

組織培養によるイセイモ及びワイルドライスの 種苗増殖に関する研究

(第1報) イセイモ多芽体及びワイルドライス胚様体の作出

平野三男, 立松伸夫, 服部英樹, 橋爪不二夫, 河野 満

諸 言

イセイモはヤマノイモ (*Dioscorea opposita* Thunb.) の一種で, 三重県の特産品であり, 品質が良いことから市場で高い評価を得ている。イセイモは栄養繁殖性で, 収穫したいもの1/3~1/4を翌年度の種いもとして利用している。また, ワイルドライス (*Zizania palustris* L.) はイネ科ジザニア属の作物で, 日本への導入以後各地の大学や国立試験場で試験栽培が続けられている。ワイルドライスは, 高蛋白質, 高ビタミンの健康食品として注目され, さらに低温及び水中発芽性を有した優良遺伝資源としても有用と考えられている。しかしながら, イセイモはいもの肥大率が低いこと, ワイルドライスは脱粒性が大きいいため収穫量が極端に少ないことが, それぞれの増殖に関する問題点として指摘されている。今後イセイモ及びワイルドライスの振興を図る上で種苗の増殖技術は不可欠であり, 本研究は組織培養法を利用した種苗の大量増殖技術の開発を目的として行った。

既に多くの作物で胚様体, 苗条原基PLBなどが作出され, これらを利用した種苗供給の事例が報じられている¹⁾。なかでもシンビジウムをはじめとするラン類のPLBによる種苗生産がすでに実用化されている事は, よく知られている。さらに, キク科植物の茎頂を液体培地中で回転培養し得られた苗条原基¹⁸⁾は増殖に伴う変異の少ないことが注目され, 以来多くの作物種でその誘導が試みられている^{6), 10)}。これらの茎頂由来の増殖体に対して, より増殖率が高く液体培養による効率化が期待できる胚様体誘導系も多くの作物種で成功例が報告されている^{1), 13), 16)}。特に昭和61年度からの農林水産省地域バイオテクノロジー研究開発推進事業(農林水産省農林水産技術会議事務局)¹⁷⁾は, 胚様体・苗条原基誘導に成功した作物種の数を飛躍的に増加させた。本報告は, 前

記事による助成を受け, 得られた成果を中心にした報告で, イセイモ及びワイルドライスの組織培養による種苗増殖を図る一環として, イセイモでは多芽体をワイルドライスでは胚様体を作成したのでその概要を報告する。

材料及び方法

1. 供試植物

イセイモは, 三重県農業技術センター内の圃場で4月中旬に種いもを定植後, 約2ヶ月を経た成植物を用い, 外植体として芽, 茎頂近傍, 幼葉, 及び幼茎を供試した。また試験管内で培養(増殖)し再生した幼植物からも同様の外植体を用いた。ワイルドライスは, 農業技術センター内の水田で5月上旬に定植し, 約1ヶ月を経た成植物を用い, 外植体として茎頂及び種子胚を供試した。なお, イセイモは現地で採集した優良系統で, ワイルドライスは三重県へ導入以来維持している「三重系統」である。

2. 外植体の表面殺菌

外植体を採取し, 70%エチルアルコールに30秒間浸漬後, 2.5%(有効塩素濃度)のアルチホルミンで表面殺菌を行った。ワイルドライスの未熟胚及び完熟胚を用いた場合は穎を除去した穀粒を表面殺菌し, 胚を採取した。

3. 培地の調製

Murashige and Skoogの培地¹²⁾(以下MS培地とする)及びワイルドライスの液体懸濁培養系では, B5培地⁵⁾を基本培地とした。さらに試験によりMS培地を下記項目に示したような修正を行った。固体培地とする場合は, 支持体に寒天(0.8%)もしくはゲランガム(和光純薬製, 0.2%)を用いた。培地に添加したショ糖は30

g/l (ワイルドライスのカルス培養では、20g/lとした)で、植物ホルモンを培養の目的に合わせ、オーキシシン(2, 4-D, NAA)及びサイトカイニン(BA, 2-iP)を組み合わせて添加した。またpHを5.7~5.8に調節した。主に用いた培養管は直径22mm長さ115mmの平底試験管(培地容量: 8ml), もしくは直径20mm, 長さ200mmの丸底試験管(培地容量: 20ml)である。

4. 環境条件

14時間証明-10時間暗黒, 温度25°C(イセイモの苗条原基・多芽体・カルス誘導, ワイルドライスの苗条原基誘導), もしくは10時間照明-14時間暗黒, 温度20°C(ワイルドライスのカルス誘導)に調節した培養室(約4.95m³)もしくは人工気象器(容量200l)を用いた。照明は白色蛍光灯により行ったが, 照度は培養室灯直下では約2,000luxで, 人工気象器では, 約7,000lux

5. 苗条原基形成

MS培地の主要な塩類を1/2の濃度としたものを基本培地とし, Tanaka, R. と H. Ikeda¹⁹⁾ が用いた25蕃盤目法に従い, 第1表に示したようにBA及びNAAの濃度を25種類の組み合わせに設定した液体培地を調整した。この場合に用いた培養管は丸底試験管である。茎頂を含む頂芽もしくは腋芽部分を表面殺菌後, 実体顕微鏡の下で無菌的に茎頂(イセイモ: 大きさ約0.5mm, ワイルドライス: 同約1mm)を摘出した。次に上記の培地に置床後, 培養室内に設置した回転培養器で培養した。またワイルドライスでは上記の培地に矮化剤アンシミドール(0, 0.1, 1.0mg/l)を加え, 矮化剤の影響を検討した。2ヶ月間培養した後, 茎頂の生育状況を観察し苗条原基形成の有無を調査した。

第1表 苗条原基誘導のためのNAA及びBAの組み合わせ(mg/l)

NAA\BA	0	0.02	0.2	2.0	4.0
0	1	6	11	16	21
0.02	2	7	12	17	22
0.2	3	8	13	18	23
2.0	4	9	14	19	24
4.0	5	10	15	20	25

注) Tanaka, R. and H. Ikeda (1983) による25蕃盤目法

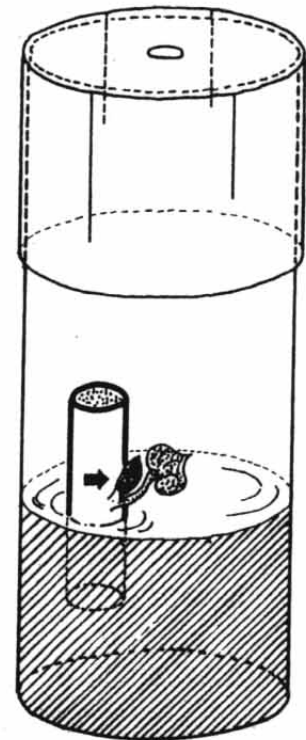
6. 多芽体形成

MS培地の主要塩類のうち, 硝酸塩成分を1/2の濃度としたものを基本培地とした固体培地を調製し, BAを2~50mg/l添加した。第1図に示したように茎頂培養によって得られたイセイモ幼植物から腋芽1つを有した茎切片を調製し, 培地に置床した。培養して1ヶ月後腋芽上に形成された多芽体を調査し, 次のように形成率を算出した。

多芽体形成率(%) = 10個以上の芽を有する多芽体数 / 2個以上の芽を有する多芽体数 × 100 さらにホルモンフリーの上記培地に移植し, 2, 4ヶ月間培養した後, 植物体再生個体を調査した。

7. カルス及び胚様体形成

植物ホルモンの濃度及び組み合わせの異なる25種類のMS固体培地を調製した。添加した植物ホルモンはイセイモではNAAとBA, ワイルドライスでは2, 4-DとBAである。それぞれの成植物から茎頂及び各部位を表面殺菌後, 上記の培地に外植体を置床して培養室内に静置した。培養して2ヶ月後にカルス形成の有無を調査した。再分化培地(胚様体誘導培地)は同様にMS培地を基本でオーキシシンを含まないか, 低濃度の培地を基本に植物ホルモン組成などについて検討した。また液体培養によ



第1図 腋芽を付けたイセイモ幼茎の培養(多芽体の誘導) 図中矢印: 腋芽部分

る胚様体誘導系については、イセイモでは液体培地によるカルの継代培養が不可能であったので、ワイルドライスについてのみ検討した。この場合先に2, 4-D, 2 mg/lを含むB5培地で継代中のカルスを胚様体誘導培地上に移植(重層)し、一定期間培養後得られた胚様体もしくは胚様体を含むカルスを再生培地(ホルモンを含まないMS培地)に移植した。培養2ヶ月後に植物体の再生状況を調査した。

結 果

1. 苗条原基形成

1) イセイモ

イセイモの茎頂を種々の植物ホルモン条件で回転培養したところ、早生分枝、緑色塊、白色塊、褐色塊、カルスなどが形成されたが、苗条原基は形成されなかった(第2表)。早生分枝は低濃度の植物ホルモンを添加した区で、緑色塊、白色塊は高濃度のBAを添加した区で、カルスは高濃度のNAAかつ低濃度のBAを添加した区でそれぞれ形成される傾向が強かった。また外植体の枯死は植物ホルモン無添加区や、高濃度添加区で認められ

第2表 液体回転培養におけるイセイモ茎頂の生長に及ぼすNAA及びBAの影響

NAA\BA (mg/l)	BA	外観 ^{a)}			
		0.02	0.2	2.0	4.0
1) 0.5rpm/2,000lux/16hrs日頂の場合					
0	D	Sh	Sh	Gr+D	Gr+D
0.02	Sh	Sh	Sh	Gr+D	Wh+D
0.2	Sh	Sh	Sh	Gr+D	Wh+D
2.0	Sh+C	Sh+C	Sh+C	Gr+D	Br+D
4.0	C	C	Gr+C	Gr+D	Br
2) 2.0rpm/7,000lux/24hrs日頂の場合					
0	D	Sh	Gr	Gr+Wh	Wh
0.02	Sh+C	Sh	Gr	Wh	Wh
0.2	C	Sh	Gr	Wh	Wh
2.0	C	Sh+C	Gr	Wh	Wh
4.0	C	Sh+C	Gr	Wh	Wh

a) 茎頂を培養2ヶ月後に形態を調査し、次のように表示した。

Br: 褐色体, C: カルス, D: 枯死, Gr: 緑色体, Sh: シュートの生長, Wh: 白色体, 回転培養器は、日本医科器械制作所製(1)及び大洋工業製RT-550型(2)で、各試験とも2反復で各々9-12個の茎頂供試した。

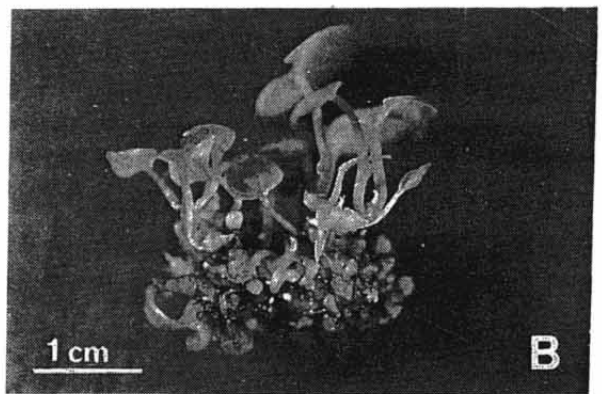
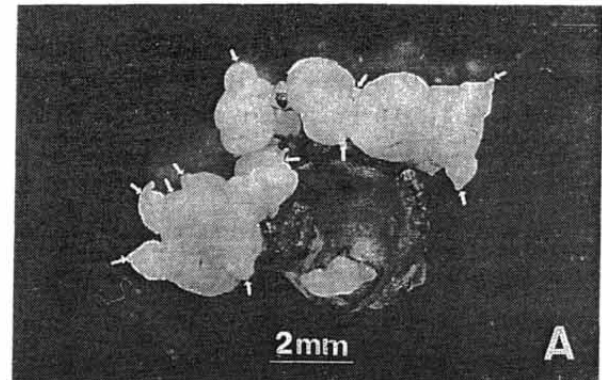
た。これらの中で、外部形態から見ると苗条原基に似た緑色塊の徒手切片を顕微鏡で観察した結果、いずれも早生分枝が塊状に変形した構造であることが明らかとなった。なおこの緑色塊から植物体の再生は認められず、白色塊も同様であった。早生分枝は、回転速度が0.5rpm、照度が200luxの場合には、BAを0-0.2mg/l, NAAを0-2mg/l添加した区で形成されたのに対し、回転速度が2rpm、照度が7000luxでは、BAを0-0.02mg/l, NAAを0-4mg/l添加した区で形成された。同様に回転速度・照度条件が異なると緑色塊・白色塊を形成するBA濃度に違いが見られた。

2) ワイルドライス

ワイルドライスについても同様の試験区で苗条原基の誘導を試みた結果、どの試験区でも早生分枝のみが形成された(第3表)。矮化剤であるアンシミドールを培地に添加し培養を行ったが、湾曲した早生分枝が形成されたにすぎず、苗条原基誘導の効果は認められなかった。

2. 多芽体形成(イセイモ)

前述したようにイセイモの腋芽(生長点)を高濃度のBAを含む培地で培養すると緑色塊を形成するのみでほとんど生長は認められなかった。一方、無菌のイセイモ



第2図 イセイモの腋芽を付けた幼茎の多芽体形成
A: 多芽体(図中矢印), B: 多芽体から再生した植物

第3表 液体回転培養におけるワイルドライス茎頂の生長に及ぼすNAA及びBAの影響

NAA\BA (mg/ℓ)	外観 ^{a)}				
	0	0.02	0.2	2.0	4.0
1) アンシミドール, 0mg/ℓの場合					
0	Sh	Sh	Sh	Sh	Sh
0.02	Sh	Sh	Sh	Sh	Sh
0.2	Sh	Sh	Sh	Sh	Sh
2.0	Sh	Sh	Sh	Sh	Sh
4.0	Sh	Sh	Sh	Sh	Sh
2) アンシミドール, 0.1mg/ℓの場合					
0	Sh	Sh	Sh~	B	Sh~
0.02	Sh	Sh	Sh~	B	Sh~
0.2	Sh	Sh~	Sh~	Sh	B
2.0	Sh~	Sh~	Sh	B	B
4.0	B	B	B	B	B
3) アンシミドール, 1.0mg/ℓの場合					
0	Sh	Sh	Sh~	B	Sh~
0.02	Sh	Sh	Sh~	Sh~	B
0.2	Sh	Sh~	Sh~	Sh~	B
2.0	Sh~	Sh~	B	Sh~	SB
4.0	Sh~	Sh~	B	B	B

注) 茎頂を培養4ヶ月後に形態を調査し、次のように表示した。

B: 褐変(枯死)

Sh: 健全なシュートの生長, Sh~: 湾曲したシュートの生長
 回転培養器は、日本医科器械制作所製で、各試験とも2反復で各々9-12ヶの茎頂を供試した。培養条件は、0.5rpm, 16hrsの日長で、照度が2,000luxである。

幼植物を得るために、腋芽を付けた幼茎を寒天培地に挿し木し、培養苗を維持していたが、この腋芽を持つ幼茎を高濃度のBAを含み、硝酸塩成分を1/2濃度にしたMS修正培地に移植したところ、第1図及び第2図に示したように腋芽部分に多芽体が形成された。この多芽体は茎頂由来の芽の集塊と考えられ、増殖手段として期待できる。1個の多芽体には10から15の芽が認められ、第4表に示したようにBAの濃度が高くなるにつれて多芽体形成率及び芽数が増加したが、5mg/ℓで最高値を示し10mg/ℓでは減少した。さらに多芽体部分を5芽程度に切り取り同培地に移植し継代培養したところ、多芽体の形態を維持しながら芽数で2ヶ月で4~5倍の増殖が可能であった(第5表)。植物ホルモンについてみると、BAを単独で添加した場合以外では、多芽体からシュートが伸長するケースが多く認められた。さらにこの多芽体をホルモンを含まない培地(修正MS培地)に移植した結果(第6表)、再生率はほぼ100%であった。ゲランガ

第4表 イセイモ多芽体誘導に及ぼすBA濃度の影響

BA (mg/ℓ)	2	3	4	5	10
形成率(%) ^{a)}	48	48	60	72	64
芽数(個) ^{b)}	5.0	6.7	8.9	13.8	7.8

a) 形成率については、培養1ヶ月後に10芽以上に増殖した多芽体を計数し、その百分率を表示した。

b) 芽数は、誘導されたすべての多芽体の芽を計数しその平均値を示した。

各濃度試験区とも25個の幼茎切片を用いた。

第5表 イセイモ多芽体の増殖に及ぼす植物ホルモンの影響

ホルモン組合せ (濃度, mg/ℓ)	増殖度(芽数/移植芽数)	
	1ヶ月後	2ヶ月後
BA (5)	2.7	4.6
2iP (5)	3.2	5.1
BA (5)+NAA (0.5)	3.5	4.9
BA (5)+アンシミドール (10)	2.7	4.5

各培地に5芽を持つ多芽体を移植した。

第6表 イセイモ多芽体からの植物体再生に及ぼすゲランガム濃度の影響

ゲランガム濃度(%)	植物体再生率(%)	草丈(cm)	展開葉数(枚)
0.1	96	3.31	4.63
0.2	100	3.57	4.20
0.4	100	2.77	3.84
0.6	100	2.60	3.64

ゲランガム^R, 和光純薬工業製

継代培養中の多芽体を5芽程度に切り取り、各濃度のゲランガムを含む培地(方法)に移植し、2ヶ月後に調査した。

ム濃度は0.1%~0.2%が再生に適しており、培養2ヶ月の再生植物体を順化試験に供試したところ、ほぼすべての個体が順化できるが、より効率的な順化方法について検討中である。

3. カルス及び胚様体形成

1) イセイモ

イセイモの茎頂(第7表)を寒天培地上で培養したところ、高濃度のNAA区でカルスの形成がみられ、緑色

から白色の粉状のカルス及び淡褐色の水浸状のカルスが形成された。粉状のカルスは形成量も僅かであり移植後も認められなかった。一方水浸状のカルスは、同培地でわずかに増殖することが認められたが褐変するものが多く、NAAを含まない培地に移植しても植物体の再生は認められなかった。また、このカルスをオーキシンを含まない固体培地に移植し培養したが、胚様体を全く形成せず植物体の再生は認められなかった。

2) ワイルドライス

オーキシンとしてNAAを用いた場合、どの試験区でもそのまま植物体に生長する胚が多くなったが、高濃度のNAA区でカルスが幼植物の基部にわずかに認められた(第7表)。また第8表に示したようにオーキシンとして2, 4-Dを用い、BAとの25組合わせの培地で培養したところ、高濃度の2, 4-D区で白色のコンパクトなカルスが形成された。ここで得られたカルスを同じ

第7表 イセイモ茎頂及びワイルドライス種子胚からのカルス誘導に及ぼすNAA及びBA濃度の影響

NAA/BA (mg/l)	外観 ^{a)}				
	0	0.02	0.2	2.0	4.0
1) イセイモ					
0	D	Sh	Sh	Gr	Gr
0.02	D	Sh	Sh	Gr	Gr
0.2	C	C	Gr	Gr	Gr
2.0	C	C	Gr	Gr	Gr
4.0	C	C	Gr	D	D

2) ワイルドライス

2.0	-	SR+C	SR~	SR~	-
4.0	-	SR+C	SR~	SR~	-

a) 外観調査は、培養2ヶ月後に行い次のように示した。(イセイモ)

C: カルス(イセイモで、白色~淡褐色のフライアブルなカルス)

D: 枯死, Gr: 緑色懇, Sh: シュートの生長

(ワイルドライス)

C: カルス(粒状のやや湿ったようなカルス)

SR: シュート及び根が伸長,

SR~: 異常なシュート及び根イセイモ茎頂及びワイルドライス種子胚をそれぞれ9-12個を供試した。

ホルモン組成の培地に移植し継代を開始したが良く増殖した。これらの継代中のカルスから3種類のカルスが誘導された。すなわち、①やや乾いた外観のコンパクトな粒状のカルス、②半透明の水浸状のカルス、③濃い褐色のフライアブルなカルスであった。これらのカルスの内コンパクトな粒状のカルスを2, 4-Dを減じた寒天培地で培養したところ、胚様体を形成し、さらに胚様体から植物体を再生した(第9表)。ところで、この植物体再生の過程について組織学的な観察(第3図)を行ったが、茎及び根のそれぞれの生長点と考えられる2方向性が認められた。また胚様体構造と想定した部分がピンセットで容易に分離できることなどから、胚様体を經由して植物体を再生したと考えられる。そこで、これをさらに詳細に検討するためカルスの性質について調査した。

ワイルドライス種子胚由来カルスの液体懸濁培養については、まず大槻⁴⁾の「うらごし法」の利用を試みた。

第8表 ワイルドライス種子胚からのカルス誘導に及ぼす2, 4-D及びBAの影響

2,4/D/BA (mg/l)	外観 ^{a)}				
	0	0.02	0.2	2.0	4.0
0	SR	SR	SR	S~	S~
0.02	SR	SR	SR~	SR~	S~
0.2	SR	SR+C	SR	SR~	S~
2.0	C	C	C	SR~	SR~
4.0	C	C	SR~	SR~	SR~

a) 外観調査は、培養2ヶ月後に行い次のように示した。

C: カルス(粒状のやや湿ったようなカルス),

S~: 異常なシュートで、根の伸長なし,

SR: シュート及び根が伸長,

SR~: 異常なシュート及び根

第9表 ワイルドライス種子胚由来カルスからの植物体再分化に及ぼす2, 4-D及びBAの影響

2,4-D/BA (mg/l)	再分化率(移植カルス片割合, %)		
	0	0.02	0.2
0	0	24	48
0.02	0	24	56
0.2	0	20	44
2.0	0	8	24

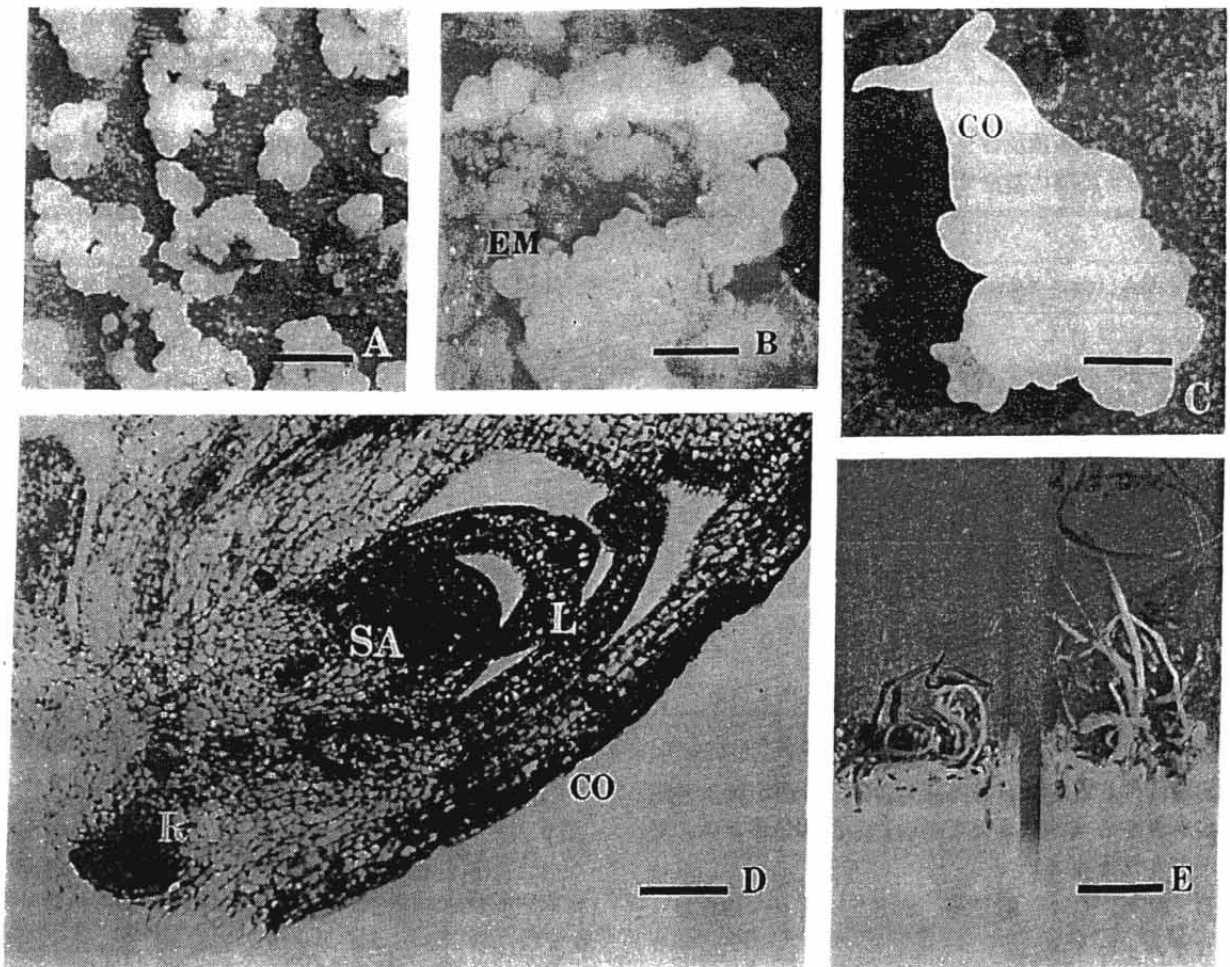
継代中のカルスを約5mmの切片とし、各培地に移植、1ヶ月後に調査した。

しかしながら、20メッシュの網で細分したカルスは褐変するものが多く、生存したカルス粒は2～3回の継代後、増殖を開始した。懸濁培養による継代中、①増殖率が高いが胚様体を形成する能力を失ったカルス（白色で粒が細かいものでうらごしを行っても褐変することがないカルス）、②増殖率は低いが胚様体形成能を維持しているカルス（粒が2～3mmで、前者よりかなり大きいカルス）の2種類のカルスが認められた。この胚様体形成能を持つカルスからの植物体再生率は、第10表に示したようにMS培地上でNAAが0.01mg/lでBAが1.0mg/lの場合に14.3%であった。しかしながら大半の胚様体が枯死するため、胚様体からの植物体再生率の向上が必要である。

考 察

1. はじめに

作物の増殖率を向上させるために古くから種苗大量増殖技術の改良が重ねられてきたが、最近では組織培養を利用した大量増殖法が試みられ、多くの成果が報じられている。大澤²⁾は組織培養による大量増殖法について取りまとめ、次の様に分類した。すなわち、増殖体（繰り返し継代培養を行うことにより同じ形態のものを増殖する）の構造の違いにより、①腋芽、②PLB、③苗条原基、④不定芽、⑤胚様体を利用した大量増殖法に類別している。これらの中で、PLBや不定芽を利用した種苗生産はすでにラン科植物や観葉植物で実用化されており、生産者への苗供給が行われている。本試験はイセイモ及



第3図 ワイルドライス種子胚由来カルスからの不定胚の形成

A：移植して4～5週後のコンパクトなカルス，B：2，4-D濃度を減じた培地に移植して形成された不定胚，C：生長した不定胚，D：不定胚の縦断面図，E：再生した植物。

図中記号，EM：不定胚，SA：茎生長点，RA：幼根，L：幼葉，CO：子葉鞘，

図中線，A：10mm，B：3mm，C：2mm，D：1mm，E：10mmを示した。

Hirano, M. and M. Khono (1990) から引用 (和訳)

第10表 ワイルドライス胚様体からの植物体再生の及ぼすNAA及びBAの影響

NAA/BA (mg/ℓ)	再生率 (カルス生存率) %			
	0.1	0.5	1.0	2.0
0.01	0 (10.7)	3.6 (3.6)	14.3 (14.3)	0 (0)
0.1	0 (14.3)	0 (14.3)	3.6 (25.0)	0 (7.1)
1.0	0 (89.3)	7.1 (85.7)	0 (85.7)	0 (82.1)

懸濁培養中のカルスをMS (ホルモンフリー) 固体培地に移植し、5日後各ホルモン組成の培地 (1/2 MS) に再移植して、植物体再生率を調査した。

各区とも28胚を供試した。

びワイルドライスの組織培養を行い苗条原基及び胚様体を搾取し、これらを利用した種苗の大量増殖法の可能性を検討したものである。苗条原基や胚様体は増殖率が高くかつ変異が少ないとされ大量増殖の手段として有望であり、実用化に向けて研究が進められている。特に苗条原基は永続的な増殖が可能なことや、苗条原基から容易に苗化できることから、種苗の大量増殖法として注目されている。また胚様体は組織培養によって形成される胚状の構造で、大量生産が可能なことや、胚様体の人工種子化が可能なことから大量増殖の手段として期待されている。

2. 苗条原基の形成

苗条原基はTanaka, R. and H. Ikeda¹⁸⁾によって作出された増殖体で、ハプロパップス (キク科植物) の茎頂を回転培養することによって初めて得られた魂状の構造である。この苗条原基は生長点由来の分裂組織からなっており、苗条原基を分割すると、さらに新しい苗条原基を形成するので、これを繰り返すことにより、永続的に苗条原基を増殖することが可能である。現在までにハプロパップスの他にイネ、トウモロコシ、アスパラガス、キク、ハウレンソウ、など多くの科 (属種) で苗条原基が作出されている⁶⁾。そこで、本研究ではTanaka, R. and H. Ikeda¹⁸⁾の手法にしたがって、各種濃度の植物ホルモンを含む液体培地中でイセイモ及びワイルドライスの茎頂を回転培養したが、苗条原基を誘導することはできなかった。イセイモでは緑色魂、白色魂などが誘導されたが、これらはいずれも組織学的な観察の結果、いずれも早生分枝が魂状に変形した構造であることが判明した。イセイモ及びワイルドライスの苗条原基を形成する培養条件を見いだすことはできなかった理由について、両植物ともに早生分枝 (植物体) になる性質が強いため、苗条原基化しにくいことが考えられる。

3. 多芽体の形成

第2図に示したように、腋芽を付けた幼茎を高濃度BAを含むMS修正培地で培養したところ腋芽部分に多芽体を形成することが明かとなった。この多芽体がイセイモの増殖手段として有用と考え、ホルモン条件などについて検討した。1つの多芽体は10~15の芽からなり、この多芽体を分割し、移植することにより多芽体の形態のまま増殖し、さらに多芽体から植物体が再生した。多芽体は、増殖率が試験管内における幼茎の挿し木による繁殖に比べやや高く5~6培地であり、イセイモの種苗の増殖の手段として有望であると考えられる。しかしながら多芽体を増殖手段として利用するには多芽体を手作業で分割しなければならず非効率的であることが指摘されている。これを解決するには液体振とう培養によって多芽体が培養液中で効率的に増殖する培養系が必要になる。多芽体の液体培養系の確立が必要であるが、現時点では、多芽体の形態を維持しながら、増殖する液体培養系を見出だしていない。また多芽体分割後、効率的に植物体を再生するには、分割方法や分割時期、分割した多芽小片からの植物体再生などを検討すべきである。

4. 胚様体の形成

1) イセイモ

イセイモでは白色及び淡褐色カルスを誘導し、これらのカルスを培地組成を変えて培養したが、カルスから胚様体を誘導することはできなかった。

Dioscorea属 (ヤマノイモ) では大澤ら³⁾やNagasawaら¹⁴⁾がカルス由来の胚様体や植物体を形成させている。とくにNagasawaら¹⁴⁾はナガイモ (*Dioscorea opposita* Thumb) の外植体から2, 4-Dを含む培地でembryogenicなカルスを誘導し、液体培地でこのカルスを培養することによって胚様体を形成させた。さらに彼らは、このembryogenicなカルスを液体培養系で維持・継代することによって成功している。同じ

Dioscorea属であるイセイモ (*Dioscorea opposita* Thumb) もカルスを形成したが、ナガイモで得られたようなembryogenicなカルスを誘導できなかったため、胚様体の形成は見られなかった。

2) ワイルドライス

ワイルドライスでは種子中の完熟胚からコンパクトなカルスを形成し、このカルスから胚様体状の構造が形成された。同じジザニア属植物では、多年性の*Z. latifolia* (和名、マコモ) で胚様体を形成する能力を持つカルスが誘導された報告がある^{15)・9)}。これらの報告の中で不定胚を同定したようにワイルドライスでも、①カルスから分離することができる独立した構造であること、②解剖所見の結果、2極構造をとることなどの理由から、カルスから形成された胚様体と判定した。しかしながらイネ科植物のカルスからの植物体再分化系について胚様体を形成しているか否かは、種子胚の生長過程と組織学的に現密な類似性の比較が必要である¹⁰⁾。単細胞からの胚様体形成が可能であれば胚様体形成及び植物体再生の過程の確認がより容易になり、またより効率的な大量増殖のためにも液体懸濁培養系の確立が必要である。

一般に胚様体の発達過程は大きく2つに分かれ、双子葉植物では、球状胚、魚雷状胚、心臓状胚を経て植物体になり、単子葉植物では、球状胚、穀粒型胚、棒状胚、子葉期胚を経て植物体へと分化する^{6)・16)}。今回の試験ではワイルドライスの胚様体の生長過程を連続的に観察することはできなかったがワイルドライスの胚様体が典型的な単子葉植物の胚様体発達過程をとるか否かを確認する必要がある。胚様体の発達過程を確認することは、今後、ワイルドライスの胚様体から均一な植物体を育成するには胚様体のステージを揃え、形態形成の同調化を行う技術が必要になるからである。また今回の試験で、カルスから胚様体の形成率及び胚様体から植物体の再生率が低かったが、胚様体を種苗の大量増殖の手段として利用するには、胚様体系率及び植物体再生率を更に向上する必要がある。

摘 要

1) 組織培養法を利用したイセイモ及びワイルドライスの種苗の大量増殖法を確立するため、苗条原基、胚様体の作出を試みた。その結果、イセイモでは腋芽培養によって多芽体が得られ、ワイルドライスでは、種子胚から得たカルスに胚様体が形成された。

2) 両植物の茎頂組織を、液体培地で照明下において回転培養したが、両植物とも苗条原基は得られなかった。

3) イセイモ液芽を高濃度でサイトカイニン (5 mg/ℓ BA) を含む固体培地で培養すると、10~15の芽を含

む多芽体が形成された。これらの多芽体をホルモンフリー培地で培養したところ幼植物を得た。

4) イセイモ、ワイルドライスの外植体を固体培地で培養したところ、イセイモでは茎頂及び茎片から白色あるいは淡褐色のカルスを、ワイルドライスでは完熟胚からコンパクトな白色粒状のカルスを誘導した。イセイモのカルスからは、胚様体を誘導することはできなかったが、ワイルドライスのカルスを高濃度 2, 4-D (4 mg/ℓ) を含む液体培地で培養し、さらにこのカルスを低濃度 2, 4-D (0.02mg/ℓ) を含む固体培地で培養したところ、胚様体が形成された。

謝 辞

本研究は農林水産省地域バイオテクノロジー研究開発促進事業による助成を得て行われたものである。ここに記して謝意を表す。また、本研究を行うにあたり、有益な助言を頂いた、三重県農業技術センター総括研究調整監 石黒一郎氏、同経営部長 伊藤雄一氏、同資源開発部長 橋本敏幸氏に厚くお礼申し上げる (いずれも1992年3月現在の所属)。

本文脚注

ワイルドライスについては、一部を第11回日本植物組織培養学会大会・シンポジウム (1989年) で講演 (平野、河野)⁷⁾ し、その詳細を植物組織培養学会誌 (1990年) に発表した (Hirano and Khono)⁸⁾。

参考文献

- 1) Alang, Z., C. and B. Krishnapillay (1987): *Plant Tissue Culture Letters*, 4, 32~34
- 2) 大澤勝次 (1988): 農業及び園芸, 63, 92~96
- 3) 大澤勝次, 栗山尚志, 菅原祐幸 (1981): 野菜試験場報告, A 9, 1~46
- 4) 大槻義昭 (1990): 実験映像マニュアルイネ・プロトプラスト培養系 (解説), 東京, 社団法人農林水産技術情報協会
- 5) Gamborg, O., R. A. Miller and K. Ojame (1968): *Exp. Cell Res.*, 50, 151~158
- 6) 樋口春三 監修 (1988): 植物組織培養の世界—専門家のためのその技法と実際, 東京, 柴田ハリオ硝子株式会社
- 7) 平野三男, 河野満 (1989): 第11回日本植物組織培養学会大会・シンポジウム講演要旨集
- 8) Hirano, Mitsuo and Mitsuru Khono (1990): *Plant Tissue Culture Letters*, 7 (2), 69~73
- 9) Jong, Tru-M. and Wei-C. Chang (1987):

- J.Plant Physiol.), 130, 67~71
- 10) Kondo, K., S. Nadamitsu, R. Tanaka and K. Taniguchi (1991) : *Plant Tissue Culture Letters*, 8, 1~4
 - 11) 前田英二 (1989) : イネに不定胚形成は存在するか, 第11回日本植物組織培養学会大会・シンポジウム講演要旨集
 - 12) Murashige, T. and F. Skoog (1962) : *Physiol. Plant*, 15, 473~497
 - 13) Murayama, T. (1989) : *Plant Tissue Culture Letters*, 6, 152~154
 - 14) Nagasawa, Akitsu and John J. Finer (1989) : *Plant Science*, 60, 263~271
 - 15) Nakata, K., N. Saito, and S. Nakamura (1986) : *Jpa. J. Breed.*, 36 (suppl. 1) 14~15
 - 16) 西村繁夫, 斎藤猛雄, 山口真美子 (1990) : バイオホルティ, 5, 9~15
 - 17) 農林水産省農林水産技術会議事務局振興課 (1991) : 地域バイオテクノロジー研究開発促進事業研究成果
 - 18) Tanaka, R. and H. Ikeda (1983) : *Jpn. J. Genet.* 58, 65~70

英文表題, 著書名及び所属

Studies of the Micro-Propagation of Chinese Yam, Ise-imo (*Dioscorea opposita* Thumb.) and American Wild Rice (*Zizania palustris* L.) by tissue culture.

1) Formation of multiple shoots from a shoot tip of yam and somatic embryos from callus of Wild Rice

Mie Agricultural Reserch Center
530 Kawakita, Ureshino-cho, Ichishi-gun,
Mie, Japan

Mitsuo HIRANO, Nobuo TATEMATSU, Hideo HATTORI, Fugio HASHIZUME and Mitsuru KHONO

SUMMARY

The primary purpose of this study was to produce shoot primordia and somatic embryos from both Chinese yam (Ise-imo) and American Wild rice by tissue culture. Somatic embryos were successfully produced from matured embryos of Wild rice but not from yam. Shoot primordia were not obtained from both plants. In stead, multiple shoots were obtained from auxillary buds of explants which developed from shoot tips of yam cultured under the axenic condition. Experimental results are summarized as follows,

1) Meristematic tissues of both plants were cultured in a liquid medium by a gentle rotation (0.5 or 2.0 rpm) under illumination (2,000 or 7,000 lux). Under these conditions shoot primordia were not produced from either plant.

2) Multiple (10 to 15) shoots emerged from an auxillary bud, when a yam shoot segment of the auxillary bud, which had been grown on the MS solid medium previously, was transferred to the modified MS solid medium containing 5mg/ℓ BA. Yam plantlets were successfully obtained from the multiple shoots on the BA-free MS solid medium 1 to 2 month after the onset of incubation.

3) Callus developed from both mature embryos of wild rice and explants of yam. The former was white, globular and compact, while the latter white to light brown friable. Somatic embryos differentiated only from the callus of wild rice which had been previously reproduced in the MS liquid medium containing 4mg/ℓ 2,4-D and then transferred to the modified MS medium containing 0.02mg/ℓ 2,4-D, followed by incubation for about 1 month. A further incubation of the somatic embryos on the 2,4-D free MS solid medium allowed plantlets to grow. Various attempts to induce the differentiation of the yam callus were all unsuccessful.