ニラの実生および未熟胚からのカルス誘導と植物体再生

薛 惠民¹・荒木 肇²・金澤俊成³・原田 隆⁴・八鍬利郎⁴

¹サントリー株式会社基礎研究所 618 大阪府三島郡島本町若山台 1-1-1

²新潟大学農学部附属農場 959-17 新潟県中蒲原郡村松町石曾根

³岩手大学教育学部 020 岩手県盛岡市上田 3 丁目 18-33

⁴北海道大学農学部 060 札幌市北区北 9 条西 9 丁目

Callus Formation and Plantlet Regeneration through *In vitro* Culture of Immature Embryo and Seedling in Chinese Chive (*Allium tuberosum* Rottler)

Hui-min Xue¹, Hajime Araki², Toshinari Kanazawa³, Takashi Harada⁴ and Toshiro Yakuwa⁴

¹Institute for Fundamental Research, Suntory Limited, 1-1-1 Wakayamadai, Shimamoto-cho, Mishima-gun, Osaka 618

²University Farm, Niigata University, Muramatsu, Niigata 959-17

³Faculty of Education, Iwate University, Morioka, Iwate 020

⁴Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo 060

Summary

This study was carried out to establish an efficient method for propagating Chinese chive (*Allium tuberosum* Rottler) through callus culture. Compact and white callus was induced from seedlings on AZ medium supplemented with 10 μ M 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D), 1 to 10 μ M 2, 4-D and 0.01 to 0.1 μ M 6-benzyladenine (BA), and from 3-4 mm immature embryos cultures on 1 to 10 μ M 2, 4-D and 0 to 10 μ M BA. Seedling-derived callus proliferated when subcultured on Murashige and Skoog (MS) medium containing 1 μ M 2, 4-D. Higher rates of the multiple shoot formation were obtained from these proliferated calli on MS medium supplemented with 25 μ M BA with or without α -naphthaleneacetic acid (NAA). Multiple shoot growth and plant regeneration rate were accelerated when shoots were transferred to a medium without plant growth regulators. Regenerated plantlets developed vigorously after being successfully acclimated in soil.

緒 言

ニラ (*Allium tuberosum* Rottler) はネギ属植物であり、香辛野菜として利用されている。ニラにおいては、アポミクシス性を有するため、交雑育種による品種改良がほとんど行われておらず、組織培養を利用した変異の拡大や生物工学的な手法を用いた育種法の導入が必要である。

近年、ニラにおいてプロトプラストを利用した体細胞雑種の作出に関する研究が行われている (田代ら, 1984; 川崎ら, 1989; 首藤ら, 1990 b)。プロトプラストの培養では、カルスからの植物体再生系の確立が重要であることが指摘されている。ニラのカルスからの

個体再生について、Zee ら (1977) が最初にカルスからのシュート分化に成功した。その後、いくつかの研究成果が報告され、カルスからの不定芽形成には明条件が重要であることやカルスの形態によって再分化率が異なることなどが明らかにされている (首藤ら, 1990 a; 松田・足立, 1993)。また、カルスからの不定胚形成も観察されている (松田ら, 1991)。しかし、これらの報告ではカルスからの再分化は認められたものの、再分化率は低く、安定した植物体再生の培養条件は確立していないのが現状である。

そこで、本研究ではニラの植物体再生系を確立するため、発芽直後の実生および未熟胚を用いてカルスの誘導および再分化の条件について検討を行った。

材料および方法

1. カルスの誘導と維持・増殖

1) 実生からのカルス形成に及ぼす2,4-DとBAの影響

品種‘たいりょうにら’（渡辺採種場）の完熟種子を用いた。種子を水洗した後、70%エタノールに20秒間浸漬し、次亜塩素酸ナトリウム溶液（有効塩素1%、Tween 20を2滴添加）で10分間表面殺菌を行い、直ちに滅菌水で3度洗浄し、培地に置床した。種子を無菌発芽させた後、その実生を引き続き同じ培地で培養した。種子の発芽および実生の培養にはAZ培地（Abo El-Nil・Zettler, 1976）を基本培地とし、ショ糖 $20\text{ g}\cdot\text{liter}^{-1}$ を含み、2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) 0, 1, 5, 10 μM と 6-benzyladenine (BA) 0, 0.01, 0.1, 1 μM を組み合わせて添加した16種類の培地を用いた。なお、1区当たりの個体数は13~24個体であった。置床11週間後に実生からのカルス形成について調査を行った。

2) 未熟胚からのカルス形成に及ぼす2,4-DとBAの影響

北海道大学農学部附属農場の蔬菜園において栽培している品種‘大葉ニラ’（渡辺採種場）の成株から採取した未熟胚を用いた。開花数日後の花房から未熟種子（胚乳が糊状の状態）を取り出し、1)の実験と同様に表面殺菌を行った後、直径約1mmの球状胚および長さ3~4mmの棒状胚を解剖針で無菌的に摘出して培地に置床した。培養基はAZ培地を基本培地とし、2,4-D 0, 1, 10 μM と BA 0, 1, 10 μM を組み合わせて添加した9種類の培地を用いた。置床80日後に未熟胚からの形態形成、特にカルスの形成について調査を行った。

3) カルスの維持・増殖

実生より誘導されたカルスを培養80日後に、2,4-D 0 および 1 μM を添加した Murashige-Skoog (MS) 培地に移植し、カルスの維持・増殖について検討した。

2. カルスからの多芽体誘導

増殖した実生由来のカルスを、以下の再分化培地に移植して植物体再生について検討した。すなわち、MS培地を基本培地としてショ糖 $30\text{ g}\cdot\text{liter}^{-1}$ を含み、 α -naphthaleneacetic acid (NAA) 0, 1, 5 μM と BA 1, 5, 25 μM を組み合わせて添加した9種類の培地を用いた。移植35日後にカルスからの形態形成、特に多芽体とシュートの形成について調査を行った。

3. 多芽体からの植物体形成

誘導された多芽体を分割して、2,4-D 0, 1, 5 μM を添加したMS培地に移植してシュートの伸長および発根について検討した。また、再生した幼植物体は根部に付着した固形培地を洗浄した後に、土とバーミキュライト (1:1) を混合した培養土に鉢上げした。

なお、以上の培養はいずれも25℃、4,000 lx、16時間日長の条件下で行った。

結 果

1. カルスの誘導と維持・増殖

1) 実生からのカルス形成に及ぼす2,4-DとBAの影響

種子の培養1か月後に発芽直後の実生の葉鞘基部よりカルスが形成された。培養11週間後にはカルスが大きく生長し、白色でコンパクトな形状を呈した（第1図A）。カルスの形成は2,4-D無添加の場合にはBAのいずれの濃度においても認められなかった（第2図）。2,4-Dが添加されるとすべての区でカルスが形成され、2,4-D 10 μM 単独添加区、BA 0.01 μM と 2,4-D 0, 1, 5, 10 μM とを組み合わせて添加した区、BA 0.1 μM または 1 μM と 2,4-D 5 μM とを組み合わせて添加した区の6区で形成率が高かった。特に、BA 1 μM と 2,4-D 5 μM を添加した区ではカルス形成率が76.9%と最も高かった。形成されたカルスは、2,4-Dの濃度に関わらずBA 1 μM の添加区で大きかった。

2) 未熟胚からのカルス形成に及ぼす2,4-DとBAの影響

培養した球状胚はすべての実験区において発育せず枯死した。3~4mmの棒状胚の培養では、カルス、シュート、植物体および多芽体の形成が認められた（第1表）。カルス形成では、2,4-D無添加の場合、BAのいずれの濃度においてもカルスは認められなかったが、2,4-Dを1 μM および 10 μM 添加すると旺盛なカルス形成が認められた。特に、2,4-D 10 μM 単独添加区ではカルス形成率が76.9%と最も高かった。また、BAの添加によりカルスは大きくなる傾向がみられた。

一方、2,4-DおよびBAの無添加区では、ほとんどの棒状胚が植物体にまで発育した。BA 1 μM および 10 μM の単独添加区では、多芽体の形成がわずかではあるが認められた。

3) カルスの維持・増殖

実生由来のカルスを継代培養すると、2,4-D無添加

Fig. 1. Plant regeneration through multiple shoot differentiated from seedling-derived callus. Callus was induced from the base of seedling (A). Multiple shoot was differentiated from seedling-derived callus (B). Plantlets were regenerated by transferring of the multiple shoot (C). Regenerated plants growing in soil (D).

区では約半数のカルスは増殖したが、他のカルスは奇形葉を再分化した (第2表)。一方、2,4-D $1\mu\text{M}$ を添加した場合にはカルスの生長が良好であり、維持率が96.0%と高く、カルスからの再分化がほとんど認められなかった。

2. カルスからの多芽体誘導

実生由来のカルスを再分化培地に移植すると、21日後に不定芽の再分化が観察された。移植35日後の調査では、カルスからは多芽体 (第1図B)、シュート、根および奇形葉などの器官形成がみられた。多芽体の形成について、NAAの無添加と $1\mu\text{M}$ 添加の場合、BA $1\mu\text{M}$ の低濃度では形成率が低く、BA濃度が高くなるに従って形成率が上昇した (第3表)。特に、

BA $25\mu\text{M}$ の単独添加区では多芽体形成率が68.8%と最も高かった。NAA $5\mu\text{M}$ を添加した場合には、BAのいずれの濃度においても多芽体形成率は低かった。カルスからのシュートおよび根の再分化はみられたが、低い頻度であった。

3. 多芽体からの植物体形成

再生した多芽体を分割して培養すると、多芽体からはシュートを形成し、発根して順調に植物体にまで発育した (第1図C)。第4表に示したように、2,4-D無添加区ではシュート形成率 (シュートを形成した多芽体数/移植した多芽体総数) が100%と最も高く、形成したシュートも大きく、1つの多芽体から平均して4.3個の植物体が得られた。2,4-Dを添加するとシ

Fig. 2. Effects of 2, 4-D and BA on callus induction from seedlings.

Table 1. Effects of 2, 4-D and BA on callus formation and morphogenesis of the immature embryos cultured^z.

2, 4-D (μM)	BA (μM)	No. of explants	Callus formation			No. of formed from immature embryos	
			Number	%	Size(mm) ^y	Plantlet	Multiple shoot
0	0	10	0	0	—	9	0
	1	19	0	0	—	1	2
	10	16	0	0	—	0	2
1	0	12	7	58.3	11.8±1.3	0	0
	1	16	10	62.5	8.5±1.5	0	0
	10	16	11	68.8	12.0±1.1	0	0
10	0	13	10	76.9	9.8±1.5	0	0
	1	19	14	73.7	13.2±1.0	0	0
	10	20	14	70.0	14.3±0.8	0	0

^z AZ was used for basal medium. Immature embryos were stick-shaped embryos in length of 3-4 mm. Morphogenic response was observed after 85 days of incubation.

^y Mean ± SE of callus diameter.

ュート形成率は低下し、シュート長も無添加区に比べて短くなった。発根率および平均根数はシュート形成と同様に2,4-Dの添加により抑制された。再生した幼植物を順化したところ、ほとんどの個体が活着し、生長して抽だい・開花した(第1図D)。

考 察

ニラの発芽直後の実生および未熟胚を培養することにより、両者とも70%以上の高いカルス形成率を得ることができた。2,4-D無添加区ではいずれもカルス

の形成がみられなかったことから、この2種類の材料からのカルス誘導には2,4-Dの添加が不可欠であると思われる。実生からのカルス誘導について、2,4-D 10 μMの単独添加、BA 0.01 μMと2,4-D 1~10 μMとの添加、BA 0.1, 1 μMと2,4-D 5 μMの添加培地で高いカルス形成率が得られ、BAと2,4-Dとの組合せが効果的であると考えられた。未熟胚の培養では、胚の発育ステージの影響がみられ、1 mm程度の球状胚からはカルスを誘導することができず、3~4 mmの

Table 2. Effects of 2, 4-D on the growth of seedling-derived callus in subculture^z.

2, 4-D (μ M)	No. of calli transferred	Callus growth		Size of callus (mm) ^y	No. of calli differentiating deformed leaves
		No. of growing calli	%		
0	36	19	52.8	9.7 $\pm$ 0.5	17
1	50	48	96.0	8.3 $\pm$ 0.2	2

^z MS was used for basal medium. Morphogenic response was observed after 1 month of transferring.^y Mean $\pm$ SE of callus diameter.**Table 3.** Effects of NAA and BA on multiple shoot formation from the seedling-derived calli^z.

NAA (μ M)	BA (μ M)	No. of calli transferred	No. of regenerated calli			
			Multiple shoot (%)		Shoot	Root
0	1	12	0	(0)	0	2
	5	12	3	(25.0)	2	0
	25	16	11	(68.8)	2	0
1	1	12	1	(8.3)	2	0
	5	16	3	(18.8)	0	0
	25	16	8	(50.5)	0	0
5	1	20	2	(10.0)	0	0
	5	16	0	(0)	0	0
	25	16	2	(12.5)	0	0

^z MS was used for basal medium. Morphogenic response was investigated after 35 days of transferring.**Table 4.** Effects of 2, 4-D on shoot, root and plantlet formation from multiple shoot^z.

2, 4-D (μ M)	No. of multiple shoots transferred	Shoot		Root		Plantlet	
		%	Length (cm)	%	Number/ Plantlet	%	Number/ Multiple shoot
0	20	100	5.9	100	10.6	100	4.3
1	19	78.9	4.3	52.6	4.5	52.6	2.4
5	16	37.5	2.0	0	0	0	0

^z MS was used for basal medium. Morphogenic response was observed after 2 months of transferring.

棒状胚が適していた。首藤ら (1990 a) は暗黒条件下で実生の葉鞘部からカルスを誘導したことを報告しているが、本実験では明条件下においても高い形成率を得たことから、暗黒条件はカルス形成の必須の条件ではないと考えられる。カルスの形成については、実生と未熟胚のいずれにおいても白色でコンパクトな外観を呈し、同等の性質を有するものと考えられた。また、カルスの維持・増殖には 2,4-D 1 μ M の添加が有効であることが明らかとなった。

ニラにおけるカルスからの植物体再生に関しては、Zee ら (1977) が IBA を添加した MS 培地で葉鞘基部由来のカルスよりシュートが得られたことを報告している。また、首藤ら (1990 a) は暗黒条件下で誘導した葉鞘部由来のカルスを明条件下で培養することにより不定芽が形成され、不定芽の分化には明条件が重要であることを述べている。本実験では BA を 25 μ M 単独添加した培地で高い多芽体形成率が得られたことから、不定芽形成にはサイトカイニンが最も重要な役割を果たすものと考えられる。一方、大橋ら (1991) は BA 1 mg/l を添加した培地においてニラのカルスからの再分化率が 24% と低かったことを報告している。松田・足立 (1993) は、実生由来のカルスを液体懸濁培養することによりカルスの形態的な変化を観察しているが、最も再分化率が高かったカルスにおいても 22.9% であったことを報告している。本実験の培養系では、カルスを高濃度の BA を添加した培地で培養することにより多芽体形成を促進し、その後に生長調節物質無添加の培地に移植して植物体を形成させることにより、従来の報告に比べて高い再生率を得ることができた。

多芽体は多数の不定芽や葉原基を有する不定芽の集塊であり、これまでギョウジャニンニク (茂田ら, 1990; Kanazawa ら, 1991; 楊ら, 1992) やラッキョウ (川崎ら, 1987; 岡田・松本, 1990; Kawasaki ら, 1990) などのネギ属植物でその形成例が報告されている。一般に多芽体はカルスの他、外植体から直接分化する場合もあるが、誘導には高濃度のサイトカイニンの添加が有効であることが知られている。本実験におけるニラのカルスからの多芽体誘導においても、同様の傾向がみられた。誘導された多芽体は生長調節物質無添加の培地に移植することにより順調にシュートが伸長し、発根して完全な植物体を形成することが特徴的であった。このように、多芽体は苗化が容易で増殖性が高い点から、効率の良い再分化系であると評価される。

摘 要

ニラ (*Allium tuberosum* Rottler) におけるカルス経由の植物体再生系を確立する目的で、実生および未熟胚からのカルス誘導と植物体再生について検討した。

実生および未熟胚からは 2,4-D を添加した培地で高いカルス形成率が得られた。実生からのカルス誘導には、BA 無添加では 2,4-D 10 μ M, BA を 0.01 μ M 添加した場合には 2,4-D 1~10 μ M, BA 0.1 μ M 以上

では 2,4-D 5 μ M を添加した AZ 培地が有効であった。未熟胚からのカルス誘導には、2,4-D 1~10 μ M と BA 0~10 μ M との組合せが良好であった。継代培養でのカルスの維持・増殖には 2,4-D 1 μ M の添加が適していた。

実生由来のカルスを NAA 0~1 μ M と BA 5~25 μ M を添加した MS 培地に移植したところ、多芽体が効率よく形成された。特に、BA 25 μ M の単独添加は多芽体形成に最も有効であり、BA が重要な役割を果たすことが明らかとなった。

多芽体からの植物体形成については、生長調節物質無添加の培地がシュートの伸長や発根に良好であり、2,4-D の添加により抑制された。誘導された多芽体は苗化が容易で、増殖性が高い点から有用な再分化系と考えられる。

引用文献

- Abo El-Nil, M. M. and F. W. Zettler. 1976. Callus initiation and organ differentiation from shoot tip cultures of *Colocasia esculenta*. Plant Sci. Lett. 6 : 401-408.
- Kanazawa, T., Y. Nishi, N. Kasai, T. Harada and T. Yakuwa. 1991. Studies on botanical characteristics of *Allium victorialis* L. ssp. *platyphyllum* Hult. IV. Plantlet regeneration through bud-multiplying body formation from apical-meristem tissues culture *in vitro*. J. Fac. Agr. Hokkaido Univ. 64 : 279-291.
- 川崎 渉・小島甚一郎・加納正博・昆 睦子・阿部王巳・勝屋 登・関谷次郎. 1987. 多芽体及びカルスを経由したラッキョウ種苗の大量育成. 第 10 回植物組織培養シンポジウム講演要旨集 : 97.
- 川崎 渉・小島甚一郎・加納正博・木村 修・村山王樹. 1989. プロトプラスト融合によるネギ属雑種植物の作出について. 第 11 回植物組織培養シンポジウム講演要旨集 : 230.
- Kawasaki, W., J. I. Kojima, M. Kano, M. Yoshida, T. Abe, A. Morita and J. Sekiya. 1990. Improved culture conditions for *in vitro* clonal propagation of scallion (*Allium chinense* G. Don). Plant Tissue Culture Letters 7 : 19-22.
- 松田 靖・石田正彦・足立泰二. 1991. ニラ (*Allium tuberosum* Rottler) のカルス培養と植物体の再生. 育種. 41 (別 1) : 32-33.
- 松田 靖・足立泰二. 1993. ニラ品種における懸濁培養系の確立と植物体再分化. 育種. 43 (別 2) : 133.
- 岡田昌久・松本満夫. 1990. ラッキョウにおける苗条原基の誘導と植物体再生. 園学雑. 59 (別 1) : 284-285.
- 大橋一夫・木村 栄・米内貞男. 1991. ネギとニラの種間雑種の育成. 育種. 41 (別 1) : 128-129.
- 茂田潤一・草柳朋子・関 昌夫. 1990. ギョウジャニンニクの組織培養による増殖. 園学雑. 59 (別 1) : 260-261.
- 首藤博敏・阿部利徳・笹原健夫. 1990 a. ニラ, ニンニクプロトプラストからのカルス誘導. 育種. 40 (別 1) : 212-213.
- 首藤博敏・阿部利徳・笹原健夫. 1990 b. ニラカルスからの植物体再分化. 育種. 40 (別 2) : 76-77.
- 田代洋丞・高橋英昭・宮崎貞巳・金澤幸三. 1984. ネギ属植物の種々の器官・組織から単離されたプロトプラスト. 佐賀大農彙. 57 : 115-119.
- 楊 躍生・朱 政治・金 武祚・山本武彦. 1992. ギョウジャニンニクの組織培養による大量増殖法について. 育種. 42 (別 1) : 40-41.
- Zee, S. Y., A. Fung and S. B. Yue. 1977. Tissue culture and differentiation of Chinese chive. HortSci. 12 : 264.