そ菜類の発育・生長に関する生理形態学的研究 (第3報)

レタスはい軸カルスの不定芽形成について

佐々木 久 視

(北海道教育大学旭川分校農学研究室)

Physiological and Morphological Studies on Development of Vegetable Crops

III. Adventitious Bud Formation of Callus Tissues derived from Lettuce Hypocotyl

Hisami SASAKI

*Agricultural Laboratory, Asahikawa Branch, Hokkaido
University of Education, Asahikawa*

Summary

Callus tissues derived from hypocotyl of lettuce seedlings (*Lactuca sativa* L. cv. Waya head) were cultured on a synthetic medium with the objective of obtaining the most favorable condition for their organ differentiation. The obtained results are summarized as follows:

1. The formation of adventitious buds on the callus tissue was markedly enhanced by culturing on the medium containing relatively lower concentration of 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid: 0.01 mg/l plus relatively higher concentration of KIN (kinetin: 0.5 mg/l), whereas the formation of adventitious roots was rarely observed.

2. The cell suspensions which had been prepared by means of passing through 50- and 100-mesh stainless steel sieves consisted of aggregated cells and large vacuolated cells. In the liquid culture of this suspension, it produced the numerous cell clumps on the medium containing 2,4-D 0.01 mg/l plus KIN 0.05 mg/l at the 3rd week. Shoots and leaves were produced from the cell clumps during additional 2nd week with KIN 0.1 mg/l alone under continuous illumination.

3. When the hypocotyl segments of lettuce seedlings, which had been previously subcultured for a week on the medium being supplemented with 2,4-D (0.1 mg/l) plus KIN (0.1 mg/l), were transferred to the medium with KIN (0.1 mg/l) alone, it resulted in inciting shoot formation on the cultured tissues. On the contrary, it was beneficial for maintenance of callus proliferation for additional five weeks without shifting their growth pattern, when the hypocotyl inocula were transferred to the medium devoid of KIN after one week's preculture.

4. Within six days after explanting onto the suitable medium for callus growth, the cultured hypocotyl tissues started to differentiate into proembryo-like bodies.

Microscopic observation showed that preferential cell division was restricted to distribute the zone near epidermis and vascular tissues of the hypocotyls.

5. From an inspection of the present data, therefore, it will be assumed that a differentiation of proembryo-like body is considered to be a consequence of predisposing factors occurred in the initial culture of lettuce hypocotyl growing on the medium at the appropriate concentrations of 2,4-D and KIN, which factors may be associated with difference of totipotency in the inocula composed of various kind of tissues. Whereby KIN seems to contribute the achievement of bud formation.

緒 言

レタス植物から分離した子葉、根およびはい軸などの組織片を適当な条件下で培養することにより、不定芽や不定根を形成することはすでに明らかにされている(1, 9). また、はい軸組織は Kinetin(KIN)と 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) を組み合わせた White 改良培地において良好なカルス形成がみられ、このカルスの生長は適当な濃度の蔗糖、カゼイン加水分解物、ビタミンなどの添加により促進された(9). 一方、培養組織から得たカルスは適当な培養条件下で器官を再分化することが知られている(3,7,8,10,12). 本研究はレタスはい軸組織から得たカルス組織の器官形成ならびにその不定芽形成過程に関して検討した.

実験材料および方法

培養材料としてレタスのワイヤヘッド品種 (*Lactuca sativa* L. cv. Waya head) を用い、前報(9)に準じ 9 日間暗所で生育させたためばえのはい軸部を培養に供した.

このはい軸組織を KIN (0.1 mg/l)+2,4-D (0.1 mg/l) 添加の White 寒天培地 (以下、カルス形成培地と呼ぶ) で 6 週間培養し、これより得たカルスを生重約 200 mg の組織片として切り採り、各コルベン当り 4 個体ずつ移植し、器官分化の実験に用いた. なお、器官分化の試験培地として KIN 0, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 および 5.0 mg/l と 2,4-D 0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 および 1.0 mg/l 濃度を組み合わせた合計 36 区を用意し、各区 12 個体のカルス組織を用いた.

次にカルス組織を滅菌水に懸濁し、50 および 100 メッシュの金属性フィルターで細胞ならびに細胞塊に分別し、2,4-D 0.01 mg/l と KIN 0, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 および 5.0 mg/l を含む White 液体培地 10 ml に約 150 ~ 300 μ の大きさを持つ細胞懸濁液 (約 1.2×10^6 Cells/ml) を 1 ml ずつおのおの添加し、振とう培養 (70 回/分) に供した.

さらに器官形成に伴う組織の形態的観察は培養組織を FAA 固定液で処理し、脱水後、パラフィン切片 (10 μ) とし、サフラン・ファストグリーンで 2 重染色して行なった.

実験結果および考察

1. カルス組織の器官分化

はい軸組織から得たカルスを分化用培地に移植し 5 週間培養した結果は第 1 表のとおりである. 不定芽(茎葉)の形成は KIN 単独区においてもみられたが、とくに 2,4-D 0.01 mg/l+KIN 0.5 mg/l 区でその最も高い形成率

を示した. このようなカルス組織における器官の再分化はオーキシンとサイトカイニン濃度の相互関係で生じており(10,12), 本実験においても不定芽の形成はオーキ

Table 1. Effect of various concentrations of 2,4-D in combination with KIN on the organ formation of callus tissues* (5 week-old cultures).

Concentration (mg/l)		Organ formation (%)	
2,4-D	KIN	Shoot	Root
0	0	9.0	18.0
0	0.05	41.6	16.7
0	0.1	41.6	8.3
0	0.5	41.6	8.3
0	1.0	41.6	8.3
0	5.0	16.7	0
0.01	0	33.3	16.7
0.01	0.05	33.3	16.7
0.01	0.1	66.7	0
0.01	0.5	75.0	0
0.01	1.0	41.6	0
0.01	5.0	41.6	0
0.05	0	8.3	0
0.05	0.05	0	0
0.05	0.1	0	0
0.05	0.5	16.7	0
0.05	1.0	16.7	0
0.05	5.0	16.7	0
0.1	0	0	0
0.1	0.05	0	0
0.1	0.1	0	0
0.1	0.5	8.3	0
0.1	1.0	16.7	0
0.1	5.0	0	0
0.5	0	0	0
0.5	0.05	0	0
0.5	0.1	0	0
0.5	0.5	0	0
0.5	1.0	0	0
0.5	5.0	0	0
1.0	0	0	0
1.0	0.05	0	0
1.0	0.1	0	0
1.0	0.5	0	0
1.0	1.0	0	0
1.0	5.0	0	0

* Explants were obtained from lettuce hypocotyl segments. Each of them was cultured on the medium with 0.1 mg/l each of 2,4-D and KIN for six weeks.

Fig.1 Lettuce seedling developed from the adventitious buds of the callus cultured under continuous illumination.

シン濃度に対し、サイトカイニン濃度が高い場合にみられた。しかし、2,4-D 濃度が 0.5 mg/l 以上の区では KIN の高濃度にもかかわらずその形成は阻害され、カルスの形成のみがみられた。一方、不定根形成ではこのように明確な関連はみられなかった。同様な事実は Engvild(3) も認めている。

このようなカルス組織から分化した不定芽を連続照明下 (約 4,000 Lux) で培養すると、その茎部はやや徒長したが、ほぼ正常なレタス幼植物を得ることが出来た (第1図)。

2. カルス細胞の振とう培養

培養に供したはい軸組織は内部形態的に表皮、皮層ならびに維管束などを含む組織より成る。したがって、カルス形成培地における細胞の増殖には Gautheret(3) ものべているように組織部位による不均一性がみられ、そのカルス表面の形状も均質でなかった。そのためこのカルス組織を滅菌水に懸濁し、金属性フィルターで約 150 ~ 300 μ の大きさをもつ数個より 10 個程度の細胞群または肥大細胞を含む懸濁液をえた (第2図)。この細胞懸濁液を3週間振とう培養した結果、第2表に示すとおり、2,4-D 0.01 mg/l KIN 0.05 mg/l 区で最も多数の細胞塊を生じた。引き続きこの細胞塊のうち、直径 2 mm 程度のものを 1. 2,4-D (0.1 mg/l), 2. KIN (0.1 mg/l), 3. 2,4-D+KIN (各 0.1 mg/l) の培地に移植し、

Fig.2. Cell suspension consisted of aggregated or large vacuolated cells were used to inoculate liquid cultures.

Table 2. Formation of clumps obtained from cell suspension cultures.

KIN (mg/l)	Number of cell clumps
0	3
0.05	62
0.1	51
0.5	9
1.0	6
5.0	0

Fig.3. Shoot developed from the small cell clump on the KIN medium at the 2nd week after transference under continuous illumination.

連続照明下で培養した結果、約2週間後に KIN 培地でのみ茎葉の分化がみられた (第3図)。

これは *Convolvulus* のカルス細胞から生じた細胞群が IAA+KIN 培地で不定芽を形成した結果(2)と同様であつた。しかしながら本実験では他の植物にみられるような embryoid の形成(6,7,11)は認められなかった。

3. 分化培地移植前のレタスはい軸組織に与えた 2,4-D と KIN の作用

レタスはい軸組織を第3表に示すように 2,4-D (0.1 mg/l), KIN (0.1 mg/l) ならびに 2,4-D+KIN (各 0.1 mg/l) の各培地でまず1週間培養し、それらを各々4区に分け、培地を更新してさらに4週間培養後の器官形成について調べた。その結果、最初の1週間に与えられた培養環境はその後の器官形成に重要な影響を及ぼした。すなわち、2,4-D 培地で1週間培養後、基本培地に移植すると不定根形成が促進されるのに対し、2,4-D+KIN 培地で培養後、KIN 培地に移植した場合、不定芽の形成がみられた (第4図)。

また、初期に KIN 培地で培養後、さらに KIN 培地に移植した場合には全く器官分化は認められなかった。他方、移植後の培地における 2,4-D や KIN も器官形成に重要な意味をもち、不定根は基本培地への移植で多くみられ、不定芽は KIN 培地への移植により促進された。しかし、2,4-D や 2,4-D+KIN 移植培地では器官の形成はみられなかった (第3表)。

これらの事実は第1表の結果と考えると、6週間のカルス培養中、初期の1週間以内に不定芽の分化能力ができると考えられ、これがその後移植培地に置かれ

Table 3. Effect of transference of the 2,4-D or KIN precultured tissues to the medium with several concentration of 2,4-D and KIN on the organ formation (5 week-old cultures).

Culture periods (weeks)						Shoot formation (%)	Root formation (%)	Fresh Wt. (mg/tissue)
0	1	2	3	4	5			
						0	50	29.8
						0	0	45.3
						0	0	14.1
						0	0	138.6
						0	9.1	7.3
						0	0	38.5
						0	0	15.5
						0	0	182.0
						16.9	9.1	68.2
						0	0	306.3
						58.3	0	184.9
						0	0	420.7

Black bars indicate the period of culture with 2,4-D (0.1 mg/l) plus KIN (0.1 mg/l), dripping bars indicate ones with 2,4-D, hatched bars indicate with KIN alone and white bars indicate ones without growth substance.

Fig.4. Differences in morphogenesis of the cultured lettuce hypocotyl tissues in vitro. Tissues precultured on the medium containing 2,4-D plus KIN and transferred to the same medium (left) or KIN medium (right).

ると不定芽組織を形成するものと思われる。また、このはい軸組織に与えた初期培養期間を1週間より2日、4日および6日に短縮し、KIN 培地に移植した(第4表)。

培養2日目では組織の形態的变化は認められず、4日目では著しい変化はないが組織の表面がやや膨潤し、皮層部がはく離しやすくなった。これらの2日あるいは4日の初期培養では器官の再分化はなかつたが、6日間培養した組織では表皮ならびに皮層部が膨潤し、表皮組織付近に proembryo 状の構造体が観察された(第5図)。この構造体はニンジンのはい軸組織でみられたもの(5)ときわめて類似している。またその発生部位は組織により異なり、パセリのカルス組織では初期に分化した根の皮層部から生じ(11)、ニンジン(5)および *Ranunculus*(6)は表皮細胞より生じた。しかし、これとは別に KIN 培

Table 4. Effect of length of preculture period with 2,4-D plus KIN medium on the shoot formation (4 week-old cultures).

Cultures		shoot formation (%)
Duration of inoculation (days)		
		0
		0
		6.4
		53.0

Black bars indicate the period of preculture with 2,4-D (0.1 mg/l) plus KIN (0.1 mg/l) and hatched bars indicate ones cultured subsequently with KIN alone.

地への移植後、1~2 週間で不定芽の分化が認められ、

Fig. 5. The tissues started to differentiate into proembryo-like bodies at 6 days after explanting on the suitable medium for callus growth, containing of 2,4-D plus KIN. Arrow indicates the proembryo-like body.

Fig. 6. Crosssection of tissue cultured on the medium containing 2,4-D plus KIN for 7 days after inoculation. Meristematic cell groups are preferentially located in the vascular system and along the outer periphery of tissues.

同時に全体的に組織のカルス化も進展し、この proembryo の個体形成はみられなかった。

これらの点をさらに形態的に明らかにするためパラフィン切片による観察を行なった。その結果、はい軸組織を 2,4-D+KIN 培地に 1 週間置くと第 6 図にみられるように表皮および維管束付近に新たな分裂帯が認められ、これらは組織片の両端部に多くみられた。また、proembryo 状の形態は不明確であったが、表皮より由来する分裂帯部位に相当するものと思われる。この初期 1 週間の培養後、直ちに KIN 培地に移植すると 2 週間目ですでに表皮あるいは皮層部の分裂帯に特に分裂活性の増加した部分が不規則に生じ、不定芽の形成がみられた (第 7 図)。これに対し、2,4-D+KIN 培地に移植した場合はカルスの形成がみられ、カルス内部には周囲の

Fig. 7. Differentiations of peripheral meristem and shoot apex on the cultured tissues. Tissues precultured on the medium containing 2,4-D plus KIN and transferred to the KIN medium.

Fig. 8. Tracheid-like elements scattered in the callus on the medium containing 2,4-D plus KIN at the 5th week after inoculation.

組織細胞よりち密な細胞塊がみられた。このカルス中には仮導管状の構造もみられた (第 8 図)。

一方、*Tylophora* ではカルスの表面に茎葉を分化し (7) またイネのカルスでは培地に接した表層部に散発的に茎葉を分化する (8)。本実験においてもカルスの表層部より不定芽の形成が認められた。

以上の結果より総合考察すると、レタスはい軸組織は 2,4-D+KIN (カルス形成) 培地で少なくとも 6 日間培養することにより proembryo 状の構造体を形成し、その後 KIN 培地に置かれることにより不定芽組織を形成するものと思われる。しかし、引き続きカルス形成培地に移植すると組織のカルス化が著しく進むとともに、この proembryo 状の構造体は増殖し細胞塊としてカルス中に散在するものと思われる。また、この細胞塊は適当な分化条件下では不定芽を形成する能力を有するものと考えられる。

摘 要

レタス (*Lactuca sativa* L. cv. Waya head) のはい軸組織に由来するカルスの器官分化について調べ、以下に示す結果を得た。

1. レタスのカルス組織における不定芽形成は低濃度の 2, 4-D (0.01 mg/l) とやや高濃度の KIN (0.5 mg/l) 培地で著しく促進された。

2. カルス組織より得た細胞懸濁液(約 1.2×10^5 cells/ml) を振とう培養すると、2, 4-D 0.01 mg/l + KIN 0.05 mg/l 培地で多数の細胞塊を生じた。この細胞塊は KIN (0.1 mg/l) 培地上で茎葉を分化した。

3. はい軸組織を 2, 4-D (0.1 mg/l) + KIN (0.1 mg/l) のカルス形成培地で 1 週間培養したのち、KIN (0.1 mg/l) 培地に移植すると不定芽を形成した。しかしながら、同じカルス形成培地に引き続き移植した場合にはおう盛なカルス形成が進展した。

4. はい軸組織は少なくとも 6 日間カルス形成培地に置くことにより proembryo 状の構造体を形成し、表皮あるいは維管束付近に新たな細胞分裂帯を生じた。

5. 以上の結果から、レタスのはい軸組織は 2, 4-D + KIN 培地で proembryo 状の構造体を生じ、その後 KIN 培地に置かれることにより不定芽を形成するものと思われる。

これに対し、同じカルス形成培地への移植では組織のカルス化が進むとともに、この proembryo 状の構造体は増殖し細胞塊としてカルス中に散在するものと思われる。

謝 辞 本研究を行なうにあたり御懇篤な御指導ならびに御助言を賜った北海道大学農学部岡沢養三教授に対し、深く感謝の意を表する。

引用文献

- 1) DOERSCHUG, M. R., and C. O. MILLER. 1967. Chemical control of adventitious organ formation in *Lactuca sativa* explants. Amer. J. Bot. 54 : 410—413.
- 2) EARLE, E. D., and J. G. TORREY. 1965. Morphogenesis in cell colonies grown from *Convolvulus* cell suspensions plated on synthetic media.

- Amer. J. Bot. 52 : 891—899.
3. ENGILD, K. C. 1973. Shoot differentiation in callus cultures of *Datura innoxia*. Physiol. Plant. 28 : 155—159.
4. GAUTHERET, R. J. 1957. Histogenesis in plant tissue cultures. Jour. Nat. Cancer Inst. 19 : 555—573.
5. KATO, H. 1968. The serial observations of the adventive embryogenesis in the micro-culture of carrot tissue. Sci. Pap. Coll. Gen. Educ., Univ. Tokyo. 18 : 191—197.
6. KONAR, R. N., and K. NATARAJA. 1965. Experimental studies in *Ranunculus sceleratus* L. development of embryos from the stem epidermis. Phytomorphol. 15 : 132—137.
7. RAO, P. S., S. NARAYANASWAMY, and B. D. BENUAMIN. 1970. Differentiation *ex ovulo* of embryos and plantlets in stem tissue cultures of *Tylophora indica*. Physiol. Plant. 23 : 140—144.
8. 坂 齊・前田英三. 1974. イネカルスの再分化に伴う 2, 3 の加水分解酵素の変動. 日作紀. 43 : 207—218.
9. 佐々木久視. 1974. そ菜類の発育生長に関する生理・形態学的研究（第2報）レタスの組織培養における器官形成について. 北海道教育大学紀要. 25(1) : 17—27.
10. SKOOG, F., and C. O. MILLER. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. Symp. Soc. Exp. Biol. II : 118—131.
11. VASIL, I. K., and A. C. HILDEBRANDT. 1966. Variations of morphogenetic behavior in plant tissue cultures II. *Petroselinum hortense*. Amer. J. Bot. 53 : 869—874.
12. VASIL, V., and ———. 1967. Further studies on the growth and differentiation of single, isolated cells of tobacco *in vitro*. Planta (Berl.) 75 : 139—151.