タマネギの胚様体利用による大量増殖

誌名	農業技術
ISSN	03888479
著者	中島, 寿亀
巻/号	44巻3号
掲載ページ	p. 117-121
発行年月	1989年3月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council Secretariat

タマネギの胚様体利用による大量増殖

中 島 寿 亀

は じ め に

1950年代後半，体細胞からの胚（体細胞胚，不定胚などの呼称もあるが，ここでは胚様体と呼ぶ）の形成がニンジンにおいて初めて報告されて以来，胚様体形成に関する研究は種々の植物において試みられ，現在までに28科，62属，71種の植物で報告されている[1]。胚様体は茎頂分裂組織と根端分裂組織を合わせ持つ複極構造を示し，受精胚と類似した発達過程を経て植物体となる。したがって胚様体を利用した大量増殖は多数の胚の形成という点で種子繁殖的であるが，母株となった個体と同一の遺伝的特性を持つという点で栄養繁殖的でもあるので，2つの繁殖法の利点を合わせ持つ第3の繁殖法であるといえよう。この繁殖法の有用性としては，①増殖効率の低い栄養繁殖性作物の大量増殖が可能となる，②育種過程において得られたスーパー遺伝子型の個体からの大量増殖が可能となる，③F_1採種親や育種素材として有用な個体，特に細胞質雄性不稔系統などの維持・増殖が容易になる，などが上げられる。

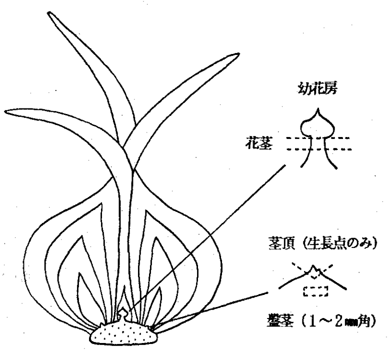
今日，胚様体を利用した種苗生産の気運が高まりつつあり，多くの植物において研究開発が進められている。農林水産省は昭和61年度より都道府県試験研究助成事業として「地域バイオテクノロジー研究開発促進事業」を開始した。当農試もこの事業に参画し，『ユリ科，ウリ科における胚様体・苗条原基の利用法の開発』を課題として取り組んでいる。その対象作物の一つとして佐賀県の基幹作物であるタマネギを挙げており，現在までに胚様体形成から植物体再生に関する一連の研究において若干の成果を得ることができたので，以下にその研究の概要について述べる。

1. 胚様体の作出

一般的に胚様体は前培養で誘導したembryogenic callus をホルモンフリーの培地に移植することによって得られる。そこで embryogenic callus を誘導するための前培養条件について検討した。

（1） 材料および方法

材料としてタマネギの品種“さつき”のリン茎各部（第1図）または発芽種子を供試し，実験1～4により外植片，培地，植物ホルモン，光条件，培養期間などの前培養条件について検討を行った（第1表）。なお全実験とも，培地はpH5.8，ゲルライト0.2％固形とし，28℃で培養した。



第1図　外植片として用いたリン茎各部

第1表　胚様体作出のための前培養条件

実験番号	外植片の種類	基本培地の種類	ショ糖濃度（％）	2,4-D (mg/l)	BA (mg/l)	Kinetin (mg/l)	培養期間（日）
1	茎頂，盤茎，幼花房，花茎	1/2MS	1.0	0.5	0	0	60
2	茎頂，盤茎	B-5	3.0	0.1～4.0	0～0.1	0	90
3	茎頂，盤茎	K	3.0	1.0	0	0，1.0	50
4	種子	K, B-5, MS	3.0	0.5～2.0	0	0，1.0	50

光条件はすべて暗所とした。

前培養後，得られた embryogenic callus をホルモンフリーの固形培地（実験1～3）または液体培地（実験4）に移植し，明条件（16h日長）下で植物体の再生を試みた。

（2） 結 果

すべての実験において培養50～90日で外植片よりカルスが得られた。カルスは乳白色～濃黄色を呈しており表面に無数の突起をもつ粒状塊であった（第2図A）。このようなカルスをホルモンフリー培地へ移植すると粒状部がさらに肥大・増殖し粒状の組織塊となるが，これらは根を形成する傾向が強かった。特に表面に光沢のあるカルスは根に分化する場合が多かった。粒状組織塊となったものの中には緑色の組織を所々に形成するものがあり，それらを崩すとカルス当たり1～6個の胚様体が認

Toshiki NAKASHIMA: Mass Propagation of Allium cepa L. through Somatic Embryogenesis. 農業技術 44（3），1989.

められた(第2図B，2図C)。中には培地上に自然に落ちて発達した胚様体もあった(第2図D)。得られた胚様体は両極性を有していたが，奇形のものが多かった。このような胚様体の発達はホルモンフリー培地移植後2～7週間で認められた。分離した胚様体はその後 in-vitro で正常な植物体に生長した(第2図E)。

それでは，検討した各条件について実験1～4で得られた結果を以下にまとめる。

1) 外植片

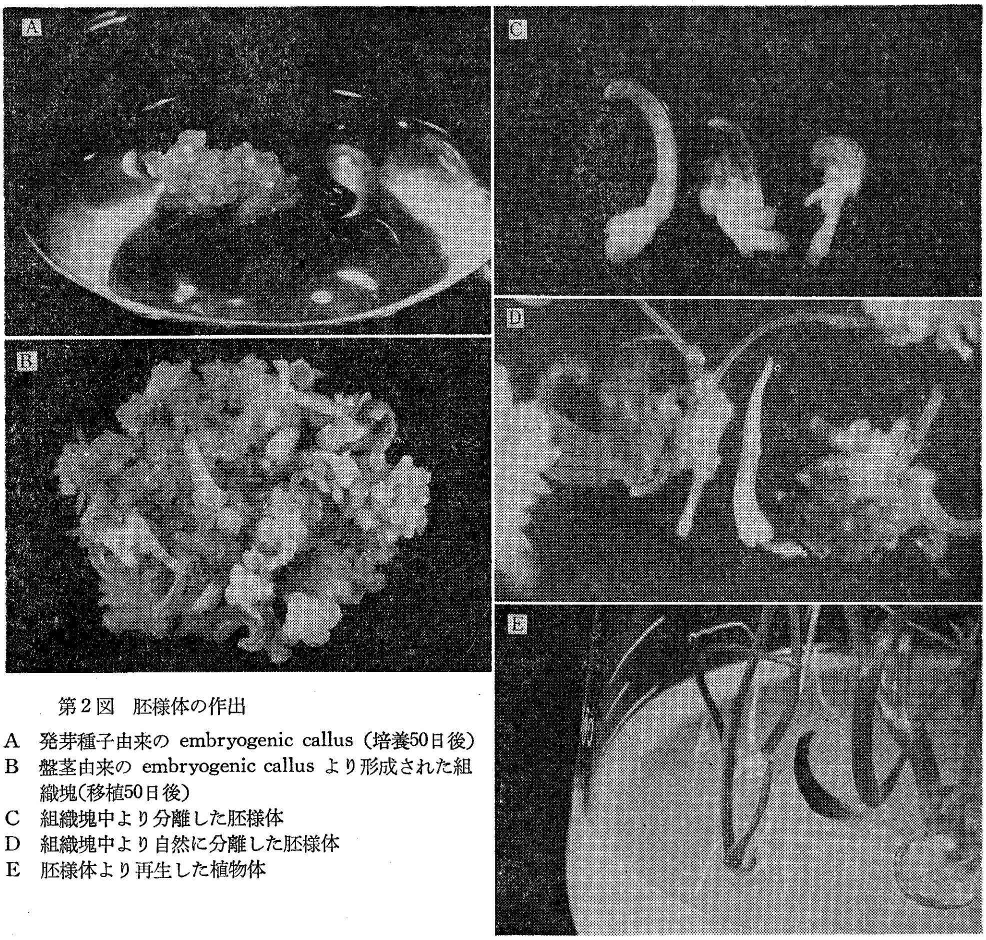
リン茎各部を用いた場合，置床後の生育は極めて緩慢であり，1カ月程経ってから徐々に外植片が肥大し，その後，肥大部にカルスが形成され始めた。培養約2カ月後から生育は急速となり，培養80～90日で粒状のembryogenic callus を形成した。これに対し発芽種子を用いた場合，生育は比較的速く，培養約1週間で盤茎部の肥大が始まった。やがて肥大部の表皮が炸裂し中からカルスが発達し始め，培養約50日で embryogenic callus を形成した。

盤茎由来のカルスは他よりも黄色が濃く，粘性物質を含み表面に光沢のある場合が多かった。また発芽種子由来のカルスは淡黄色で水分を含み柔らかく，崩すと多数の球状単位組織が観察された。他の外植片ではカルスの粒が密でコンパクトな場合が多かった。

胚様体の形成は花茎では認められなかったが，茎頂・盤茎・幼花房では認められ，中でも茎頂は形成数が他よりも若干多かった。発芽種子由来のカルスは液体振盪培養することにより直径1mm 前後の小粒を培地中に多数分離した。これらの小粒は根端部の組織である場合が多かったが，中には球～楕円体のものも認められた。しかしこの組織からの植物体再生は認められなかった。

2) 培　地

実験4で発芽種子を用いて3種類の培地について検討した結果，カルスの成育はK培地で最も良好であり，次いでMS培地，B-5培地の順であった。それぞれの培地で形成されたカルスに形態的な差は認められなかった。得られたカルスを液体培地に移植したが植物体再生は認



第2図　胚様体の作出

A　発芽種子由来の embryogenic callus (培養50日後)
B　盤茎由来の embryogenic callus より形成された組織塊(移植50日後)
C　組織塊中より分離した胚様体
D　組織塊中より自然に分離した胚様体
E　胚様体より再生した植物体

められなかった。

3) **植物ホルモン**

embryogenic callus の誘導には，2, 4-Dが必須であった。濃度は0.1mg/l では外植片からのシュートや根の伸長または奇形葉の発生が見られる場合があり，0.5～4.0 mg/l では全て粒状のembryogenic callusを形成した。カルスは2, 4-D濃度が高くなるほど黄色が濃く，粒が小さく，表面の光沢が少なく，生育が劣った。また，サイトカイニンを同時添加することでカルスは2, 4-D単独添加区よりも黄色が淡く，粒が小さく，コンパクトで，表面の光沢がなくなった。ホルモンフリー培地移植後の形態は同じ処理区のカルスでも種々の様相を示し，根を発生するもの，粒状組織塊への発達が著しいもの，同時に胚様体も形成するものなどがあり，処理区による一定の傾向は認められなかった。

4) **光条件**

実験1の結果，幼花房は暗所では完全にカルス化したが，明所では緑化して奇形の小花を形成したものもあった。また盤茎は暗所の方が濃黄色のカルスとなった。カルスの生育は盤茎と花茎では暗所の方が若干良好であった。胚様体は幼花房と茎頂のカルスにおいて認められ，前者では明暗両所で，後者では暗所で得られたカルスに形成された。

5) **前培養期間**

前培養50～60日（実験1，3）では外植片の肥大部にカルスが形成され始めた頃であり，ホルモンフリー培地移植後の胚様体の形成は少なかった。特に実験3においては移植後，外植片はすべて緑色の組織塊となり，胚様体は全く得られなかった。前培養90日(実験2)ではカルスが十分に発達し，胚様体の形成も良好であった。

2. embryogenic callus の継代培養

（1） 材料および方法

材料として0.5～4.0mg/l の2, 4-D を含む1/2MS 培地で約8カ月間培養した盤茎由来のカルス(無継代)および0.5～4.0mg/l の 2, 4-D を含むB-5 培地で90日間培養した茎頂由来のカルスをホルモンフリー培地に移植し30日後に得られた粒状組織塊を用いた。これらを2, 4-D (0.5～2.0mg/l) と Kinetin(0, 1.0mg/l)を組み合わせて添加したK培地に分割・移植し，28℃の暗所で培養した。

（2） 結 果

ホルモン添加培地移植後，数日でカルスや粒状組織に多数の根が形成され始めた。根の形成は0.5mg/lの2, 4-D単独添加区で最も多く，それ以上の濃度では少なかった(第3表)。さらに0.5mg/l の Kinetin同時添加により根の形成は抑制された。移植後2週間程で多数形成された根の中に胚様体由来の幼植物体が認められ，これらは明条件下に移すことにより数日で緑化した。胚様体の形成数は0.5～1.0mg/l の2, 4-D 単独添加区で多く，特に1.0mg/l の2, 4-D添加区に移植した粒状組織塊に多数形成された。Kinetin の同時添加は胚様体形成に対してむしろ抑制的であった。

3. 考　　察

胚様体利用による大量増殖法の有用性については前述した通りであるが，タマネギの場合は，まだ得られる胚様体の形成率が低く，解決すべき多くの問題点が残されている。そこで効率的胚様体誘導法の確立のために現在までに得られた結果を基に胚様体形成に重要であろうと考えられる幾つかの培養条件について考察してみる。

（1） 外植片

島田ら(1973)[2]は葉原基を2～3枚つけたワケギの茎頂を2, 4-Dを含む培地で培養することにより球形，楕円体あるいは倒卵形体の単位組織を含むカルス様の分裂組織を得，この分裂組織をホルモンフリーの培地に移植することにより多数のシュートや根の形成を認めた。さらに島田ら(1974)[3]はこれらのカルス様分裂組織の起源が主に葉鞘基部や盤茎由来であることを観察した。本実験で得られたタマネギの embryogenic callus もこれと類似していることから，その起源も同様であることが考えられる。したがって短期間で十分なembryogenic callusを得るためには外植片として葉鞘基部を含む茎頂や盤茎が有効であると思われる。

また，本実験のタマネギでは幼花房等からも胚様体が得られており，植物体の様々な部位が外植片と成りうることが考えられるので，今後は，胚様体の形成効率や変異の発生などについて外植片ごとの特徴を明らかにする必要がある。

（2） 培 地

近年の組織培養に関する報告をみると培地として MS 培地を用いている場合が多いが，培養の効率化をはかるためにはその植物に適した培地を選択する必要がある。Dunstan and Short (1977)[4] は B-5 培地を修正したBDS培地においてタマネギカルスの生長促進を認め，さらに Shahin and Kaneko (1986)[5] は BDS 培地と MS 培地，Nitch 培地を組み合わせたK培地において極めて短期間でネギとタマネギの雑種の胚様体を得た。筆者らも3種類の培地について検討し，カルスの生長における培地間の差を確認した。これらのことから，今後，さら

に他の培地についても検討するとともに，ショ糖や窒素源，微量要素などについて，胚様体の発育ステージごとの要求性をあきらかにする必要がある。

また他の植物では，得られた embryogenic callus を液体培地で維持・増殖することにより，胚様体作出の効率化がはかられている。本実験で用いたタマネギでは得られた胚様体数も少ないことから，今後この方法について検討し embryogenic callus の増殖をはかる必要がある。

（3） 植物ホルモン

島田ら(1973)[2]は2,4-D，0.75～1.0mg/l と Kinetin 0，1.0mg/l を添加した培地で得られたワケギのカルス様組織塊から多数の植物体を得た。また Shahin and Kaneko (1986)[5]は2,4-D 1.0mg/l と Kinetin 0,1.0 mg/l を添加した培地で非結球性ネギ類の胚様体を得ており，折館(1988)[6]も2,4-D 1.0mg/l と BA 0～0.1mg/lを添加した培地でネギの胚様体を得た。本実験では，2,4-D 0.5～4.0mg/lの培地添加によって胚様体を得たが，2.0～4.0mg/l ではカルスの生長が思わしくなかったことや，これまでの報告などから考えると，胚様体形成のためには1.0mg/l前後の2,4-Dを添加した培地が適当であると思われる。サイトカイニンの同時添加は胚様体形成に対して顕著な促進効果を示さなかったが，根を形成しやすい表面に光沢のあるカルスの形成を抑制する効果が認められたことから，種類や濃度についてさらに検討を加えれば胚様体形成に有効となることも考えられる。

一方，タマネギの胚様体形成に対して高い効果を示すオーキシンとして picloram が Phillips and Luteyn (1983)[7]によって報告されており，佐藤ら(1988)[8]も同様にpicloramを用い，タマネギのプロトプラストから直接球状胚を形成させることに成功している。したがって，前培養の植物ホルモンとして2,4-D以外のオーキシンについての検討も必要であると思われる。

さらに一般的に胚様体の再分化はホルモンフリー培地への移植により認められるが，本実験では2,4-D添加区でも胚様体の発達が認められており，ホルモンフリー培地への移植は必ずしも必要条件ではないと考えられる。また島田ら(1973)[2]や Shahin and Kaneko (1986)[5]はサイトカイニンを含んだ培地でカルスを継代培養することによって多数の植物体を得ており，胚様体の発達にはサイトカイニンが有効であることが考えられる。

（4） 光

島田ら(1973)[2]はワケギの前培養における光条件について検討し，暗所の方がカルス様組織塊の生長が若干良好であるという結果を得た。また，Dolezel ら (1980)[9]はタマネギの胚培養において直径 0.5mm の円柱状の胚を直ちに明所で培養する場合と一週間暗所で培養する場合とを比較し，後者で高い成長率を得た。これらのことから初期の胚発達は明条件により抑制されるものと考えられる。したがって，前培養後，カルスを移植する場合，ある期間暗所で培養を行った方が胚様体の発達に有効であると思われる。

（5） 培養変異

クローン増殖は遺伝的な安定性が要求されるため，培養変異の発生は増殖上大きな問題となる。Selby and Collin (1976)[10]はタマネギカルスの培養変異について検討し，様々な特徴をもったカルスや倍数体細胞を確認した。また Nandi ら (1977)[11]はタマネギのカルスを用い，培養期間および植物ホルモンの培地添加と変異発生について染色体レベルで検討した。その結果，培養期間が長いほど高頻度で倍数体細胞が確認されたが，適量の 2ip あるいはNAA の添加によってその発生を抑制できることを示した。さらに，田代ら(1985)[12]はワケギの茎頂由来のカルスより再分化した植物体に様々な染色体突然変異や形態変異を確認した。以上のことからネギ類では培養変異がかなり生じやすいものと考えられ，今後はタマネギの胚様体由来の植物体について遺伝的特性を明らかにし，変異細胞の除去法や変異の抑制法を検討する必要があろうと思われる。

以上が現在までのタマネギ胚様体に関する筆者らの研究の概要であるが，今後，さらに詳細な検討を重ね，実用化技術まで研究を進めたい。

（佐賀県農業試験場バイオテクノロジー研究室）

摘　要

タマネギの胚様体の利用技術を開発するに当たり，胚様体形成のための種々の培養条件について検討した。

(1) リン茎各部からの胚様体形成のためには前培養期間として90日以上が必要であった。

(2) 前培養における光条件は明所より暗所の方がカルスや胚様体の形成に有効であった。

(3) 前培養における植物ホルモンには2,4-Dが必要であり，最適濃度は 0.5～4.0mg/l であった。また，サイトカイニンの同時添加は胚様体形成に対して顕著な効果を示さなかった。

(4) 胚様体由来の幼植物体の発達はホルモンフリー培地移植後２～７週間で認められ，カルス当たりの幼植物体数は１～６個体であった。

(5) 発芽種子を材料とした場合50日程でカルスの形成

がみられた。カルスの発達はK培地で最も良く，次いでMS培地，B-5培地の順であった。

(6) 前培養で得られた発芽種子由来のカルスをホルモンフリーの液体培地に移植したが，胚様体の形成は認められていない。

(7) 前培養において長期間放置したカルスや，ホルモンフリー培地移植後，胚様体由来の幼植物体の発達が認められなかった粒状組織塊を再度ホルモン添加培地に移植した場合にも胚様体の発達がみられた。

引用文献

1) 山口聰(1988)：不定胚を利用した花卉種苗の大量増殖の可能性. 新花卉，139，53～59.

2) 島田恒治・宮崎貞巳・田代洋丞・伊藤孝利(1973)：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. 園学要旨，昭48春，198～199.

3) 島田恒治・宮崎貞巳・田代洋丞・新開隆博(1974)：組織培養による倍数性育種に関する基礎的研究(第3報)ワケギの茎頂培養におけるカルス様組織の起源について. 園学要旨，昭49秋，194～195.

4) Dunstan D. I. and K. C. Short (1977): Improved growth of tissue cultures of the onion, *Allium cepa.* Physiol. Plant., 41, 70～72.

5) Shahin H. A. and K. Kaneko (1986): Somatic embryogenesis and plant regeneration from callus cultures of nonbulbing onions. Hort Science, 21, 294～295.

6) 折舘寿郎(1988)：ネギ培養細胞からの不定胚形成と植物体再生. 育学雑誌，38，2，32～33.

7) Phillips G. C. and K. J. Luteyn(1983): Effect of piclorum and other auxins on onion tissue cultures. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 108, 948～953.

8) 佐藤裕・浦上敦子・永井信(1988)：タマネギ葉肉プロトプラストからの不定胚形成. 育学雑誌，38，2，30～31.

9) Dolezel J., F. J. Novak and J. Luzny (1980): Embryo development and in-vitro culture of *Allium cepa* and its interspecific hybrids. Z. Pflanzenzuch-tg., 85, 177～184.

10) Selby C. and H. A. Collin (1976): Clonal variation in growth and flavour production in tissue cultures of *Allium cepa* L. Ann. Bot., 40, 911～918.

11) Nandi S., G. Fridborg and T. Eriksson (1977): Effect of 6-(3-methyl-2-buten-1-ylamino)-purine and α-naphthaleneacetic acid on root formation and cytology of root tips and callus in tissue cultures of *Allium cepa* var. *proliferum.* Hereditas, 85, 57～62.

12) 田代洋丞・宮崎貞巳(1985)：クローン増殖技術と変異の発生. クローン植物大量生産の実際技術，田中隆荘編，シーエムシー，66～76.

昭和63年度専技資格試験問題集①

<共通課題>

あなたの地域で行われた普及事業について，成果があがったと思われる事例をあげ，その成果をもたらした活動内容を説明し，その中から基本的と考える要因を指摘し，これを活かして普及指導活動を充実させるための方策を論じ，これに対する専門技術員の活動方法について述べなさい。

<稲及び麦>

課題（ア）(1) あなたの地域における水稲と麦類（麦類については主要なもの1種類）について，低コスト・良質化をはかるうえでの留意すべき収穫・乾燥の技術的方策を述べなさい。(2) 次の用語を解説しなさい。①プロトプラスト ②営農排水 ③光飽和 ④登熟歩合 ⑤播性

課題（イ） あなたの地域における稲作又は麦作について，次の事項を説明しなさい。①最近の動向 ②栽培技術上の問題点 ③今後の技術改善の方向

<野菜及びいも類>

課題（ア）(1) 野菜栽培における，いわゆる“有機農法”について，その動機・実情・問題点などに関する，あなたの考えを述べなさい。(2) 次の用語のうち，五つを選び，その定義と(利)効用を簡潔に述べなさい。①脱分化 ②細胞融合 ③プロトプラスト ④ヒートポンプ ⑤EC ⑥夜冷育苗 ⑦プラグ苗 ⑧予冷 ⑨ジーンバンク ⑩生物農薬

課題（イ） 現在あなたが従事している普及(又は研究)活動のうち最も力を注いでいるものについて，①課題と目的 ②取り上げた動機 ③進行の状況と経過 ④実施上の問題点と志向する解決法 ⑤期待される効果と普及性 ⑥その他 について，述べなさい。

<果 樹>

課題（ア）(1) あなたの県(または都，道，府)における果樹栽培において，新品種(種類を含む)を導入しようとする場合，品種の評価と選定及び更新のねらいと方法について，あなたの意見を具体的に述べなさい。(2) 次の用語について簡潔に解説しなさい。①開心自然形 ②栄養生長と生殖生長 ③秋肥 ④低樹高栽培 ⑤頂部優勢性

課題（イ） あなたが従事した試験研究または普及活動のうちで，最も著しい成果を収めたと思う課題一つを選び，次の事項について述べなさい。①課題名と計画の動機及び目的 ②実施経過と具体的成果 ③今後に残された問題点と改善方向

<工芸作物及び雑穀>

課題（ア）(1) あなたの県(又は地域)の工芸作物と雑穀の中から，主要と思われる順に二作物を選び，その栽培の成立及び発展の条件について簡明に述べなさい。(2) 次の事項のうち三つを選び説明しなさい。①異数性 ②耐肥性 ③弱毒ウイルスの利用 ④ハードニング ⑤永久しおれ点 ⑥ 収穫指数

課題（イ） あなたの県(又は地域)の工芸作物又は雑穀の中から一作物を選び，国内外の最近の生産動向を踏まえて，今後さらに栽培技術の改善を進める場合，どこに視点をおいて，どのように農家を指導したらよいか具体的に説明しなさい。