



Title	アルストロメリアの胚珠からのカルス誘導
Author(s)	阿久津, 雅子; AKUTSU, Masako; 篠田, 浩一 他
Citation	北海道大学農学部農場研究報告, 32, 15-21
Issue Date	2001-03-29
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/13448
Type	departmental bulletin paper
File Information	32_p15-21.pdf



アルストロメリアの胚珠からのカルス誘導

阿久津 雅子¹⁾・篠田 浩一²⁾・村田 奈芳²⁾・佐藤 博二³⁾・星野 洋一郎³⁾

(¹⁾ 北海道大学大学院農学研究科園芸緑地学講座)

(²⁾ 北海道農業試験場)

(³⁾ 北海道大学農学部附属農場植物資源科学部門)

(2001年1月9日受理)

緒 言

Alstroemeria は、南アメリカに60種が分布している。現代の園芸種は主にチリ原産種が交配親になっており、一季咲きから四季咲きまでの品種があること、根茎により栄養繁殖する多年草であること、また、花の日持ちがよく、花色が豊富で切り花に適していることから、近年人気が高まっている。

しかし、*Alstroemeria* は、数多くの自生種がありながら、伝統的な育種方法を用いての品種改良が比較的難しいとされている。種間交雑により雑種を得ることが難しく、種間雑種ができて、稔性を持たないものが大部分で、育成した種間雑種を交配親として利用できない場合がほとんどである。増殖は根茎の栄養繁殖によるものが一般的であり、自然状態では変異がほとんど発生しないため、現在の品種改良は、偶発性に頼った方法により行われているのが現状である¹⁾。

近年、細胞工学的手法による育種が試みられているが、アルストロメリアでは効率のよい植物体再生系が確立されておらず、その手法を応用できないのが現状である。

本研究では、胚珠を用いて、*Alstroemeria* のカルス誘導について検討を行った。まず、第一に、異なる時期に採取した胚珠の発育ステージがカルス形成に及ぼす影響について検討を行った。第二に、培地に加える植物生長調節物質の組み合わせが胚珠からのカルス形成に及ぼす影響について検討を行った。第三に、培地を振盪する液体培地と静置する固形培地とを用いて、カルス形成に差異

が見られるかを調査し、細胞工学的手法による植物体再生法の基礎的検討を行った。

材料と方法

1 植物材料の調製

自家授粉した *Alstroemeria pelegrina* var. *alba*、*A. pelegrina* var. *rosea* 及び *A. magenta* の子房を洗剤で洗い、流水ですすいだ後、界面活性剤 (polyoxyethylene sorbitan monolaurate : Tween 20) を添加した次亜塩素酸ナトリウム溶液 (有効塩素 1%) に 10 分間浸漬し、滅菌した。その後子房を 3 回滅菌水ですすぎ、濾紙を敷いたシャーレ上でメスとピンセットを用いて子房から胚珠を摘出した。

2 胚珠の発育ステージがカルス形成に及ぼす影響

自家授粉後 14, 32, 38 及び 48 日目の子房から摘出した *A. pelegrina* var. *alba* の胚珠を用いて、胚珠の発育ステージがカルス形成に及ぼす影響について検討した。培地は 3% ショ糖及びオーキシンとして 1 mg/l picloram または 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (以下 2, 4-D と略) を添加した MS²⁾ 培地を 0.2% ゲランガムで固化したものをを用い、pH は 5.6-5.8 に調整した。20℃、24 時間日長下で培養し、培養 8 週間後及び 12 週間後にカルスを形成した胚珠の数について調査した。

3 植物生長調節物質の組み合わせがカルス形成に及ぼす影響

自家授粉 18 日後の *A. pelegrina* var. *rosea* 及

び *A. magenta* の子房から摘出した胚珠を用い、植物生長調節物質の組み合わせが胚珠からのカルス誘導に及ぼす影響について検討した。培地は3%ショ糖を含むMS培地にオーキシンとしては picloram または 2, 4-D を 0, 0.5, 1 または 5 mg/l, サイトカニンとしては, kinetin または BA を 0 および 0.5 mg/l の濃度で組み合わせて添加し, 0.2% ゲランガムで固化したものをを用い, pH は 5.6-5.8 に調整した。胚珠を置床し, 20°C, 24 時間日長下で培養した。培養 8 週間後, 12 週間後及び 6 か月後にカルスを形成した胚珠数について調査した。

4 液体培地と固形培地を用いた場合のカルス形成の差異

自家授粉後 18 日目の子房から摘出した *A. pelegrina* var. *rosea* の胚珠を用いて, 固形培地と液体培地におけるカルス形成の差異について検討した。培地は, 3%ショ糖及び 1 mg/l picloram を添加した MS 培地に, 固形培地には, 0.2% ゲランガムを加えた。pH は, 5.6-5.8 に調整した。液体培養は回転振盪培養 (100 回/分) とした。培養は 20°C, 24 時間日長条件下で行った。

結 果

1 胚珠の発育ステージがカルス形成に及ぼす影響

Table 1 に示したように, 培養 8 週間後では, 培地に 1 mg/l picloram または 2, 4-D のいずれのオーキシンを添加した場合において, 授粉後 14 日

Table 1 Effects of developmental stages of ovules on callus formation in *A. pelegrina* var. *alba*.

days after pollination	1 mg/l picloram		1 mg/l 2, 4-D	
	8weeks ¹⁾	12weeks	8weeks	12weeks
14	10/38 ²⁾	13/38	9/39	11/39
32	20/24	22/24	8/24	10/24
38	0/7	0/7	0/7	1/7
48	0/15	0/15	0/15	1/14

¹⁾ culture period

²⁾ number of ovules showing callus formation/number of ovules tested

目及び 32 日目に摘出した胚珠が高頻度にカルスを形成したが, 授粉後 38 日目及び 48 日目に摘出した胚珠からはカルスは形成されなかった。培養 12 週間後においても, 授粉後 38 日目及び 48 日目に摘出した胚珠からは, ほとんどカルスは形成されなかった。また, 1 mg/l picloram を添加した培地上で, 約 6 か月間培養したカルスを比べたとこ

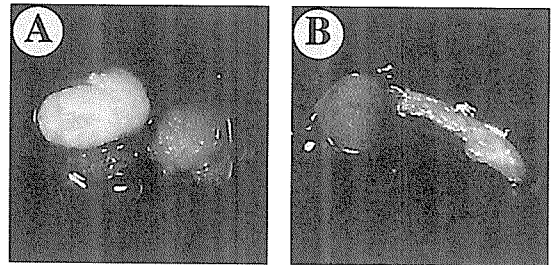


Fig. 1 Typical appearances of callus derived from ovules of *A. pelegrina* var. *alba* 6 months after initial culture. The ovules were cultured on MS medium supplemented with 1 mg/l picloram. The ovules were harvested from ovaries 14(A) and 32 days (B) after pollination.

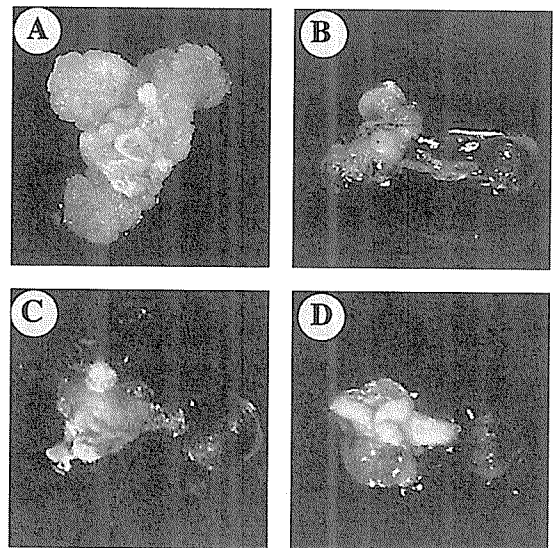


Fig. 2 Typical appearances of calli derived from ovules of *A. pelegrina* var. *alba* 6 months after initial culture. The ovules were cultured on MS medium supplemented with 1 mg/l 2,4-D. The ovules were harvested from ovaries 14(A), 32(B), 38(C) and 48 days (D) after pollination.

ろ、授粉後 32 日目の胚珠よりも、授粉後 14 日目の胚珠から形成されたものの方が、増殖がよく、friable であった (Fig. 1)。一方、1 mg/l 2, 4-D を添加した培地上で約 6 か月間培養したカルスを比べたところ、授粉後 32 日目、38 日目及び 48 日目に摘出した胚珠から生じたカルスの形態は似ていた (Fig. 2)。しかしカルスを形成した胚珠の割合は培養 12 週間後ではそれぞれ 42 %, 14 %, 4 % とかなりの差異があった。また、picloram 及び 2, 4-D のいずれを添加した場合においても、授粉後 14 日目に摘出した胚珠を用いた場合に、増殖がよく、柔らかいカルスが得られた。

2 植物生長調整物質の組み合わせがカルスの形成に及ぼす影響

A. pelegrina var. *rosea* に関しては、培養 8 週

間後では、オーキシンとして 2, 4-D を 5 mg/l 添加した場合にはカルスが形成されなかったが、0.5 及び 1 mg/l 添加した場合には、サイトカイニン添加の有無に関わらずカルス形成が認められた (Table 2)。培養 6 か月後では、0.5 mg/l kinetin 及び 1 mg/l 2, 4-D を組み合わせて添加した場合に最も高いカルス形成率が得られた。オーキシンとして picloram を用いた場合には、培養 12 週間後では、0.5 mg/l BA 及び 0.5 mg/l picloram を組み合わせて添加した場合、また、培養 6 か月後では、0.5 mg/l BA 及び 0.5 または 1 mg/l picloram を組み合わせて添加した場合に最も高いカルス形成率が得られた。

一方、同様の実験を *A. magenta* で行ったところ、今回設けた区ではカルスはほとんど誘導されなかった (Table 3)。

Table 2 Effects of plant growth regulators on callus formation in ovule culture of *A. pelegrina* var. *rosea*.

culture period	cytokinin (mg/l)	2, 4-D(mg/l)				picloram(mg/l)		
		0	0.5	1	5	0.5	1	5
8 weeks	0	10/18 ¹⁾	4/18	2/18	0/18	2/18	1/18	0/18
	0.5 kinetin	-	6/18	1/18	0/18	6/18	0/18	2/18
	0.5 BA	-	2/18	3/18	0/18	4/18	2/18	1/18
12 weeks	0	10/18	6/18	8/18	3/18	6/18	2/18	2/18
	0.5 kinetin	-	8/18	8/18	1/18	7/18	3/18	4/18
	0.5 BA	-	7/18	5/18	2/18	11/18	5/18	5/18
6 months	0	10/18	6/18	8/18	5/18	10/18	2/18	3/18
	0.5 kinetin	-	12/18	15/18	3/18	8/18	7/18	4/18
	0.5 BA	-	8/18	8/18	6/18	11/18	11/18	7/18

¹⁾ number of ovules showing callus formation/number of ovules tested
-, not tested

Table 3 Effects of plant growth regulators on callus formation in ovule culture of *A. magenta*.

culture period	cytokinin (mg/l)	2, 4-D(mg/l)				picloram(mg/l)		
		0	0.5	1	5	0.5	1	5
8 weeks	0	1/7 ¹⁾	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
	0.5 kinetin	-	0/7	0/7	0/7	1/7	0/7	0/7
	0.5 BA	-	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
12 weeks	0	1/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
	0.5 kinetin	-	0/7	0/7	0/7	1/7	0/7	0/7
	0.5 BA	-	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
6 months	0	1/7	0/7	1/7	0/7	0/7	0/7	0/7
	0.5 kinetin	-	0/7	0/7	0/7	1/7	0/7	0/7
	0.5 BA	-	1/7	0/7	0/7	1/7	2/7	1/7

¹⁾ number of ovules showing callus formation/number of ovules tested
-, not tested

3 液体培地と固形培地を用いた場合のカルス形成の差異

胚珠を液体培地へ入れ、回転振盪培養した場合、カルス形成率は培養8週間後では60%、12週間後では80%、6か月後では90%となった。同組成の固形培地と比較して (Table 2: それぞれ5%, 11%, 11%), カルスの誘導期間は短く、またカルスの形成率も高かった。Fig. 3に液体培地及び固形培地上で培養を6か月行ない、形成されたカルスの様子を示した。ともに、1胚珠から誘導されたカルスであるが、液体培地を用いた方が、カルスの生長が速かった。また、固形培地で誘導したカルスには褐変が見られたが、液体培地で得られた方には見られなかった。

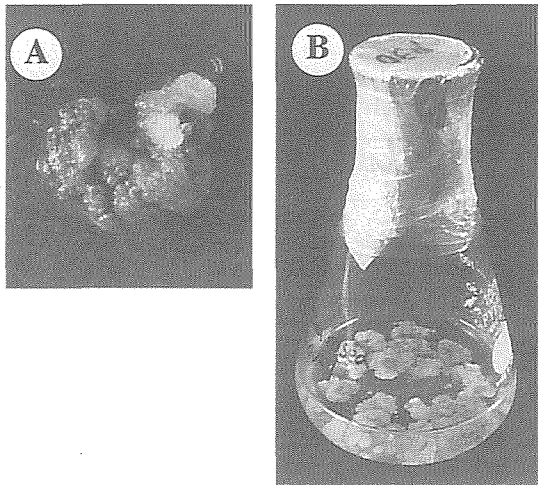


Fig. 3 Comparison of callus formation between solid and liquid medium used for culture of *A. pelegrina* var. *alba* ovules. The ovules were harvested from ovaries 18 days after pollination and cultured for 6 months. A, The callus was induced from the ovules on 0.2% gellan gum-solidified MS medium containing 1 mg/l picloram. : B, The calli were induced from the ovules cultured in MS liquid medium containing 1 mg/l picloram by gyratory shaking.

考 察

1 胚珠の発育ステージがカルス形成に及ぼす影響

Alstroemeria の胚珠培養によるカルス誘導に関して、今までいくつかの報告があるが³⁾、これまで胚珠の発育ステージとカルス形成との関連について検討した報告はない。そこで、本実験では、胚珠の発育ステージがカルス形成に及ぼす影響について検討した。

培地に 1 mg/l picloram または 1 mg/l 2, 4-D のいずれを添加した場合においても、授粉後 14 日目及び 32 日目に摘出した胚珠は高頻度にカルスを形成したが、授粉後 38 日目及び 48 日目に摘出した胚珠からはカルスは形成されなかった。このことから、胚珠の発育ステージがカルス形成に大きく影響することが分かった。

Alstroemeria 種子は、強い休眠性を持つことから¹⁾、授粉後 38 日目及び 48 日目の胚珠からカルスが形成されなかったのは、これらが休眠状態に入っていることに起因するものと思われる。

よって、胚珠からカルスを高頻度で誘導するためには、発育ステージが比較的進行していない胚珠を用いることが有効であると思われる。

2 植物生長調節物質の組み合わせがカルス形成に及ぼす影響

Gonzalez-Benito ら⁴⁾の報告では、*Alstroemeria* の胚は、オーキシンとして picloram および 2, 4-D を加えた培地を用いた場合に植物体を再生するカルスを生じたとある。

一方、Hutchinson ら^{5),6)}の報告ではサイトカイニンとして kinetin を用いることが、カルス形成に効果的であることが述べられている。本研究では、オーキシンとしては picloram および 2, 4-D、サイトカイニンとしては kinetin および BA を用いて、植物生長調節物質の濃度および組み合わせがカルス誘導に及ぼす影響について検討を行った。その結果、*A. pelegrina* var. *rosea* においては、2, 4-D 及び picloram いずれに関しても、0.5 mg/l を添加した場合に、比較的短期間でカル

スが形成され、高濃度で(5 mg/l)で添加した場合には長期間を要することが分かった。また、オーキシンとして picloram を用いた場合、サイトカイニンとして kinetin を用いた場合よりも BA を添加した場合にカルス形成率は高く、kinetin がカルス形成に効果的とする Hutchinson ら^{5),6)}の報告とは異なる結果を得た。6 か月後のカルス形成率は、0.5 mg/l kinetin 及び 1 mg/l 2, 4-D を組み合わせて添加した場合に最も高かったが、Hutchinson ら⁵⁾の報告にもあるように、本研究でも 2, 4-D をオーキシンとして添加した場合、カルスの褐変が多かった。これらのことから、オーキシンとしては 0.5 または 1 mg/l picloram, サイトカイニンとして 0.5 mg/l BA を用いることが胚珠からのカルス形成に有効であることが示された。

また、*Alstroemeria* の胚珠培養においては、遺伝子型が大きな影響を持つことが報告されているが³⁾、今回の実験でも、*A. magenta* と *A. pelegrina* var. *rosea* との間には、カルス形成に関して顕著な種間差異が認められた。このことから、*Alstroemeria* の胚珠培養においては、遺伝的背景が大きな効果を持つものと思われる。

3 液体培地と固形培地を用いた場合のカルス形成の差異

これまでの報告によると、*Alstroemeria* の胚珠培養においてはカルス形成に要する期間が 12 か月と長く⁴⁾、カルス形成率も低い。一般的に行われている固形培地上で胚珠からカルスを誘導する方法と、液体培地に直接胚珠をいれ、振盪培養する方法を比較したところ、カルス形成率や誘導期間に関して著しい差異があった。本実験では、液体培地を用いた方が、高頻度かつ短期間にカルス形成がなされた。このことから、液体培地の方が培地に触れている面が多いこと、また振盪という条件が *Alstroemeria* の胚珠からのカルス誘導において効果的であると推測された。

今後は、液体培地を用いて、添加する植物生長調節物質についてより詳細に調査し、その効果について比較検討するとともに、生じたカルスの経

時的变化を調査する予定である。

本研究で得られた成果は、*Alstroemeria* の胚珠からのカルス形成に関するいくつかの新たな知見を提供するものである。第 1 に、胚珠の発育ステージがカルス形成に大きく影響すること、第 2 に、*A. magenta* と *A. pelegrina* var. *rosea* との間には、カルス形成に関して顕著な種間差異が認められること、第 3 に、液体振盪培養が効果的であることが分かった。今後、今回得られたカルスから植物体を再生する培養系を開発し、更に形質転換系を確立することができれば、*Alstroemeria* の育種に大きく貢献できるものと思われる。

しかし、今回外植片として用いた胚珠は、材料の確保が困難で、利用できる時期も限られることが欠点である。最近、Lin ら⁷⁾は節部を含む葉組織片を用いた培養法を検討し、より簡便かつ効率的な培養系確立の可能性を考察している。また比較的材料の確保が容易である根茎を用いた報告もある⁸⁾。今後、より確保が容易な葉植物片などの組織片や根茎からのカルス誘導を試みる予定である。

摘 要

近年、細胞工学的手法による育種が試みられているが、*Alstroemeria* では効率のよい植物体再生系が確立されておらず、その手法を応用できないのが現状である。

そこで本研究では、植物体再生系の確立の基礎となる、*Alstroemeria* の胚珠からのカルス誘導条件について検討を行った。

1 胚珠の発育ステージがカルス形成に及ぼす影響として、picloram 及び 2, 4-D のいずれを添加した場合において、授粉後 14 日目に摘出した胚珠を用いた場合に、増殖がよく、柔らかいカルスが得られた。

2 植物生長調節物質の組み合わせがカルスの形成に及ぼす影響として、*A. pelegrina* var. *rosea* に関しては、培養 6 か月後に、0.5 mg/l kinetin 及び 1 mg/l 2, 4-D または 0.5 mg/l BA 及び 0.5 mg/l picloram を組み合わせて添加した場合に最も高いカルス形成率が得られた。

一方、同様の実験を *A. magenta* で行ったとこ

ろ、今回設けた区ではカルスはほとんど誘導されなかった。

3 液体培地と固形培地を用いた場合のカルス形成の差異として、胚珠を液体培地へ入れ、回転振盪培養した場合、カルス形成率は固形培地と比較してカルスの誘導期間は短く、またカルスの形成率も高かった。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、原田 隆教授には多くのご助言を頂いた。ここに深く感謝の意を表す。

引用文献

- 1) 大川 清 (1993) 花専科. 育種と栽培. アルストロメリア. 誠文堂新光社
- 2) Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with Tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15 : 473-497
- 3) Lu, C. and Bridgen, P. B. (1996) Effects of genotype, culture medium and embryo developmental stage on the in vitro responses from ovule cultures of interspecific hybrids of *Alstroemeria*. *Plant Science* 116 : 205-212
- 4) Gonzalez-Benito, M. E. and Alderson (1992) Callus induction and plant regeneration in *Alstroemeria*. *Journal of Experimental Botany* 43 (247) : 205-211
- 5) Hutchinson, M. J., Tsujita, J. M. and Saxena, P. K. (1994) Callus induction and plant regeneration from mature zygotic embryos of a tetraploid *Alstroemeria* (*A. pelegrina* × *A. psittacina*). *Plant Cell Reports* 14 : 184-187
- 6) Hutchinson, M. J., Senaratna, T., Tsujita, J. M. and Saxena, P. K. (1997) Somatic embryogenesis in liquid cultures of a tetraploid *Alstroemeria*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 47 : 293-297
- 7) Lin, H. S., De Jeu, M. J. and Jacobsen (1997) Direct shoot regeneration from excised explants of in vitro grown seedlings of *Alstroemeria* L. *Plant Cell Reports* 16 : 770-774
- 8) Pedersen, C., Hansen, C. W., Brandt, K. and Kristiansen, K. (1996) *Alstroemeria* plantlets can be induced to flowering by cold treatment during in vitro culture. *Scientia Horticulturae* 66 (3-4) : 217-228

Callus induction from ovules of *Alstroemeria* L.

Masako AKUTSU¹⁾, Koichi SHINODA²⁾, Naho MURATA²⁾, Hiroji SATO³⁾,
Yoichiro HOSHINO³⁾

(¹⁾ Research Group of Horticultural Science and Landscape Architecture,
Graduate School of Agriculture, Hokkaido University)

(²⁾ Hokkaido Natl. Agr. Exp. Stn)

(³⁾ Division of Science of Plant Resources, Experiment Farms,
Faculty of Agriculture, Hokkaido University)

(Received January 9, 2001)

Summary

Calli were induced from *A. pelegrina* var. *rosea*, *A. pelegrina* var. *alba* and *A. magenta* by culture of ovules excised from ovaries 14 days after self-pollination. Friable calli were formed 6 months after initial culture from each ovules on Ms medium supplemented with 1 mg/l picloram or 2,4-D. The frequency of callus formation from ovules of *A. pelegrina* var. *rosea* increased on MS medium containing 0.5 mg/l kinetin and 1 mg/l 2,4-D, or 0.5 mg/l BA and 1 mg/l picloram. On the other hand, the ovules of *A. magenta* were rarely induced calli on the same conditions. Friable calli were also induced effectively from the ovules of *A. pelegrina* var. *rosea* cultured in liquid medium on a gyratory shaker.