

赤タマネギ ‘早生湘南レッド’ における 初生根端カルスからの再生体誘導

上西愛子・野村 研・大矢武志・北 宜裕

Plant Regeneration from Root Tip Callus of Red Onion Cultivar ‘Wase Shonan-Red’

Aiko KAMINISHI, Ken NOMURA, Takeshi OHYA, and
Nobuhiro KITA

摘 要

培養変異, 種間交雑あるいは子房培養等を利用した育種を進めるため, 本県育成の赤タマネギ品種 ‘早生湘南レッド’ の根端から植物体を効率的に再生させる手法を開発した. 2,4-D $2.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ を添加した MS 固体培地に, ‘早生湘南レッド’ の種子を無菌播種したところ, 発芽種子の初生根端組織から効率よく, 活性の高いカルスが誘導された. これを $2\text{iP } 10.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ を含む MS 固体培地に移植したところ, 体細胞不定胚が誘導された. さらに, この不定胚を MS ホルモンフリー固体培地に移植することにより, 再現性よく, 形態異常のない再生個体を得ることができた.

謝 辞

本研究の実施及び本研究の作成に当り, 横浜市立大学木原生物学研究所笹隈哲夫教授には貴重な御助言ならびに御指導をいただいた. ここに深謝の意を表する.

キーワード: 赤タマネギ, 初生根端カルス, 再分化

Summary

An efficient method for plant regeneration from root tip of red onion cultivar, ‘Wase Shonan Red’, was developed to enhance breeding using somaclonal variation, interspecific cross or embryo culture. Viable calli were induced from root tip tissue of germinating axenic seeds on solid MS medium supplemented with $2.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). Frequent regeneration of somatic embryos and shoots occurred after transferring these callus on solid MS medium supplemented with $10\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ of N^6 -(2-isopentenyl) adenine (2iP). Shoots and roots were further regenerated by replacing the somatic embryos onto solid MS medium without growth regulators. Finally, regenerated plantlets developed to whole plants with no morphological variation.

Key words : red onion, seeds, root tip callus, regeneration

緒 言

生食用赤タマネギ‘湘南レッド’は、昭和36年に当研究所で育成された固定品種であるが(板木1963)収穫期が梅雨に重なり、貯蔵性が低下することから、早生性に着目して選抜を進め、平成5年に、収穫期が7日程度早い新品種、‘早生湘南レッド’、が育成された(林ら1995)．‘湘南レッド’及び‘早生湘南レッド’は、いずれも生食用品種としての特性を良く備えた品種であるが、これらの品種の球色や球形、辛味などの食味を改良することにより、本県特産品種としてのさらなる需要の拡大が期待される。

タマネギ(*Allium cepa*)では、 F_1 化による品種改良が積極的に進められている(高橋1988)． F_1 育種において、片親系統の主要形質を変えずに、新たな特性を付与することは育種の効率化のためには重要であり、その点で培養変異の誘導、大量増殖あるいは形質転換などの利用は、極めて有効な手法となりうる．そのためには、カルス誘導・増殖及び高頻度で再分化個体を得る系の確立が不可欠となる。

ネギ(*Allium*)属植物では、ネギ(*A.fistulosum*)やワケギ(*A.wakegi*)あるいはニンニク(*A.sativum*)等でカルスを經由した再分化系が報告されている(高橋1988)．ニンニクではカルスからの再分化植物体集団から優良個体が選抜され(Novak1980)、タマネギでは、りん片葉片(Fridborg1971)、成熟種子接合子胚子葉(Van der Valkら1992)、未成熟胚(Eadyら1998)、発芽種子の初生根先端組織(Dunstan and Short1978、高儀ら1996)等を利用したカルスからの不定胚分化及び植物体再分化が報告されている．また、Tanikawara(1996)は、プロトプラスト培養から再分化個体を得ている．しかし、カルスからの不定胚形成率が低いこと、培養変異に伴う染色体異常が生じやすいことなどの問題点が指摘されている(Novakら1986、Brewster1994)．タマネギのカルス培養系の場合、栽培品種や細胞培養系によって生長調節物質感受性が異なることも知られている(Novak1990)．

そこで本研究では、本県育成品種‘早生湘南レッド’の効率的な培養系を開発するため、初生根端組織を用いて再分化個体を得る最適条件について検討した。

材料及び方法

1. カルス誘導

(1) 無菌播種

当所で1998年に採種した‘早生湘南レッド’の種子を用い、70%エタノールで1分間殺菌後、界面活性剤を含む次亜塩素酸ナトリウム液(有効塩素濃度5%)を加え1分間処理した．これに等量の滅菌水を用いてさらに5回洗浄した。

滅菌種子をカルス誘導培地(後述)に埋め込むように播種し、25℃、明条件で1~4週間かけて発芽させた。

発芽してきた個体については、カルス誘導培地に置床し、25℃、連続人工照明下で4週間培養した。

(2) 培地

ムラシゲ・スクーグ培地(Murashige and Skoog1962)に2.5%濃度でショ糖を加え、1規定の水酸化カリウムでpH6.2に調整した後、0.2%ゲランガムを加えたものを基本培地とした．これに2.0mg・L⁻¹の2,4-ジクロロフェノキシ酢酸(2,4-dichlorophenoxyacetic acid、以下2,4-Dと略記)を加えたものを、カルス誘導培地とした。

2. 再分化—不定胚の形成

(1) 培地

高儀ら(1996)の手法に基き、基本培地に0~10mg・L⁻¹のイソペンテニルアデニン(N⁶-(2-isopentenyl) adenine、以下2iPと略記)を基本培地に添加することにより再分化誘導培地を作成した。

(2) 培養

カルス誘導培地に置床後6~8週間の初生根端由来カルス部分のみを切り出して再分化誘導培地に置床し、22℃、16時間明条件で4~8週間培養した。

3. 再分化・発根誘導

再分化してきた不定胚を基本培地に置床し、発根を促した．発根が誘導された後は、基本培地を100mLずつ分注した直径10cm、高さ20cmのガラス瓶に移し、22℃、16時間明条件で4週間培養した．十分成長した植物体は、1週間順化した後、ガラス温室内で栽培した。

結 果

1. カルス誘導

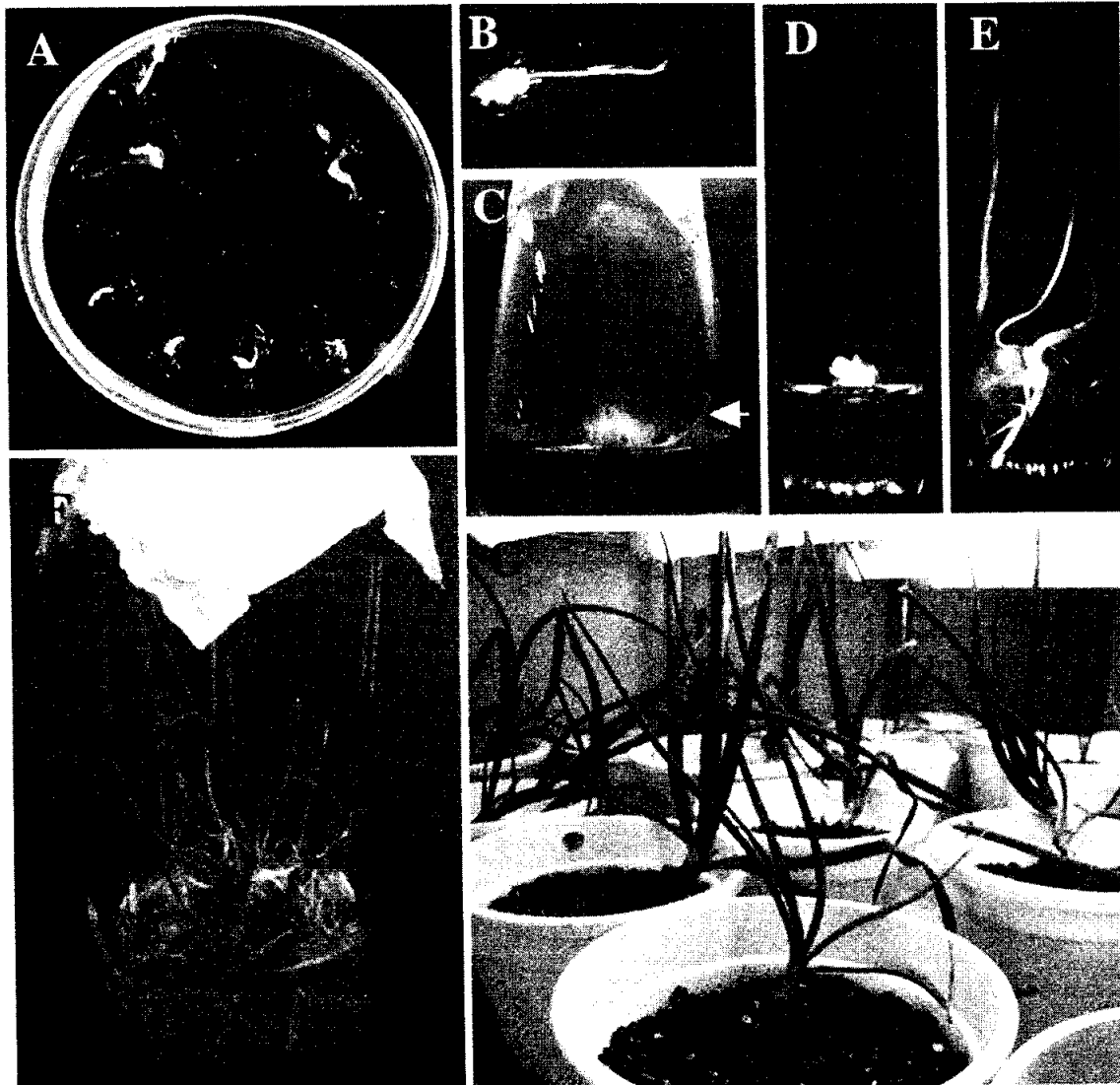
表面殺菌した種子をカルス誘導培地に播種したところ、早い個体では3日後から発芽が始まるとともに、白色半透明のカルスが同時に形成された．発芽後4週間経過すると、このカルスは1cm程度まで成長し、不透明な淡黄色を呈した(第1図A)．カルスは幼植物体の初生根端部

分からのみ形成された(第1図B). 根端が培地表面に接している場合には, すべてカルスが形成されたが, 根端が培地内に存在する場合には, カルスは誘導されず, 根端組織の発育は途中で停止した. なお, 根端が培地と接していない場合は, 小型で白色のカルスを形成した.

2. 再分化

初生根端由来カルスを再分化させるための2iP濃度について検討した. 高儀ら(1996)の報告に基づき, 再分化植物体を不定根, 不定芽(黄色)及び不定胚(緑色)の3種類に類別し, それぞれについて置床カルス数で除し

て再分化率を算出することにより(第1表), 最適2iP濃度を評価した. 再分化培地に, 容器当たり10個体のカルスを置床し, 8週間後に計30個のカルスの再分化状況を観察した. その結果, 植物ホルモンフリーの場合, すべてのカルスから不定根のみが形成された. 一方, 2iP濃度が $0.2\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 及び $2.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ では大部分のカルスで不定根が形成されたが, 黄色不定芽も一部認められた. また, 再分化培地に置床したカルスのうち, 不定胚を形成せずにシュートを分化する個体も認められた(第1図C). 緑色不定胚(第1図D)の再分化率は, 2iP濃度が 0.2 及び 2.0



第1図 '早生湘南レッド' 初生根端組織からのカルス形成と植物体再分化

- A:カルス形成培地に置床4週間後の初生根端組織由来カルス.
- B:カルス形成培地に置床8週間後の初生根端組織由来カルス.
- C:再分化誘導培地に置床4週間後のカルス. シュートが分化している(矢印).
- D:MSホルモンフリー培地に置床した不定胚.
- E:MSホルモンフリー培地に置床後4週間の不定胚. シュートと根が分化している.
- F:発根後2ヶ月の再分化植物体.
- G:順化後の再分化植物体.

mg・L⁻¹で、それぞれ10及び12%であった。一方、2iP濃度が10.0mg・L⁻¹では不定根は発生せず、不定芽と不定胚のみが形成されたが、不定胚の再分化率は45%と最も高くなった。

再分化した不定胚をMSホルモンフリー培地に置床し、シュート並びに発根の誘導を試みた。実験は3回に分けて行なった。その結果、平均67%の不定胚の発根が認められ、また、43%の不定胚からは根と共にシュートが分化し、再分化個体を得られた(第2表)。1つの不定胚からは、2~4本のシュートが誘導され(第1図E,F)、最大で12本のシュートを分化した不定胚も認められた。植物体に成長した個体は、さらにMSホルモンフリー培地で4週間育成した後(第1図F)、順化した。いずれの再分化植物体においても、形態的な異常は観察されなかった(第1図G)。

考 察

本研究において、本県育成品種‘早生湘南レッド’の発芽種子の初生根端組織から、カルスを効率良く誘導するとともに、高率で再分化個体を得る条件が明らかになった。高儀ら(1996)は、タマネギ‘もみじ’初生根端組織由来カルスから2iPを0.2mg・L⁻¹及び2.0mg・L⁻¹含む培地を用いて、不定胚及び幼植物体を、それぞれ67及び33%の頻度で得ている。本研究で、‘早生湘南レッド’を用いたところ、2iPの濃度を10mg・L⁻¹することによって、不定根の形成を抑制し、不定胚の形成率を高めることができた。さらに、不定胚やシュートからの発根を促すことにより高率で再分化個体を得ることができた。この結果は、タマネギの組織培養系における再分化において、2iPが重要な役割を果たしていることを示唆するものである。しかし、Novak(1990)は、植物生長調節物質の至適濃度については品種間差があることを指摘している。

したがって、2iP濃度については、培養に供する品種ごとに個別に設定する必要性があろう。

現在、タマネギで再分化個体を得る手法として未成熟

第1表 2iP濃度が‘早生湘南レッド’初生根端カルスからの植物体再分化に及ぼす影響

2iP 濃度 ^z	不定芽 形成率 ^y	不定根 形成率 ^y	不定胚 形成率 ^y
0	0	100	0
0.2	3	100	10
2.0	12	64	12
10.0	87	0	45

^zmg・L⁻¹, ^y%を示し、それぞれ不定芽、不定根、不定胚を再分化したカルス数/総カルス数×100により算出した。

第2表 ‘早生湘南レッド’の不定胚の再分化状況

実 験	総置床数	初根率 ^z	再分化率 ^z	平 均 個体数 ^x
1	55	62	33	1.8
2	56	64	41	2.1
3	20	75	54	3.8
平 均		67	43	2.6

^x%で、発根した不定胚数/総不定胚数×100により算出した。

^y%で、シュート・根を再分化した不定胚数/総不定胚数×100により算出した。

^z本で、一つの不定胚から再分化した植物体数の平均値を示す。

種子から未成熟胚を摘出して培養し、シュートを形成させる方法(Eadyら 1998)や、成熟種子の接合子胚の小葉からカルスを形成させ、これを再分化させる方法(Van der Valkら 1992)がよく利用されている。しかし、これらの手法では種子を表面殺菌後、無菌条件下で胚や子葉を切り出すという作業が必要であるなど、操作は煩雑である。それに比べ、初生根端組織由来カルスを利用する方法は、操作的に単純で、かつ、大量の個体を取り扱えることから、より有効な方法であると考えられる。

近年、タマネギ、ニンニク等のネギ属植物に含まれる揮発性辛味成分であるアリシンやその前駆体のアリインには、血小板凝集抑制作用や抗菌作用等多くの生理活性機能が存在することが報告され、注目されている(Block 1985, Fenwick and Hanley 1985, Augusti 1990)。また、辛味の少ない生食用品種を育成する目的で、アリシンの生成に関与する酵素であるアリイナーゼの発現量を制御する研究も進められている(Eadyら 2000)。今後、本研究で明らかにした培養条件をもとに、‘早生湘南レッド’においても機能性の改良など、新たな育種の展開が可能となるものと思われる。

引用文献

- Augusti, K.T. 1990. Therapeutic and medical values of onion and garlic. p93-108. In H. D. Rabinwitch and J. L. Brewster (eds.). Onions and Allied Crops, Vol. III, CDC Press, Boca Raton, Florida
- Block, E. 1985. The chemistry of onion and garlic. Scientific American. 252:94-99.
- Brewster, J. L. 1994. The genetics and plant breeding of Allium crops. p41-62 In Onions and other vegetable alliums. CAB INTERNATIONAL, Wallingford.
- Dunstan, D. I. and K. C. Short. 1978. Shoot production from onion callus tissue cultures. Scientia Horticulturae 9:99-110
- Eady, C. C., R. C. Butler and Y. Suo 1998. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature

- embryo cultures of onion (*Allium cepa* L.). Plant Cell Reports 18:111-116
- Eady, C. C., R. J. Weld and C. E. Lister 2000. *Agrobacterium tumefaciens*- mediated transformation and transgenic-plant regeneration of onion (*Allium cepa* L.). Plant Cell Reports 19: 376-381
- Fenwick, G. R. and A. B. Hanley 1985. The genus *Allium*- part 3. Criti.Rev.Food Sci.Nutr. 23:1-73
- Fridborg, G. 1971. Growth and organogenesis in tissue cultures of *Allium cepa* var. *proliferum*. Physiol.Plant. 25:436-440.
- 林 秀明・法月靖生・藤代岳雄. 1995. タマネギ新品種「早生湘南レッド」の育成経過と作型. 神奈川農総研報 136:1-7
- 板木利隆.1963.生食用タマネギ「湘南レッド」とその栽培法.農業及園芸 38:49-52
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol.Plant. 15:473-497
- Novak, F. J. 1980. Phenotype and cytological status of plants regenerated from callus culture of *Allium sativum* L. Z. Pflanzenzuecht. 84:250-260
- Novak, F. J., L. Havel and J. Dolezel. 1986. Onion, garlic and leek. p387-404. In: Y. P. S. Bajaj (eds.). Biotechnology in agriculture and forestry, Vol. 2, Crops I, Springer Verlag, Berlin
- Novak, F. J. 1990. *Allium* Tissue Culture. p233-250. In: H. D. Rabinwitch and J. L. Brewster (eds.). Onions and Allied Crops, Vol. I, CDC Press, Boca Raton, Florida
- 高儀雅俊・豊井一徳・一井眞比古. 1996. タマネギにおける根端組織由来カルスからの植物体再分化. 植物組織培養 13:181-183
- 高橋 尚. 1988. ハイテクによる野菜の採種(そ菜種子生産研究会編). p393-396. 誠文堂新光社. 東京
- Tanikawa, T., Takagi, M. and Ichi, M. 1996. Plant Regeneration from Suspension Cultures of Onion (*Allium cepa* L.) Plant Tissue Culture Letters 13:259-264
- Van der Valk P., Scholten, O. E., Verstappen, F., Jansen, R. C. and Dons, J. J. M. 1992. High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration from zygotic embryo-derived callus cultures of three *Allium* species. Plant Cell Tiss.Org.Cult. 30:181-191.