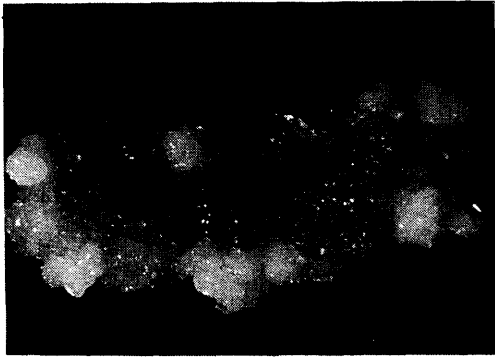


写真1 側根のカルスと不定胚分化の様子

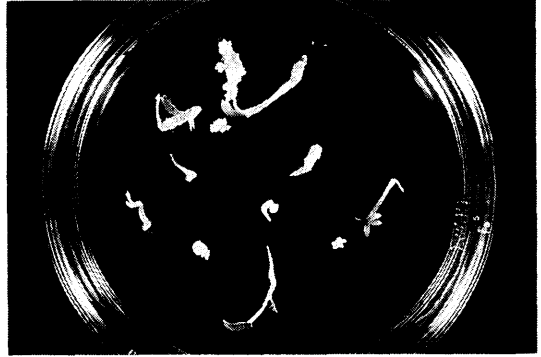


写真3 不定胚の発芽状況

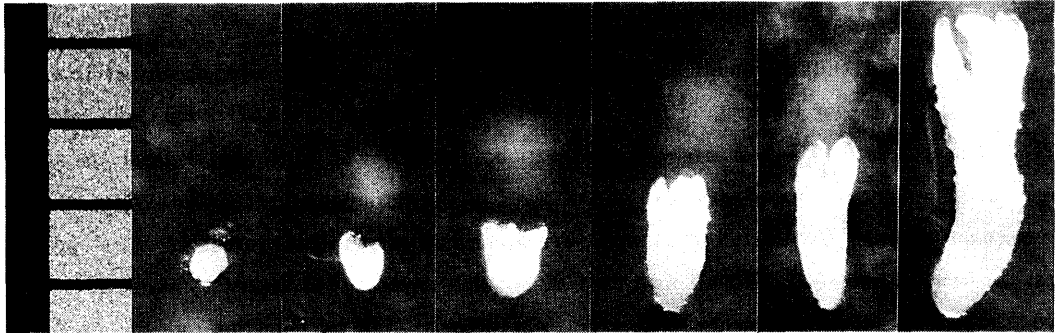


写真2 不定胚の生育の様子 (目盛は1mmを表わす)

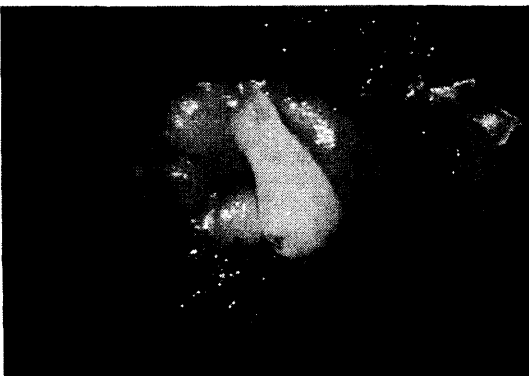


写真4 雌蕊基部からの不定胚



写真5 葯と花糸の境界部のカルス形成

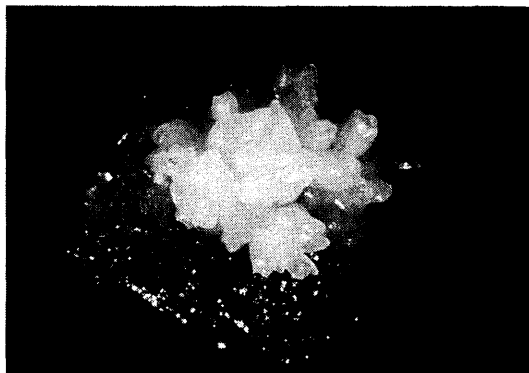


写真6 葯由来カルスの不定胚の様子

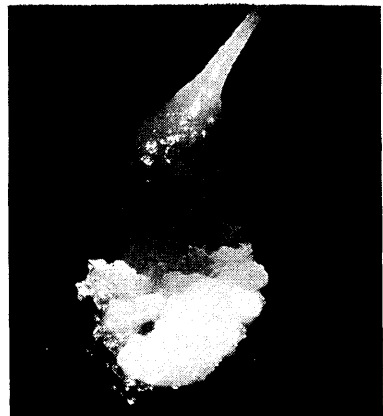


写真7 雌蕊の基部がカルス化した様子