

# ニンジンの子葉に浸透圧処理で誘導される不定胚形成への光条件の影響

佐藤 浩二\*・内山 千代子\*・大王 純一\*・高原 美規\*・山元 皓二\*

The effect of light conditions on somatic embryogenesis induced by osmotic treatment in *Daucus carota* L.

Kouji SATOH, Chiyoko UCHIYAMA, Jun-ichi DAIO, Yoshinori TAKAHARA, Koji YAMAMOTO

It is important for *in vitro* cultures of plant tissue to control the cultural condition such as the light condition. In the experiments, we used a culture system which could induce somatic embryogenesis by high osmotic treatment without phytohormones. We studied the effect of light conditions on somatic embryogenesis, that is, we investigated when and where somatic embryos would emerge. The results are indicated that the rate of embryogenesis was affected by light condition in the seedling period, but not in the culture period. Moreover, the light exhibited its negative effect on induction of somatic embryos when seeds were exposed to light after germination. In histological study, the embryogenesis took place on epidermal cells in 4 days after osmotic treatments, and we confirmed that a somatic embryo was derived from a single epidermal cell. These findings suggest that the epidermal cells of cotyledons of seedlings raised under light were not competent to react to osmotic pressure and grow into embryos.

**Key words:** somatic embryogenesis/ osmotic pressure/ light conditions/ *Daucus carota* L.

## 1. 緒 言

植物組織培養を行う上で、培養環境の設定は組織の生育や器官形成にとって重要である。培養環境として重要な因子の一つが光である。光の強弱により植物体の生育が左右される例は数多くあり、カルスの培養、プロトプラストの分裂促進などには一般的に24時間連続暗条件が使われる。我々はキュウリ (*Cucumis sativus* L.) の不定根形成における光条件の検討を行ったところ、不定根の形成は光照射の有無により影響されることが分かり、日長には影響されないことを示した<sup>1)</sup>。しかし Hirano and Kohno<sup>2)</sup> は、ワイルドライス (*Zizania palustris* L.) のカルス誘導の際の光条件の影響を調査した際には、日長の影響が見られたと報告している。

1958年にStewardらにより、植物ホルモンを用いることでニンジン<sup>3)</sup>の不定胚が形成されることが報告された。その後多くの植物種において植物ホルモンを用いて不定胚形成の報告がなされ、植物クローンの大量増殖が可能となった。しかし植物ホルモンは細胞が不定胚形成能を獲得する上で必須である一方、再生個体は染色体異常を持つことが多い<sup>3)</sup>。そのためできた再生個体が完全に遺伝的に同一なものではなく、組織培養

の商業的な利用は限られたものとなっている。

近年ニンジンにおいて、植物ホルモンを用いることなく不定胚が誘導されることが示された。その手法は植物ホルモンを組織に与える代わりに、組織をストレス状態にしそれを解除することで、組織から不定胚を誘導するという方法である。この際のストレスとは、浸透圧<sup>4)</sup>、NaCl<sup>5)</sup>、重金属<sup>6)</sup>、高温状態<sup>7)</sup>、次亜塩素酸処理<sup>8)</sup>である。これら手法は、植物ホルモンによる変異を避けることができ、植物の胚形成を研究する上でのモデルシステムとして有効であろう。

本実験ではストレスの中でも浸透圧に着目した。浸透圧による誘導方法は他の実験系では見られない子葉からの不定胚形成が観察されている。しかし浸透圧による誘導方法での光条件の影響は報告されていない。そこで、本実験では光条件により浸透圧処理で誘導される不定胚形成がどのように変化するかに着目し実験を行った。

## 2. 材料及び方法

### 2.1 植物体材料

ニンジン (*Daucus carota* L. MS春蒔五寸) の種子を70%エタノールで1分間、有効塩素濃度2%のアンチホルミン溶液で20分間表面殺菌した。滅菌水で2回すすぎ、基本培地に置床して25℃で発芽させた。置床1週間後の実生から子葉を採取し、8mm程度に切り分け外植片とした。

原稿受付：平成11年5月25日

\*長岡技術科学大学 生物系

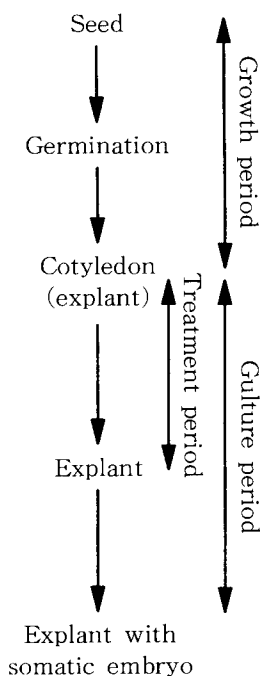


Fig. 1 Scheme of the experimental procedure

## 2. 2 実験方法

### 培地条件

2% (0.09M) スクロースを添加しpH5.8に調整したMS培地<sup>9)</sup>に、0.2%ゲランガムを加えて固体培地としたものを基本培地として用いた。また6, 12, 20, 24, 36% w/vのスクロースを添加しpH5.8に調整したMS培地に、0.2%ゲランガムを加えて固体培地としたものを浸透圧処理培地とした。培養にはいずれも直径9cmのプラスチックシャーレを使用し、1シャーレあたりの培地量は20mlとした。

### 浸透圧処理

外植片を浸透圧処理培地に置床し、1, 2, 3週間培養した。その後処理した外植片は基本培地に継代し、3ないし4週間培養した。継代は1週間間隔で行った (Fig. 1)。

### 光条件

実験に用いた光条件は、連続暗条件と13時間日長 (明条件と呼ぶ) の2条件とし、幼植物体栽培時と培養時との光条件を組み合わせ、合計4条件設定し実験を行った (Fig. 1)。また幼植物体栽培時の明条件をさらに発芽前または発芽後のみとする実験を行った。

外植片は1シャーレにつき10個の外植片を置床し、1条件につき20個の外植片を用い、実験は2回繰り返

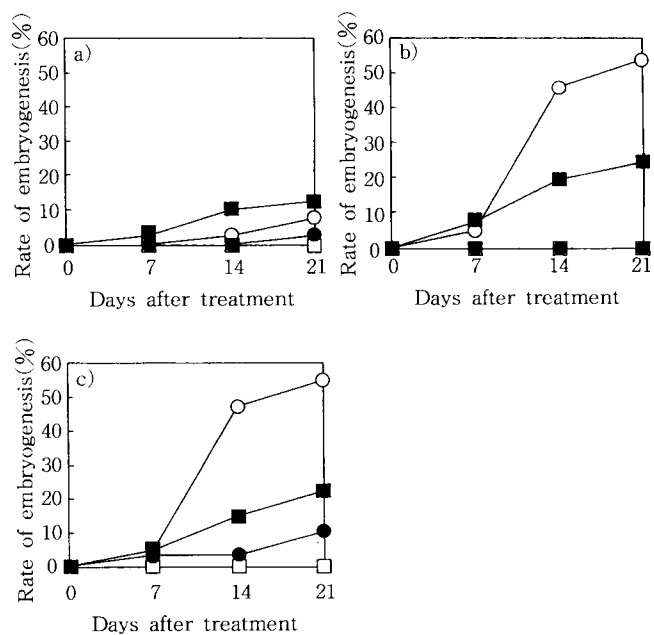


Fig. 2 The effect of sucrose concentrations and treatment periods on embryogenesis

Explants were treated by MS medium supplemented with some sucrose concentrations for 7 days (a) or 14 days (b) or 21 days (c). After treatment, explants were incubated in MS medium supplemented with 2% w/v sucrose.

closed circles: 6% w/v sucrose, closed square: 12% w/v sucrose, open circles: 24% w/v sucrose, open squares: 36% w/v sucrose

The rate of embryogenesis(%)=(No. of explant with embryos/No. of total explant) X 100

して行った。外植片の観察は実体顕微鏡を用いて経時的に行った。

## 2. 3 組織学的観察

試料をFAA溶液 (70%エタノール:酢酸:ホルムアルデヒド=90:5:5) で固定した。固定した試料をn-ブタノールシリーズにより脱水、置換した後パラフィン包埋切片法により、組織を観察した。染色はヘマトキシリンで行い光学顕微鏡で観察し、写真撮影をした。

## 3. 結 果

### 3. 1 最適培養条件の検討

Kamadaと共同研究者の報告では、US春時五寸を用いているのに対し、我々はMS春時五寸を用いたので、初めに最適培養条件を検討した。Fig. 2に最適スクロース濃度と浸透圧処理期間の検討結果を示す。

最適スクロース濃度は、24%でもっとも不定胚形成率が高く、12%でも不定胚形成が見られた。しかし6%では不定胚はほとんど形成せず、36%については、不定胚はまったく形成しなかった。不定根の形成は不定胚と逆に6%のものをもっとも良好であり、濃度の

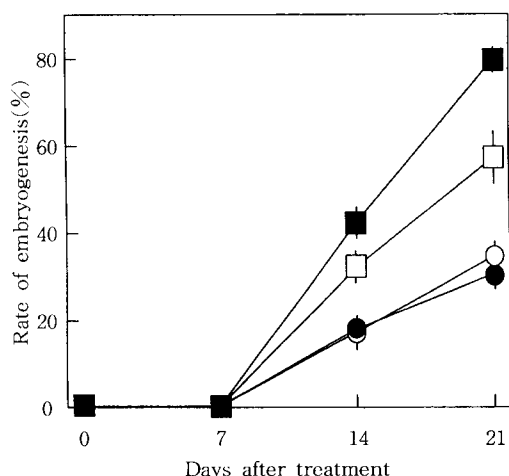


Fig. 3 The effect of light conditions on embryogenesis

Explants were treated by MS medium supplemented with 24 % w/v sucrose during 14 days. After treatment, explants were incubated on MS medium supplemented with 2 % w/v sucrose.

open circles : light (under growth period)-light (under culture period), closed circles : light-dark, open squares : dark-light, closed squares : dark-dark

上昇とともに減少した(結果未掲載)。また36%においては不定根の形成も見られなかったことから、外植片自体が枯死したと思われる。また本実験とは別にスクロース濃度10, 15, 20, 25%においても同様の実験を行った結果、スクロース濃度20%で形成率が良好であった<sup>10)</sup>。

スクロース濃度6%では、3週間処理したものにおいて、不定胚形成が見られるが、ごくわずかであり、1, 2週間処理と大きな違いはなかった。しかし12%あるいは24%濃度では、1週間処理したものと2, 3週間処理では胚形成能に大きな違いがあり、処理期間の影響が大きいことが示された。

この結果から、光条件の影響を調べる実験ではスクロース濃度24%か20%で処理し、処理期間は2週間で行った。

### 3. 2 不定胚形成への光条件の影響

2週間浸透圧処理した後の外植片からの不定胚形成率を、Fig. 3に示す。実体顕微鏡を用いた観察によると幼植物体栽培時や培養時の光条件に関係なく処理後10日前後から球状胚の形成が見られ、その後3週間まで経時的に不定胚の形成が見られた。それに対し不定胚の形成率は光条件により影響を受けた。幼植物体栽培時の光条件で比較すると、暗条件のものは明条件のものと比較し、培養時の光条件に関係なくおおよそ2倍程度の形成率を示した。それに対し培養時の光条件で比較すると、暗条件下で培養した方が不定胚形成率

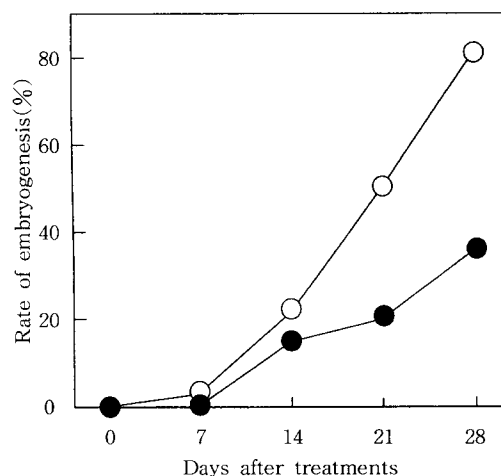


Fig. 4 The effect of light conditions under growth period on embryogenesis

Explants were treated by MS medium supplemented with 20 % w/v sucrose during 14 days. After treatment, explants were incubated on MS medium supplemented with 2 % w/v sucrose.

open circles : light (before germination)-dark (after germination), closed circle : dark-light

は若干高いが、幼植物体栽培時の光条件と比べ大きな影響は見られなかった。

上の結果より、幼植物体栽培時の光条件が不定胚形成率に影響することが分かった。しかし幼植物体栽培時のどの段階で光の影響があるのかがはっきりしない。そこで、幼植物体栽培期間を2つに分け、光条件の影響を調査した。今回用いた種子は発芽するまで5日程度要することから、発芽前の光条件と発芽後の光条件との影響を確認した。その結果をFig. 4に示す。不定胚形成率は、発芽後に明条件下で生育させた方が、発芽前に明条件下で生育させたものより形成率が低くなった。また発芽前に明条件下で生育させたものの形成率は、先の結果(Fig. 3)の幼植物栽培時に連続暗条件下で生育させたものほとんど変わりがなかった。このことは発芽前の光条件は、不定胚形成率に影響しないことを示している。また発芽後に明条件下で生育させたものでも、先の結果(Fig. 3)の明条件下で生育したものと同形成率に変わりがなかったことが示された。このことは不定胚の形成率に対しては、発芽後の光条件が影響することを示している。

### 3. 3 不定胚形成の組織学的観察

子葉の形成を組織学的観察により不定胚形成部位や形成時期の決定を行った(Fig. 5)。浸透圧処理直後の子葉は原形質分離しており、それは処理後1日目でも若干見られた。子葉は処理後基本培地で培養中に、長軸方向に伸長することが観察されている。処理後4

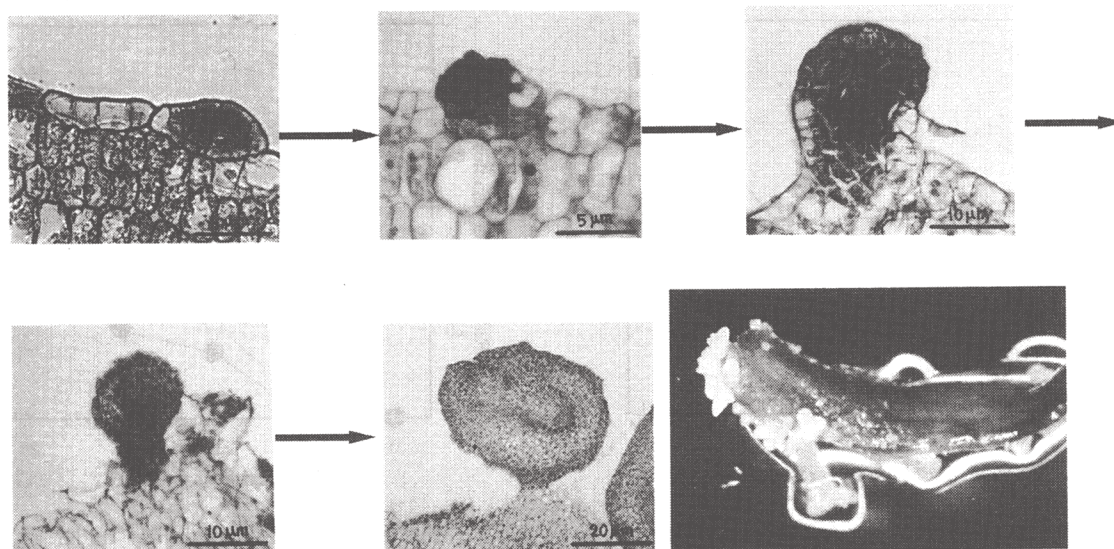


Fig. 5 Scheme of embryogenesis induced by osmotic treatment

日目では、子葉の伸長方向に対し、垂直に分裂面ができるように細胞分裂していた。その細胞は細胞数を増やすような分裂をし、9日目には、球状胚へと発達していった。この状態の頃から実体顕微鏡下で不定胚を確認できる。その球状胚は発達し魚雷胚へと発達していった。

#### 4. 考 察

ニンジンを用いた浸透圧による胚形成は、次の3つの要因により影響されることが分かった。(1)浸透圧処理に用いるスクロース濃度、(2)浸透圧処理期間、(3)幼植物体栽培時の光条件である。また形成する不定胚が表皮細胞由来であり、一細胞起源であることも確認できた。

##### 4. 1 スクロース濃度の胚形成率への影響

浸透圧処理による胚形成では、浸透圧処理の期間と処理濃度が必要であることが確認出来た。浸透圧はスクロース濃度20%から24%程度でもっとも胚形成が良好であり、7日以上浸透圧処理が必要である。このときの浸透圧により胚形成を誘導するための因子が問題となる。

植物は周囲の環境に対し様々な反応を示す。浸透圧の変化にも感受性を持ち様々な反応を示すが、その代表的なものとして植物ホルモンの一つであるアブシジン酸 (ABAと呼ぶ) の蓄積があげられる。ABAは、ニンジンの培養細胞において胚形成能を持つ細胞に高濃度で蓄積していることが知られており<sup>11)</sup>、浸透圧による胚形成はABAが関与する反応ではないかと考え

られる。今回の実験ではスクロース濃度が低い場合には、処理期間を長くしても胚形成が大きく変化しないという結果が得られた。この現象は、低い浸透圧ではABAの蓄積が誘導されず胚形成能を獲得できないことを示しているように見える。

一方浸透圧によるABAの蓄積は、浸透圧処理後短時間に誘導されることが知られている<sup>12)</sup>。しかし今回の結果では、浸透圧処理開始後少なくとも7日以上処理期間が、不定胚形成には必要である。つまり胚形成能の獲得には、ABA蓄積後7日以上処理期間を要することを示唆している。また我々はニンジンの子葉を直接ABAで処理を行った場合、不定胚形成が見られるが表皮細胞からの形成は見られないことを確認した<sup>13)</sup>。この結果は表皮細胞からの不定胚形成能の獲得には、ABAの蓄積だけでは形成が見られないことを示唆しており、ABAの蓄積が細胞に胚形成能を獲得させるための直接的な因子とはなり得ないか、他の要因との相互作用により胚形成を誘導することを示しており、つまり浸透圧により誘導される表皮細胞由来の不定胚形成は、ABA以外の因子 (植物ホルモン、代謝活性、細胞構造など) が大きく関与しているであろう。

##### 4. 2 胚形成への光の影響

今回の実験では、不定胚を植物ホルモンを用いずに誘導する際に、光条件がその形成率にどのように影響するかを確認した。その結果、培養時の光条件は、不定胚形成には大きな影響はなく、幼植物体栽培時の光条件が不定胚形成に影響し、さらに幼植物体栽培時でも、発芽後の光条件が形成率に影響をしていることが

確認できた。我々はすでに、キュウリの不定根形成に対する光の影響を調査した<sup>1)</sup>。その結果、幼植物体栽培時の光条件は暗条件の方が形成率が高く、培養時の光条件では暗条件の方が良好であることを明らかにした。特に培養時の光条件では、明条件下ではオーキシンの効果が抑制され、暗条件下ではサイトカイニンの効果が抑制されていると考察した。不定胚と不定根という違いはあるが両者の結果を比較すると、器官形成を良好にするには、幼植物体栽培時の光条件が暗条件であることが示唆された。また培養時の光条件に関しては、今回の結果では大きな影響が見られなかったことからキュウリでの結果とは相反しているように見える。これは今回の実験はホルモンを用いていないことが原因であると考えられる。

幼植物体栽培時に暗条件とすることが、なぜ胚形成に有効であるかが問題となる。本実験結果より幼植物体栽培時の光条件の調査において、発芽後の光条件が胚形成に影響を与え、発芽前の光条件は影響しないことが示された。このことは発芽後の光照射が、浸透圧処理により誘導される胚形成能を抑える効果を持つことを示している。

培養には若い組織を用いる方が良いと一般的に言われている。このことは重金属<sup>5)</sup>や温度処理<sup>6)</sup>による不定胚形成においても、不定胚は頂芽から形成しており、成長点は発芽後の植物体内で唯一未分化で未熟な組織であることから分かる。しかし今回の実験では幼植物体栽培期間は実験において一定であることから、組織の日令は一定である。つまり初期生育での成熟は日令による影響が少ないことを示している。

ニンジンは光発芽性でないため発芽は温度と水分で制御されている。そのため種子の段階での光照射を、種子内の胚が感じることはできても、それが発芽段階を制御する因子とはなっていないか、弱い影響しか与えないといえる。それに対し発芽後においては、光により子葉の伸長、緑化という次の発達段階へ進んでしまい、暗条件で生育させたものとは、子葉の発達段階に違いが生じていると考えられる。つまりニンジンの初期生育は発芽の前後で光に対する反応が異なり、発芽後子葉への光照射の有無は子葉組織の分化段階や発達段階に違いを生む原因となっているのに対し、発芽前では影響しない。この違いが発芽後の子葉への光照射による胚形成率の減少の原因であると考えられる。よって今回の実験結果は、組織の分化状態の違いが浸透圧による胚形成にも影響を与える要因となることを示唆している。

## 5. ま と め

今回の実験により、ニンジン浸透圧処理による不定胚形成は、浸透圧処理濃度と期間、そして幼植物体栽培時の光条件により影響されることが明らかになった。またこの実験系を用いた組織培養において、他のセリ科でも不定胚が形成することが明らかになっているので<sup>14)</sup>、セリ科における不定胚形成の培養系としては有効であると思われる。今後他の植物種において、浸透圧処理による不定胚形成の有無を調査することが必要であろう。さらに浸透圧処理により誘導される不定胚形成経路を調査する事により、植物ホルモンで誘導される不定胚形成経路だけでなく浸透圧処理による形成経路についても明らかになるであろう。

## 参考文献

- 1) 佐藤浩：長岡技術科学大学大学院 修士論文
- 2) Hirano, M. and Kohno, M., *Plant Tissue Culture Letters*, 7(2):69-73, 1990
- 3) Stanford, A. and Warren, G., *Plant Cell and Tissue Culture*, Open University Press, Buckingham, 1991
- 4) Kamada, H., Ishikawa, K., Saga, H. and Harada, H., *Plant Tissue Culture letters* 10: 38-44, 1993
- 5) Kiyosue, T., Kamada, H. and Harada, H., *Plant Tissue Culture letters*, 6: 162-164, 1989
- 6) Kiyosue, T., Takano, K., Kamada, H. and Harada, H. *Can J. BOT.* 68: 2301-2303, 1990
- 7) Kamada, H., Tachikawa, Y., Saitou, T. and Harada, H., *Plant Tissue Culture letters*, 11: 229-232, 1994
- 8) Kiyosue, T., Kamada, H. and Harada, H., *Plant Tissue Culture letters*, 6: 138-143, 1989
- 9) Murashige, T. and Skoog, F., *Physiol. Plant.* 15: 473-497, 1962
- 10) 大岡 久子, 若井 敦子, 佐藤 浩二, 高原 美規, 山元 皓二 *育種雑誌*, 48(別冊2): 264, 1998
- 11) Kamada, H. and Harada, H., *Plant and Cell Physiol.* 22: 1423-1429, 1981
- 12) Cachorro, P., Martinez, R., Oritiz, A. and Cerda, A. *J. Plant Growth Regul.* 14: 99-104, 1995
- 13) 佐藤 浩二, 高原 美規, 山元 皓二: *育種雑誌*, 48(別冊2): 265, 1998
- 14) 佐藤 浩二, 若井 敦子, 安田 勝成, 高原 美規, 山元 皓二 *育種雑誌*, 47(別冊2): 363, 1997