

緒 論

1970年代に入って遺伝子組換え技術や効率的なDNA塩基配列決定法が開発されて、分子生物学が高等動植物の育種にも急速に取り入れられてきた。いわゆる「バイオテクノロジー」は今や農業分野で家畜や作物の品種改良に広く活用され始めており、今後ますます発展することが期待される。

特に作物育種の分野ではクローン化された有用遺伝子を導入する新品種の育成に大きな期待が寄せられている。遺伝子組換え技術と細胞組織培養技術はタバコのような特定の作物ではすでに可能となったが、実際に組換え作物が一般化するにはなお解決されねばならぬ問題が多い。諸外国ではすでに1000件以上の組換え作物について野外実験が実施されつつあり、それらの特性や安全性が検討されている。

一方、我が国ではタバコモザイクウイルス (TMV) 抵抗性遺伝子を組み込んだトマトが農林水産省の隔離圃場で試験されるようになり、キュウリモザイクウイルス (CMV) 抵抗性のペチュニアおよびメロン、縞葉枯病抵抗性のイネといった組換え体が隔離圃場で試験される段階に入った。

現在のところこれらの組換え作物の多くはウイルスの外被タンパク質遺伝子や除草剤耐性遺伝子が導入されたものであるが、今後はウイルス以外の耐病性や耐虫性、耐冷性をはじめ各種のストレス耐性遺伝子や品質・成分関係の遺伝子などの導入が進むものと思われる。

北海道では比較的早期に農業研究へバイオテクノロジーの導入が始まり、1984年には、他府県に先駆けて道立中央農業試験場にバイオテクノロジー研究室が設置されて、先端技術開発研究プロジェクトがスタートした。その後、1987年には生物工学部と名称を改め、現在に至っている。

本研究は、上記の先端技術開発研究プロジェクトの一つとしてマメ類の細胞組織培養技術の確立のために始まり、特に北海道で重要なアズキの育種へバイオテクノロジーを導入するためにその基礎技術として細胞組織培養法と遺伝子導入法の開発が行われた。

アズキ (*Vigna angularis* OHWI & OHASHI) はダイズと同様に極東アジアにおいて古くから栽培されてきた作物であり、北海道においては主要な畑作物の一つとして重要である。1992年現在における北海道の作付面積は29,600 haであり、その生産量は49,000トンで全国の

77%を占めている。ダイズが世界的な作物となり広く栽培されているのに対して、アズキは現在においても極東アジア地域を中心に栽培され、食文化的にもユニークな作物で(原, 1987)、日本の特産物と言ってよい。北海道産のアズキはその良質性から輸入アズキに比較して消費流通業者の評価が高く、伝統的な餡製品の原料として根強い人気を誇っている。

しかし、北海道におけるアズキ栽培は、度々起こる冷害と転換畑での作付の拡大等による病害虫の発生によって、その生産が不安定であり、それがアズキ相場の乱高下をもたらし、畑作経営上大きな問題点となっている。そこで安定生産を計る上で、耐冷性、耐病性やこれまで以上の良質性を具備する新品種の開発に対する期待が極めて大きい。

特に耐冷性については他のマメ類、例えばダイズ等に比べて弱いとされ、これまでも初期生育と開花期の耐冷性の強化が図られてきたが、有効な遺伝資源の少ないことから新手法を加味した品種改良を必要としている。さらに、収穫期の霜害に対しては極めて弱く、一朝の降霜によって収穫直前のアズキが壊滅的な被害を受けることも稀ではない。したがって、アズキの耐冷性を飛躍的に改良するためには、最近クローニングに成功した耐冷性遺伝子 (Murata ら, 1992) を導入することなどのバイオテクノロジーの利用が有効と考えられる。

前述のようにアズキは日本をはじめ、台湾、朝鮮半島や中国で栽培されているのみで、栽培や育種に関する試験研究も日本のものを含めて少ないのが現状である。特にこれまでアズキの組織培養に関する研究は極めて少ない。

最初にアズキの組織培養に成功したのは尾崎 (1985) であり、上胚軸と初生葉を培養して再分化個体を得ている。また、足立ら (1990) も上胚軸の培養を試み、培地のホルモン組成に関する検討を行ったが、これらの報告は再分化個体の作出にとどまり、再分化個体の採種と次世代以降の特性に関する報告は著者ら (1992) が最初に行った。本論文においてはそれらの再分化個体における変異性とその後代系統の圃場レベルでの特性について論ずる。

遺伝子導入や細胞融合、細胞選抜に広く用いられているプロトプラスト培養については、Koulin Ge ら (1989)、及び著者ら (1989, 1993) の報告があるが、再分化個体

から採種して、次世代の養成にまで成功したのは著者が最初である。これについては本論文第 1 章の第 3 節において論ずる。

遺伝子導入も、アズキでは著者によるものが最初であり（佐藤ら 1990, Sato ら投稿準備中）、アグロバクテリウムを用いてカナマイシン耐性遺伝子（NPT II, neomycin phosphotransferase）の導入に初めて成功した。さらに、最近、農林水産省農業研究センターとの共同研究によって、インゲンマメに由来するアズキゾウムシ耐虫性遺伝子（ α -アミラーゼインヒビター遺伝子）を北海道のアズキ品種ベニダイナゴンへ導入することにも

成功して遺伝子導入によるアズキ育種の可能性を実証できた。これらについては第 3 章で論ずる。

以上のように、本研究はアズキの育種にバイオテクノロジーを導入するための基礎研究を行ったものであるが、マメ類には細胞組織培養の困難なものが多く、また、遺伝子導入系の確立されているものは極く限られている。したがって、本研究によって確立されたアズキの細胞培養、遺伝子導入系は他のマメ類へモデル実験系として利用できるのもので、その研究成果は作物育種上極めて高い評価を受けるであろう。

第1章 細胞及び組織片からの植物体再分化

高等植物の細胞はいわゆる分化全能性 (totipotency) を有するが、この分化全能性を引き出すための条件として、それぞれの植物によって用いる外植片の種類や生育段階を考慮する必要がある。したがって、バイオテクノロジーを応用する場合、その前提として細胞組織培養における再分化条件を明らかにする必要がある。

本章では、アズキの上胚軸から植物体を再分化させるとともに、上胚軸から誘導されたカルスからの植物体再分化についても検討した。さらに、上胚軸の組織とカルスより単離されたプロトプラストからの植物体再分化について検討した。

第1節 上胚軸からの植物体再分化

本節では主に上胚軸を外植片に用い、植物体の再分化に及ぼす培養条件、すなわち基本培地の組成、上胚軸の大きさ、植物生長調節物質 (以下ホルモンと記述する) の種類と濃度、糖の種類と濃度、培養温度、ゲル化剤の種類について検討した。

材料及び方法

1) 供試材料

培養実験には主にハツネショウズ、エリモショウズの2品種を用いた。その他、ベニダイナゴン、ハヤテショウズ、円葉1号、宝小豆、サホロショウズ、栄小豆、黄金大納言、カムイダイナゴン、茶殻早生、ホッカイシロショウズ、早生大納言、早生大粒1号及びアカネダイナゴンの北海道品種の合計15種を用いた (Table 1-6 参照)。

外植片としては播種後7~10日目の無菌幼植物の初生葉、根および上胚軸を用いた。初生葉は葉柄を切り取った葉を半裁し、根は細根を直根から切り落として長さ約10 mmに調製して用いた。これらの外植片は、いずれもホルモンフリーのMS (Murashige and Skoog, 1962) 培地上で無菌的に発芽させた植物体から得られたものを用いた。なお、発芽培地のホルモン組成について検討したが、オーキシシンとしてNAA (0.05, 0.1 mg/ℓ) を、サイトカイニンとしてBAP (1.0, 2.0, 4.0 mg/ℓ) を用いた。

2) 培養方法

播種から外植片の置床にいたる迄の手順は以下の通りである。すなわち、完熟種子を70%エタノールに30秒間浸漬し、次いでアンチホルミン (有効塩素濃度1%) に

15分間浸漬して滅菌し、滅菌水で2回洗浄後、発芽培地に播種した。なお、発芽培地はMS培地に30 g/ℓ ショ糖、0.8%寒天を添加し、pH 5.8に調整したホルモンフリー培地を用いた。播種後7~10日目の約7~8 cmに伸長した上胚軸の中央部を長さ約10 mmに切り、再分化培地へ置床した。培養温度は25°Cで16時間日長 (約5,000 lux) とした。なお、湿度は特に制御しなかった。培養容器としてプラスチックシャーレ (φ 90 mm×H 20 mm) とガラス製の培養瓶 (φ 55 mm×H 105 mm) を用いた。置床した切片数はプラスチックシャーレで10本、培養瓶で5本であった。

再分化率 (不定芽形成率, 不定根形成率) の調査は上胚軸切片の置床後4週間目 (培養瓶) と8週間目 (プラスチックシャーレ) に行った。以下に検討項目とその条件を記した。

用いた基本培地はMS, B5 (Gamborg ら, 1968) 及びN6 (Chu ら, 1972) の3種類で、それぞれ0.1 mg/ℓ N⁶-benzylaminopurine (BAP) 及び30 g/ℓ ショ糖を含む。

上胚軸の長さは2.5, 5.0, 10.0, 15.0 mm, 採取時期は播種後4, 7, 14日目とした。

BAP, カイネチンについては、それぞれ0.01, 0.1, 1.0, 10.0 mg/ℓ の4段階の濃度を設定した。

糖は、ショ糖とグルコースを用い、それぞれの濃度は10, 30, 45, 60, 90 g/ℓ の5段階とした。

培養温度は20, 25, 30°Cの3段階とした。

ゲル化剤は、寒天 (和光純薬, 植物培地用), アガロース (シグマ, タイプⅦ), グランガム (和光純薬) の3種を用い、濃度はそれぞれ0.8%, 0.6%及び0.2%とした。

結果

(1) 組織片の種類及び上胚軸の長さ並びに採取時期が再分化に及ぼす影響

組織片から植物体を再分化させるためには培養に適した部位を選定することが重要であり、また、同じ組織を培養の材料に用いる時、その生理条件が異なると再分化しない場合がある。そこでまず、外植片としては初生葉切片、根切片、上胚軸切片のいずれの部位が適しているかを検討した。さらに、上胚軸切片について、その長さ及び採取時期についても検討した。

外植片別の再分化率をTable 1-1に示した。これによると、供試したハツネショウズ、エリモショウズの両品種において、上胚軸切片からカルスを経由して40%程度

の頻度で不定芽分化した (Plate I-1A) が、初生葉からは不定芽が全く分化しなかった。根切片からは、不定芽がわずかに形成された。根切片では、根の発生はみられたが、これが不定根であるか通常の根であるかを区別できなかった。

次に上胚軸切片の長さについて検討した (Table 1-2)。不定芽の再分化率は、両品種ともに切片の長さが 10 mm の場合に、50% 前後と最も高く、15 mm 及び 5 mm では

30~40% であった。2.5 mm の場合は 8% と最も低かった。なお、この場合、切片が短かすぎるために再分化培地へ置床後の損傷が大きく褐変するものが見られた。不定芽が出現するまでに要する期間は、長さ 5, 10, 15 mm の切片ではいずれも 3 週間程度でほとんど差がみられなかったが、2.5 mm では、4~5 週間を要した。

さらに、上胚軸の採取時期について検討したところ Table 1-3 に示したようにその結果、播種後 7 日目のも

Table 1-1. Effect of explant source on shoot and root formation¹⁾

Cultivar	Explant	No. of explants	Callus growth ²⁾	No. of shoots	Frequency (%) of shoot formation	No. of roots
Hatsune-shozu	Epicotyl	25	++	10	40	3
	Leaf ³⁾	25	—	0	0	2
	Root	25	+	1	4	—
Erimo-shozu	Epicotyl	25	++	12	48	4
	Leaf	25	—	0	0	2
	Root	25	+	1	4	—

1) Explants were cultured on MS medium in glass jars.

2) —: no callus, +: slight, ++: moderate, +++: excellent.

3) Leaf: Primary leaf.

Table 1-2. Effect of size of the explants on shoot and root formation¹⁾

Cultivar	Epicotyl Length (mm)	No. of epicotyls	No. of ceased explants	Callus growth ²⁾	No. of shoots	Frequency (%) of shoot formation	No. of roots
Hatsune-shozu	2.5	25	3	+	2	8	2
	5.0	25	1	++	8	32	1
	10.0	25	0	++	12	48	7
	15.0	25	0	++	11	44	6
Erimo-shozu	2.5	25	2	+	2	8	4
	5.0	25	1	++	10	40	1
	10.0	25	0	+++	14	52	5
	15.0	25	0	++	13	42	7

1) Epicotyls were cultured on MS medium.

2) +: slight, ++: moderate, +++: excellent.

Table 1-3. Effect of plating period on shoot and root formation¹⁾

Cultivar	Sampling days ²⁾	Plant length	No. of epicotyls	Callus growth ⁴⁾	No. of shoots	Frequency (%) of shoot formation	No. of roots
Hatsune-shozu	4	+ ³⁾	30	++	6	20	3
	7	++	30	++	15	50	8
	14	+++	30	+	3	10	1
Erimo-shozu	4	+	30	++	4	13	3
	7	++	30	++	16	53	6
	14	+++	30	+	2	7	2

1) Epicotyls were cultured on MS medium.

2) Sampling days: Days after plating seeds.

3) +: 2-3cm, ++: 5-6cm, +++: longer than 20cm.

4) +: slight, ++: moderate, +++: excellent.

ので最も再分化率が高く、両品種とも50%であった。これより3日早い播種後4日目のものでは両品種とも再分化率が大きく低下した。また、採取時期が播種後14日目のように遅くなると上胚軸は20 cm以上の長さに伸長し、培養器の中で捻転して、組織は膨潤した状態となった。再分化率は、播種後4日目のものよりさらに低くなり、材料として不適当であった。

(2) 基本培地が再分化に及ぼす影響

植物の組織培養においてこれまで広く用いられてきた3種の基本培地、すなわちMS、B5及びN6培地について、アズキ上胚軸からの不定芽形成を試みた(Table 1-4)。

これによると、MS及びB5培地ではハツネショウズ、エリモショウズの両品種とも同様に50%以上の不定芽形成率を示したが、N6培地では不定芽形成率は10%以

下と低く、逆に不定芽形成率はMS、B5に比べて高い傾向がみられた。したがって、アズキの上胚軸からの不定芽形成に適する基本培地としてはMSおよびB5培地が適当と思われるが、以後の実験では、B5に比べて若干不定芽形成率の高かったMS培地を用いた。なお、上胚軸の再分化部位は、ほとんどが根側の切断面から生じた。

(3) BAP及びカイネチンの濃度が再分化に及ぼす影響

不定芽の分化に有効と考えられるサイトカイニンであるBAPとカイネチンについてそれぞれ単独に用いる場合の濃度を検討した(Table 1-5)。

供試したハツネショウズ、エリモショウズの両品種ともに全処理区で不定芽の形成が確認された。一般にBAPの方がカイネチンに比べて再分化率が高かった。BAPの最適濃度は、ハツネショウズでは、0.01 mg/ℓもしくは、0.1 mg/ℓであり、再分化率はそれぞれ93%および90%

Table 1-4. Effect of basal medium on shoot and root formation¹⁾

Cultivar	Basal medium	No. of epicotyls	Callus growth ²⁾	No. of shoots	Frequency of (%) shoot formation	No. of Roots
Hatsune-shozu	MS	30	+++	19	63	6
	B5	50	++	27	54	8
	N6	50	++	5	10	21
Erimo-shozu	MS	30	+++	18	60	5
	B5	30	++	17	57	5
	N6	30	++	4	13	10

1) Epicotyls were cultured in the plastic dishes (φ90mm).

2) +: slight, ++: moderate, +++: excellent.

Table 1-5. Effect of BAP and kinetin concentration on shoot and root formation¹⁾

Cultivar	Cyto-kinine	Conc. (mg/ℓ)	No. of epicotyls	Callus growth ²⁾	No. of shoots	Frequency of (%) shoot formation	No. of roots
Hatsune-shozu	BAP	0.01	40	+	37	93	11
		0.1	40	++	36	90	3
		1.0	40	+++	32	80	1
		10.0	35	++	3	9	2
	kinetin	0.01	30	+	11	37	20
		0.1	40	+	20	50	30
		1.0	30	++	16	53	2
		10.0	30	+	3	10	0
	BAP	0.01	35	+	20	57	2
		0.1	35	++	25	71	1
		1.0	30	+++	20	67	0
		10.0	35	+	5	14	0
Erimo-shozu	kinetin	0.01	25	+	6	24	23
		0.1	25	+	8	32	24
		1.0	25	+	6	24	1
		10.0	25	+	1	4	0

1) Epicotyls were cultured on MS medium in glass jars.

2) +: slight, ++: moderate, +++: excellent.

であったが、エリモショウズでは、0.1~1.0 mg/l であり、再分化率は57%, 71%とハツネショウズに比べて低かった。また、カイネチンの場合にはハツネショウズが1.0 mg/l で53%, また、エリモショウズでは0.1 mg/l で32%という不定芽形成率であった。最適濃度は0.1~1.0 mg/l であった。再分化に要する期間もカイネチンの方がBAPよりも1~2週間程度長かった。

不定根の形成率については、不定芽形成の場合とは逆にカイネチンの方がBAPの培地より高かった。以上の結果からカイネチンよりBAPによる不定芽形成率の高いことが明らかとなったので、以後の実験にはサイトカイニンとしてBAPを用いた。

(4) 上胚軸からの再分化における品種間差異

前項ではハツネショウズとエリモショウズで上胚軸からの不定芽、不定根形成に差が認められ、一般にハツネショウズの方が高い形成率を示した。再分化率に関する品種間差は多くの作物種で知られていたが、アズキにおいても、このような品種間差がみられるか否かを明らかにするため北海道で育成された15品種について上胚軸の培養を試みた (Table 1-6)。

BAPを含む培地に直接置床した上胚軸では、早い場合には培養3週間で不定芽を生じた。供試15品種中13品種において、BAP濃度が0.1 mg/l の場合に不定芽形成率が最も高かった。中でもベニダイナゴンとハヤテショウズの不定芽形成率はそれぞれ92%, 80%を示し、他の品種の6~52%に比べて著しく高い値となった。次いで不定芽形成率の高かったBAP濃度は品種により異なったが0.01 mg/l または1.0 mg/l であった。BAP濃度が10.0 mg/l ではほとんどの品種で不定芽が形成されずに切片が褐変した。一切片あたりの不定芽数は1.0~3.6個であったが、これに関しては品種およびBAP濃度による一定の傾向がみられなかった。不定根形成率についてはいずれの品種でもBAPが低濃度 (0.01 mg/l) の場合に高い傾向が見られた。また、宝小豆、ハツネショウズなどの一部の品種ではBAPの高濃度 (10.0 mg/l) 条件でも不定根形成率が高かった。

なお、得られた不定芽をホルモンフリー培地に移植したところ、発根がみられ、そのほとんどが正常な植物体に迄生育した (Plate I-1B)。

(5) 糖の種類と濃度の再分化に及ぼす影響

糖の種類と濃度について検討した結果を Table 1-7 に示した。これによるとショ糖では供試した両品種において30 g/l の濃度で最も不定芽形成率が高く、45 g/l 以上の高濃度になると不定芽形成率は低下し、逆に不定根形成率が高くなった。なお、45 g/l 以上の高濃度では上胚

軸が白色に変わり枯死したものもあった。グルコースではショ糖に比べて再分化率が全体的に低く、ハツネショウズにおいてはグルコースの10 g/l と30 g/l でそれぞれ50%, 45%と高い不定芽形成率を示したが、エリモショウズでは全体的に再分化率が低く、10 g/l では25%の形成率であった。したがって、用いる糖の種類としてはショ糖が適当で濃度は30 g/l が適当と思われた。

(6) ゲル化剤の種類の再分化に及ぼす影響

最近、ゲル化剤の種類によって再分化率の大きく異なる場合が知られている (谷本と原田, 1991)。そこで3種のゲル化剤、すなわち寒天、アガロース及びゲランガムについて検討した (Table 1-8)。

これによると、供試した3品種ともにゲル化剤としては、寒天がアガロース、ゲランガムに比べて高い不定芽形成率を示した。エリモショウズにおいては、ゲランガムは寒天とほぼ同様の再分化率であったが、他の2品種ではゲランガムは寒天に比べていずれも低い再分化率を示した。3品種ともアガロースが最も低い再分化率で、アガロースの濃度は0.6%であった。これは他の2種類のゲル化剤に比べてやや柔らかかったことが関係しているかもしれない。いずれにせよ、ゲル化剤は単に培地の支持体でなく再分化にも影響を及ぼすことが明らかとなり、上胚軸からの再分化には寒天が適していると思われた。

(7) 培養温度の再分化に及ぼす影響

培養中の環境は、細胞、組織の増殖および再分化などに重要な影響を及ぼす。多くの植物種の培養時の適温は20°Cから30°Cの間にあり、高温や低温では細胞の増殖や再分化の抑制されることが多い。ここではアズキ上胚軸の培養時の温度が、再分化に及ぼす影響について検討した (Table 1-9)。これによると供試した3品種において、培養温度25°Cの時に不定芽形成率が最も高く、次いで30°Cで高かった。20°Cでは不定芽及び不定根形成率がいずれも低かった。また、20°Cでは再分化に要する期間が25~30°Cに比べて1~2週間ほど長い傾向にあった。

(8) 発芽時の培地が再分化に及ぼす影響

外植片を培養する前に発芽時の培地へホルモンを添加し、アズキ植物体にホルモンを取り込ませた後にホルモンフリーの培地で培養することにより再分化にどのような影響を及ぼすかを検討した (Table 1-10)。

これによると、不定芽形成率はホルモンフリーで発芽・生育させた培地で培養するよりもホルモンを添加した培地で明らかに高くなり、供試した2品種ともに、0.05 mg/l NAA+2.0 mg/l BAPで最も高かった。再分化の過程は、これまでの培養系と同様であり、特に問題なく、

Table 1-6. Varietal differences for shoot formation¹⁾

Cultivar	BAP (mg/l)	No. of epicotyls	Callus growth ²⁾	Frequency (%) of shoot formation	Mean shoots per canlogenic epicotyls	Frequency (%) of root formation
Beni-dainagon	0.01	25	++	72	2.9	24
	0.1	25	+++	92	3.2	0
	1.0	25	++	20	1.4	8
	10.0	25	+	0	0.0	0
Hayate-shozu	0.01	50	+	62	2.2	24
	0.1	50	++	80	2.1	6
	1.0	50	++	22	1.8	0
	10.0	35	+	19	1.8	20
Maruha 1	0.01	25	+	24	1.3	48
	0.1	25	++	52	2.4	0
	1.0	25	+	16	1.0	0
	10.0	25	+	0	0.0	0
Takara-shozu	0.01	25	+	8	1.0	40
	0.1	20	+++	50	2.7	5
	1.0	20	++	20	1.3	0
	10.0	20	++	10	1.5	65
Sahoro-shozu	0.01	25	+	16	1.0	92
	0.1	25	++	48	1.8	4
	1.0	25	++	20	1.2	0
	10.0	25	+	0	0.0	4
Sakae-shozu	0.01	25	+	4	1.0	100
	0.1	25	++	48	1.8	8
	1.0	25	+	32	1.3	0
	10.0	25	+	0	0.0	0
Kogane-dainagon	0.01	25	+	36	1.2	4
	0.1	25	++	44	1.6	0
	1.0	25	++	36	1.6	0
	10.0	25	+	0	0.0	0
Erimo-shozu	0.01	35	+	20	1.3	10
	0.1	50	++	44	2.6	4
	1.0	50	+++	36	2.5	2
	10.0	50	++	2	3.6	20
Kamui-dainagon	0.01	25	+	12	1.3	72
	0.1	20	+++	40	3.0	0
	1.0	25	++	44	1.4	0
	10.0	20	+	0	0.0	0
Hatsune-shozu	0.01	35	+	46	1.3	45
	0.1	25	++	36	1.6	0
	1.0	50	++	14	1.2	0
	10.0	45	+	25	2.2	48
Chagara-wase	0.01	25	+	8	1.0	76
	0.1	25	+	36	1.4	56
	1.0	25	++	36	1.7	4
	10.0	25	—	0	0.0	8
Hokkaisiro-shozu	0.01	15	++	7	2.0	13
	0.1	15	+	33	1.0	7
	1.0	15	+	0	0.0	7
	10.0	15	—	0	0.0	0
Wase-dainagon	0.01	25	+	4	1.0	40
	0.1	25	+++	12	2.7	0
	1.0	25	+	0	0.0	0
	10.0	25	—	0	0.0	0
Wasetairyu 1	0.01	25	+	20	1.4	40
	0.1	25	++	24	1.8	0
	1.0	25	+	36	1.4	0
	10.0	25	—	0	0.0	0
Akane-dainagon	0.01	20	+	6	1.3	40
	0.1	20	++	6	1.2	0
	1.0	20	+	0	0	0
	10.0	25	—	0	0	40

1) Epicotyls were cultured on MS medium in the glass jars.

2) + : slight, ++ : moderate, +++ : excellent.

Table 1-7. Effect of sucrose and glucose concentration on shoot and root formation¹⁾

Cultivar	Sugar	Conc. (g/l)	No. of epicotyls	Callus growth ²⁾	No. of shoots	Frequency of (%) shoot formation	No. of roots
Hatsune-shozu	Sucrose	10	30	+	6	20	1
		30	30	+++	12	40	1
		45	30	+++	5	17	5
		60	30	++	4	13	8
		90	30	+	2	7	3
	Glucose	10	30	+	15	50	0
		30	40	++	18	45	5
		45	40	+++	3	8	0
		60	40	+	1	3	0
		90	30	+	1	3	0
Erimo-shozu	Sucrose	10	30	+	4	13	1
		30	30	++	12	40	1
		45	30	+++	5	17	2
		60	30	++	4	13	6
		90	30	+	3	10	6
	Glucose	10	40	+	10	45	0
		30	30	+	5	17	0
		45	30	++	2	7	2
		60	30	++	0	0	0
		90	30	+	0	0	0

1) Epicotyls were cultured on MS medium in the plastic dishes ($\phi 90$ mm).

2) +: slight, ++: moderate, +++: excellent.

Table 1-8. Effect of gelling agent on shoot and root formation¹⁾

Cultivar	Gelling agent ²⁾	No. of epicotyls	Callus growth ³⁾	No. of shoots	Frequency (%) of shoot formation	No. of Roots
Hatsune-shozu	Agar (0.8%)	30	+++	10	33	4
	Agarose (0.6%)	30	++	4	13	8
	Gellan gum (0.2%)	30	++	6	20	1
Erimo-shozu	Agar	30	++	10	33	15
	Agarose	30	++	4	13	10
	Gellan gum	30	++	9	30	10
Kamui-dainagon	Agar	30	+++	8	27	10
	Agarose	30	++	1	3	11
	Gellan gum	30	+	2	7	12

1) Epicotyls were cultured on MS medium in the plastic dishes ($\phi 90$ mm).

2) Agar and gellan gum are from WAKO PURE CHEMICAL INDUSTRIES, LTD. Agarose Type VII is from SIGMA CHEMICAL COMPANY.

3) +: slight, ++: moderate, +++: excellent.

再分化率の高い培養系であると思われた。

しかし、ホルモンの含まれる培地に播種した場合、上胚軸の伸長がホルモンフリー培地に播種した場合よりも遅く、また、2週間ほど経過すると初生葉の下部の胚軸が褐変しはじめ、その結果、1種子から2～3片程度しか材料がとれなかった。培養に要する時間及び採取できる切片数を考慮すると従来通りホルモンフリーの培地に播種して、培養した方が効率がよいと思われた。

考察

尾崎 (1985) は、アズキの上胚軸を BAP と NAA を含む MS 培地上で培養し、不定芽を直接分化させることに初めて成功した。これと同時に、上胚軸に形成されたカルスからも不定芽の形成に成功している。さらに Ozaki (1986) はアズキ初生葉から誘導したカルスよりの不定芽の形成と発根を観察している。また、足立ら (1990) は、北海道の栽培品種であるエリモショウズを用いて、BAP 0.06 mg/l 区で最高 95% の不定芽形成率を得てい

Table 1-9. Effect of temperature on shoot and root formation¹⁾

Cultivar	Temp. (°C)	No. of epicotyls	Callus growth ²⁾	No. of shoots	Frequency of (%) shoot formation	No. of roots
Hatsune- shozu	20	30	+	7	23	2
	25	30	+++	16	53	8
	30	30	++	10	33	7
Erimo- shozu	20	30	+	2	7	0
	25	30	++	12	40	4
	30	30	++	10	33	6
Akeno- Wase	20	30	+	5	17	2
	25	30	++	17	57	8
	30	30	++	10	33	6

1) Epicotyls were cultured on MS medium in the plastic dishes (φ90mm).

2) +: slight, ++: moderate, +++: excellent.

Table 1-10. Effect of NAA and BAP concentration in germination medium on shoot and root formation¹⁾

Cultivar	Mudium		No. of epicotyls	Callus growth ²⁾	No. of shoots	Frequency (%) of shoot formation	No. of roots
	NAA	BAP					
	(mg/ℓ)						
Hatsune- shozu	0.0	0.0	30	+	2	7	6
	0.05	1.0	30	++	20	67	4
	0.05	2.0	30	++	28	93	2
	0.05	4.0	30	+++	24	80	1
	0.1	1.0	30	+	25	83	4
	0.1	2.0	30	+++	20	67	8
	0.1	4.0	30	+++	19	63	3
	0.0	0.0	30	+	1	3	8
Erimo- shozu	0.05	1.0	30	+++	19	63	4
	0.05	2.0	30	+++	27	90	2
	0.05	4.0	30	++	23	77	1
	0.1	1.0	30	+	20	67	2
	0.1	2.0	30	+++	26	87	5
	0.1	4.0	30	++	28	93	1

1) Epicotyls were cultured on MS medium.

2) +: slight, ++: moderate, +++: excellent.

る。しかし、これらの報告では再分化個体の種子稔性や特性についての記載が全くなく、再分化個体がはたして育種素材として利用可能か否かは全く明らかでない。

そこで、本研究では、細胞育種の第一歩として種子の生産が正常に行われるような健全植物の大量再分化法の確立を目的として、以下のような培養条件を確立した。

まず、組織培養に供する外植片について検討したが、本実験では、無菌的に養成されたアズキの幼植物の上胚軸、初生葉、及び根をそれぞれ MS 培地で培養したところ、上胚軸と根からはカルスと不定芽が形成された。しかし、初生葉からは不定根が形成されたものの、カルス、不定芽の形成はみられなかった。これは、前述の Ozaki (1986) の結果と異なったが、この原因としては用いた品種や生育時期等の差異によると思われる。アズキの根か

らの再分化については、これまで報告はないが、今回、初めて不定芽形成と植物体の再分化に迄成功した。しかし、その再分化率は上胚軸の約 1/10 以下と極めて低率であった。

以上の結果、培養に用いる外植片としては上胚軸がもっとも適当と思われた。上胚軸は再分化率が高く、その養成も容易で、播種後一週間という短期間に大量の外植片の得られる利点がある。言うまでもなく、制御環境下で無菌的に養成されたアズキの幼植物は、圃場で養成された材料とは異なり、圃場条件や天候など環境条件の影響を受けないので、年間を通して均一な材料を大量に供給することが可能である。さらに、本実験では、上胚軸の採取時期と切片の長さについても詳細に検討した。その結果、播種後 7～10 日の 7～8 cm に伸育した上胚軸

の両端を1 cm 程度切り落とし、残りの部分を1 cm の長さに切った切片が外植片として最も適当であることを見出した。この方法は尾崎(1985)による従来の方法(2 cm 程度に伸長した上胚軸の中央部を0.5 cm に切取った切片)に比べて得られる切片数も多く、切片の調製も容易である。

さて、不定芽は上胚軸切片の切断面部分と切断面に形成されたカルス部分から形成されたが、その場合、不定芽が形成されるのは常に根側の切断面のみであった。したがって、上胚軸には、不定芽形成に関する極性の存在することが強く示唆された。このことは、組織からの再分化における内生的条件を解析する上で極めて興味深い現象と思われる。

また、上記の結果は、上胚軸中の内生ホルモン等の分布傾斜を反映しているとも思われるので、NAA と BAP を添加した発芽培地で養成した上胚軸をホルモンフリーの再分化培地で培養したところ、通常の方法で養成された上胚軸に比べて極めて高い再分化率を示した。したがって、発芽培地中のホルモンが上胚軸の内生ホルモンなどに何らかの影響を及ぼし、その結果、再分化率に大きな差異をもたらしたと考えられる。また、ホルモンを添加した発芽培地では上胚軸の伸長が抑制され、その結果、一本の上胚軸から2~3個の切片しか採取できなかった。したがって、材料確保の点からみて実用的には効率が悪いが、この点を改善すればさらに効率的な培養系の確立が可能と思われる。

次に基本培地について検討した。尾崎(1985)、足立ら(1990)が用いたMS培地は植物の組織培養では最も普遍的に使用される基本培地である。本実験では、このMS培地のほかに、マメ類の培養に主に用いられることが多いB5培地、及びビネ科の培養に主に用いられるN6培地についても検討した。この結果、N6培地では再分化率が低かったが、MS培地とB5培地ではほぼ同様の再分化率が得られたので、いずれの培地も使用可能と思われる。

一般に組織からの再分化において培地に添加するホルモンの種類と濃度、特にオーキシニンとサイトカイニンの量比が極めて重要である。尾崎(1985)は、BAP 0.1 mg/l、0.2 mg/l 区と NAA 0.05 mg/l + BAP 0.2 mg/l 区で不定芽の形成をみており、前述のように、足立ら(1990)はエリモショウズ1品種についてのみではあるが、BAP 0.06 mg/l 区で最高95%の不定芽形成率を得た。本実験では、多数の品種を用いて、BAP のほかにカイネチンの効果についても検討した。濃度についてはBAP、カイネチンともに0.01 mg/l から10.0 mg/l の4段階を設定したが、両ホルモンとも10.0 mg/l 区では

再分化率が10%前後で、0.01~1.0 mg/l 区の数%に比べて明らかに低かった。また、カイネチンはBAP に比べて、不定根の形成率が高かったものの、不定芽の形成率が低かったため、サイトカイニンとしては従来から用いられているBAPの方が適当と思われる。

BAP の最適濃度は品種によって多少異なったが、ほとんどの品種では0.1 mg/l で不定芽形成率が最も高く、供試品種のすべてにおいてBAP濃度0.01~1.0 mg/l の範囲内で不定芽が形成された。ペニダイナゴンではBAP 0.1 mg/l 区で92%の不定芽形成率であったが、アカネダイナゴンでは0.01 mg/l と0.1 mg/l の6%が最高値であった。またカムイダイナゴンのように、1.0 mg/l 区でも0.1 mg/l とほぼ同様の不定芽形成率を示した。したがって、アズキの場合、品種によっては足立ら(1990)のように、より細かいBAPの濃度設定を行なって最適濃度を決定する必要があるが、その場合にも0.01~1.0 mg/l の範囲に絞って検討すれば充分と思われる。

培地に加える糖は単なる炭素源として重要であるばかりでなく、培地の浸透圧の調整にも用いられ、その濃度は再分化に大きな影響を与える。本実験では、ハツネショウズ、エリモショウズを用いて、ショ糖とグルコースの2種類の糖について検討したが、ハツネショウズでは2種類の糖とも高い再分化率を示したが、エリモショウズではグルコースよりもショ糖の方で再分化率が高かった。濃度に関する反応は両品種ともに高濃度では再分化率が低下したことから、2種類の糖の浸透圧が0.1 M(45 g/l) を越えると再分化率が低くなったが、実用的には、従来用いられている30 g/l のショ糖濃度で問題ないと思われる。

また、培地の固化に用いるゲル化剤についても検討した。ゲランガムは、水草付着菌 *Pseudomonas elodae* が菌体外に放出する多糖類を脱アセチル処理して精製したものであり、主成分はグルコース、ラムノース、ウロン酸などである。これまで多くの植物において、ゲランガムの方が寒天よりも高い再分化率を得たという報告があるが(谷本と原田, 1991)、本実験では、ゲランガムとアガロースよりも寒天の方で再分化率が高く、従来の報告とは異なっていた。この原因については不明であるが、各ゲル化剤の最適濃度を求めて比較すれば、あるいは異なった結論が得られるかも知れない。しかし、実用的には0.8%寒天でも充分な再分化率が得られた。

なお、培養容器の形状や大きさも組織培養では重要な要素のひとつであるが、例えば、ダイズの初生葉からの再分化において試験管では不定芽の形成がみられたが、

シャーレでは全く形成されなかったという報告がある (Wright ら, 1987)。本実験では、同一条件下での直接の比較試験は行っていないが、培養瓶の方がシャーレよりも不定芽の形成率が明らかに高く、かつ再分化に要する期間も短い傾向が認められた。

培養温度については、尾崎 (1985) 及び足立ら (1990) は 25°C で培養しているが、本実験では 25°C のほかに、20°C と 30°C についても検討したところ、最も不定芽形成率が高かったのは 25°C で、30°C がこれに次ぎ、20°C では形成率が低かった。したがって、培養温度は従来通り 25°C が適当であることを改めて確認した。

以上のように、本実験の基本的な培養条件は尾崎 (1985) の方法に準拠しつつ、より多くの条件について体系的な検討を加えた。その結果、外植片として用いる上胚軸の調製法や培養容器の工夫などによって、再分化率を高め、同時に従来は 40 日以上も要した不定芽形成までの期間を 3 週間程度にまで短縮して全体の培養効率を高めることができた。

さらに重要なことは、本実験ではこれらの再分化個体を温室において鉢上げし (Plate I-1C)、ポット栽培することにより正常な種子を実際に多量採種したことである。これらの後代の特性については章を改めて論述するが、種子稔性が正常なアズキの培養由来個体の得られた意義は極めて大きく、これにより、細胞育種に適用する大きな前提条件の一つが解決されたと言えよう。

第 2 節 上胚軸カルスからの植物体再分化

植物の組織片をある条件下で、例えばオーキシンの存在下で培養すると、その組織の切断面付近の細胞が活発に分裂、増殖し、やがてカルスと呼ばれる脱分化細胞塊を形成する場合がある。このカルスも分化全能性を有する。1939 年に White は未分化の増殖中のカルスを液体培地に移植することで不定芽の分化に成功したが、これがカルスからの形態形成に関する最初の報告である。以来現在までに多くの植物種でカルスからの植物体の再分化が報告されている。

本節では上胚軸からカルスを誘導し、そのカルスからの不定芽形成を試みた。

1) 再分化に及ぼす培地の影響

材料及び方法

カルスを誘導するための外植片として Table 1-11 に示した 6 品種の上胚軸を用いた。これらの上胚軸は、前節の試験と同様に、ホルモンフリーの MS 培地で無菌的に播種し、伸長させたものを用いた。30 ml の培地の入った約 200 ml の培養瓶に、その上胚軸を瓶当たり 5 本ず

つ置床した。カルス誘導培地は MS 基本培地 (30 g/l ショ糖, 8 g/l 寒天, pH 5.8) に 2 mg/l の 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) を添加したものを用いた。培養条件は 25°C で、暗黒下に置いた。形成されたカルスは上胚軸からそぎ取ってカルス誘導培地と同じ組成の培地へ移植した。以後 1 カ月毎にピンセットで直径 5 mm 程度の大きさのカルスをかきとり、それを新しい培地に移植することによって継代培養とした。

再分化実験に供試したカルスは原則として継代 6 回目のカルスを用いた。再分化培地は、MS 基本培地に BAP を添加したものを用いた。BAP 濃度については 0.01~10.0 mg/l の範囲について検討した。用いたカルスの大きさは直径 7~8 mm 程度で、培養瓶当たり 5 個置床した。ハツネショウズでは、BAP の濃度をさらに詳しく検討するため、0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 及び 10.0 mg/l の 5 処理を設定した。継代は同じ培地を用いて 1 カ月毎に行い、カルス置床後 3 カ月目に不定芽、不定根、organogenic カルス (後述) の再分化率を調査した。ハツネショウズのカルスから形成された不定芽は、ホルモンフリーの MS 培地に移植して生育、発根を促した。植物体が 7~8 cm に生育した時に、培養瓶のふたを徐々にあけるとともに、雑菌の混入を防ぐために 0.05% ペンレート (ペノミル水和剤) を含む水道水を培地がひたる程度に加え、1 週間程度培養室で順化した。次に寒天を水洗した後、温室でポットエースの入った素焼きの鉢 (4 号鉢) に移植した。移植直後は市販のジュースのペットボトル (1.5 リットル) を半分に切り、上部に穴を開けた容器を 10 日間程度かぶせ、植物体の生育状況をみて容器を外した。その後温室にて生育させ、採種した。

再分化培地のホルモン組成、ショ糖濃度、カルスの継代回数に関する処理区は以下の通りである。まず、オーキシンとしては α -naphthaleneacetic acid (NAA) を用い、濃度は無添加と 0.05 mg/l とし、サイトカイニンとしては、BAP を用い、濃度は 1.0 および 10.0 mg/l とし、それらの組合わせにより、計 4 種類の再分化培地を作成した。ショ糖濃度は 4 処理 (15, 30, 60, 及び 90 g/l) とした。また、カルスの継代回数については、継代回数がそれぞれ 2, 4, 6, 及び 12 回のものを用いた。供試材料は上記と同じ方法で誘導したハツネショウズ、エリモショウズの上胚軸由来のカルスを用いた。

再分化率の向上と再分化に要する期間を短縮する目的でアブシジン酸 (ABA) を含む培地でのカルスの前培養について検討した。MS 基本培地に 1.0 mg/l の BAP と 0.01, 及び 1.0 mg/l の ABA を含む培地で、それぞれ 1, 2, 4, 8, 及び 10 日間カルスを前培養した後、ABA

を取り除いた培地に移植して再分化率を調査した。

結果

上胚軸をカルス誘導培地に置床して2週間目頃から切断面にカルスの形成が見られ、その後カルスは上胚軸全体を覆った(Plate II-2A)。カルスの形状は、白色でソフトであった(Plate II-2B)。また、継代後のカルスの形態及び増殖には、品種間差が見られなかった。

再分化培地に置床したカルスは2～3週間で褐変し始めた。そのカルスの一部分にグリーンスポットが出現し、そこから不定芽が形成された(Plate II-2C)。また、カルスは継代後1カ月で直径が約2倍に迄生長した。再分化のみられないカルスは褐色のまま増殖するのみで、中には3カ月後に全体が緑色あるいは白色を呈したのもあった。カルスからの不定芽形成は供試した6品種の全てにみられたが、その反応は再分化培地中のBAP濃度で異なった(Table 1-11)。すなわち、BAP濃度が0.01 mg/ℓ区ではいずれの品種においても不定芽は形成されなかったが、1.0 mg/ℓ区では供試した全品種で不定芽が形成された。1.0 mg/ℓのBAPを加えた培地に置床したハツネシヨウズのカルスからの不定芽形成率が20%で

最も高く、次いでベニダイナゴンの16%、サホロシヨウズの15%の順であった。

カルスからの不定根形成は、BAPが低濃度(0.01 mg/ℓ)及び高濃度(10.0 mg/ℓ)では劣り、中間濃度(0.1, 1.0 mg/ℓ)で優る傾向にあったが、サホロシヨウズ、カムイダイナゴンでは高濃度でも不定根の形成がやや多いなど一定の傾向はみられなかった。なお、初めに不定根が形成されたカルスではその後不定芽の形成はみられなかった。

培養中のカルスから、不定芽まで分化していないが、緑色で葉の塊の様な形態をした組織が形成されることがあった。この組織だけをカルスからかきとってホルモンフリー培地に移植するとそのままの形態で増殖した。そして増殖中に時として不定芽の形成をみたことから潜在的に再分化能を有する組織と考えられた。そこで、本章ではこれを「organogenic カルス」(Plate II-2D)と呼ぶこととした。このorganogenic カルスの形成率は、BAP濃度が1.0, 10.0 mg/ℓの場合に高く、0.01 mg/ℓでは形成されなかった(Table 1-11)。

ハツネシヨウズを材料に5段階のBAP濃度でカルス

Table 1-11. Effect of BAP concentration on plant regeneration from epicotyl-calli¹⁾

Cultivar	BAP (mg/ℓ)	No. of calli	No. of shoots	Frequency (%) of shoot formation	No. of organogenic calli	Frequency (%) of o. c. formation ²⁾	No. of roots
Hatsune-shozu	0.01	20	0	0	0	0	3
	0.1	20	0	0	0	0	14
	1.0	20	4	20	0	0	13
	10.0	20	3	15	0	0	1
Erimo-shozu	0.01	20	0	0	0	0	8
	0.1	20	0	0	0	0	14
	1.0	20	1	5	1	5	11
	10.0	20	1	5	0	0	2
Sahoro-shozu	0.01	20	0	0	0	0	0
	0.1	20	1	5	1	5	3
	1.0	20	3	15	0	0	5
	10.0	20	2	10	2	10	6
Hayate-shozu	0.01	15	0	0	0	0	12
	0.1	20	1	5	0	0	20
	1.0	25	2	8	2	8	23
	10.0	20	3	12	3	12	0
Kamui-dainagon	0.1	25	0	0	0	0	3
	1.0	20	2	10	4	16	3
	10.0	25	0	0	1	4	10
Beni-dainagon	0.1	20	0	0	4	20	9
	1.0	25	4	16	0	0	18
	10.0	25	0	0	0	0	8

1) Calli were cultured on MS medium.

Shoots, organogenic calli and roots were recorded three months after culture initiation on regeneration medium.

2) o. c.: organogenic calli.

からの再分化について検討したのが、Table 1-12 である。再分化培地に置床して2カ月目の不定芽形成数は0.1, 0.5, 及び1.0 mg/l の BAP 濃度でそれぞれ1, 1, 及び3個と少なかった。各培地で形成された organogenic カルスを経代することによって長期間にわたって再分化植物体を得ることができた。すなわち、培養後4カ月目には BAP 濃度 0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 及び10.0 mg/l のそれぞれから3, 3, 17, 4, 及び3個体の計30個体、同10カ月目には92個体の再分化個体を得られ、さらに、継代を続けても相当長期間(7年間)にわたって再分化が可能であった。なお、再分化培地の BAP 濃度は本実験の範囲では1.0 mg/l が最も適していた。また、再分化個体の中には、BAP 10.0 mg/l 区でアルビノ個体 (Plate II-2 E) がみられた。

NAA と BAP を組合わせた再分化培地で上胚軸由来カルスからの不定芽形成率を比較したのが Table 1-13

である。エリモショウズ、ハツネショウズの両品種ともに0.5 mg/l NAA+10.0 mg/l BAP を添加した培地で不定芽形成率が最も高く、それぞれ28%, 36%であった。また、同培地では organogenic カルスの形成率も高く、エリモショウズでは28%の形成率を示した。

なお、Table 中にはないが、サイトカイニンとしてカイネチンを用い、BAP と同じ濃度でカルスからの再分化を試みた。この場合、不定根の再分化が低率でみられたが、培養開始後3カ月目までには不定芽の形成はみられなかった。

再分化に対する糖の濃度の影響をみたのが Table 1-14 である。その結果、90 g/l 区では不定芽が形成されなかったが、15 g/l, 30 g/l 並びに60 g/l の各区ではそれぞれ不定芽の形成がみられ、30 g/l 区で最も形成率が高く、ハツネショウズで20%, エリモショウズで16%であった。また、90 g/l 区ではカルスの増殖も抑え

Table 1-12. Effect of BAP concentration on plant regeneration from epicotyl-calli¹⁾

BAP (mg/l)	No. of shoots ²⁾	No. of shoots ³⁾	No. of regenerated plants ⁴⁾	No. of plants on pot ⁵⁾	No. of harvested plants	No. of seeds
0.1	1	2	3	12	11	40
0.5	1	3	3	10	9	27
1.0	3	14	17	40	38	121
5.0	0	4	4	25	20	62
10.0	0	3	3	5	3	12

1) 50 epicotyl calli were cultured in glass jars.

Cultivar: Hatsune-shozu.

2) Recorded two months after culture initiation on the regeneration medium.

3) Recorded after three months of culture

4) Recorded after four months of culture.

5) Recorded after ten months of culture.

Table 1-13. Effect of plant growth regulators on plant regeneration from epicotyl-calli¹⁾

Cultivar	NAA	BAP	No. of calli	No. of shoots	Frequency(%) of shoot formation	No. of organogenic calli	Frequency (%) of o.c. formation ²⁾	No. of roots
Hatsune-shozu	0.0	1.0	25	5	20	1	4	10
		10.0	25	3	12	0	0	0
	0.05	1.0	25	3	12	0	0	1
		10.0	25	9	36	1	4	0
Erimo-shozu	0.0	1.0	25	3	12	3	12	7
		10.0	20	4	20	0	0	0
	0.05	1.0	20	1	5	2	10	8
		10.0	25	7	28	7	28	1

1) Calli were cultured on MS medium.

Shoots, organogenic calli and roots were recorded three months after culture initiation on regeneration medium.

2) o. c.: organogenic calli.

られた。以上の結果からショ糖の最適濃度は、30 g/ℓであった。

継代期間についてみると再分化率は6回目まで、すなわちカルスを誘導して6カ月目までは少しずつ低下したものの20%程度の再分化率は得られた。しかし、12カ月を経過したカルスでは、再分化率が他の継代回数の場合に比べ半分以下に迄低下した(Table 1-15)。この結果から再分化に供試するカルスは継代6カ月までとした方がよいことがわかった。なお、再分化培地に置床する直前

のカルスの外観は、継代回数を重ねても変化しなかった。

上記の方法では再分化培地にカルスを置床してから不定芽形成までに3～4カ月を要するのでその期間を短縮するために、ABAを含む培地でカルスを前培養してから再分化培地に置床した。ABA濃度は0.1, 1.0 mg/ℓとし、前培養日数は1, 2, 4, 8, 及び10日とした。ABAで前培養した場合に、前培養しない区に比べ、若干、不定芽形成率が高くなった(0.1 mg/ℓ ABAで前培養日数が1日と8日, Table 1-16)が、再分化に要する期間に対

Table 1-14. Effect of sucrose concentration on shoot and root formation from epicotyl-calli¹⁾

Cultivar	Concentration of sucrose (g/ℓ)	No. of calli	No. of shoots ²⁾	Frequency(%) of shoot formation	No. of roots
Hatsune-shozu	15	25	0	0	4
	30	25	5	20	3
	60	25	2	4	2
	90	25	0	0	0
Erimo-shozu	15	25	1	4	3
	30	25	4	16	4
	60	25	1	4	1
	90	25	0	0	0

1) Calli were cultured on MS medium containing 1.0 mg/ℓ BAP.

2) Recorded three months after culture initiation on the regeneration medium.

Table 1-15. Effect of subculture on shoot and root formation from epicotyl-calli¹⁾

Cultivar	No. of subculture transfers	No. of calli	No. of shoots ²⁾	Frequency(%) of shoot formation	No. of roots
Hatsune-shozu	2	25	7	28	8
	4	25	5	20	7
	6	25	5	20	7
	12	25	2	8	6
Erimo-shozu	2	25	6	24	7
	4	25	5	20	5
	6	25	4	16	5
	12	25	2	8	6

1) Calli were cultured on MS medium containing 1.0 mg/ℓ BAP.

2) Recorded three months after culture initiation on the regeneration medium.

Table 1-16. Effect of ABA on plant regeneration from epicotyl-calli¹⁾

Preculture on ABA medium (day)	ABA (mg/ℓ)	No. of shoots	Frequency (%) of shoot formation	No. of organogenic calli	Frequency (%) of o. c. formation ²⁾	No. of roots
1	0.0	2	10	0	0	12
	0.1	4	20	3	15	10
	1.0	0	0	0	0	0
2	0.0	0	0	2	10	6
	0.1	2	10	3	15	13
	1.0	2	10	1	5	15
4	0.0	0	0	0	0	12
	0.1	0	0	1	5	5
	1.0	2	10	1	5	17
8	0.0	0	0	2	10	15
	0.1	4	20	5	25	9
	1.0	2	10	0	0	9
10	0.0	1	5	0	0	20
	0.1	0	0	0	0	10
	1.0	2	10	0	0	13

1) Shoots, organogenic calli and roots were recorded three months after culture initiation on regeneration medium.

The experiment was based on 20 calli from a cultivar 'Erimo-shozu' which were cultured on MS medium in glass jars.

2) o. c: organogenic calli

する前培養の効果はなく、無処理区とほとんど差がみられなかった。

ハツネショウズ由来のカルスからの再分化植物体を順化、鉢上げして温室で栽培したところ、再分化当時は植物体の生育量が小さく、鉢上げ後2～3カ月で主茎長は15～20 cmで種子から発芽させた植物体よりも短めであった。主茎節数は6～7節で成熟期に達し、個体当りの莢数は少なく、1～2莢であった。しかし、開花は正常で花器等の外部形態も正常であった。ちなみに本実験で得られた再分化個体92個体のうち、枯死個体等を除いた81個体から合計262粒の種子を得ることができた。

2) カルス誘導培地の再分化に及ぼす影響

2,4-D単独の培地で誘導されたカルスからの再分化系が確立されたが、再分化までに要する期間が再分化培地に置床してから3カ月程度かかり、また再分化率も高いとは言えなかった。そこで、他のホルモン組成で形成されたカルスからの植物体再分化を試みた。すなわち、カルス誘導培地に含まれるオーキシシンとしてNAA、サイトカイニンとしてBAPを用い、その組合せが再分化に及ぼす影響について検討した。

材料及び方法

供試品種はハツネショウズ、エリモショウズ、及びカムイダイナゴンの3品種であった。基本培地はMS培地(30 g/l ショ等, 8 g/l 寒天, pH 5.8)で、上胚軸を培養瓶当たり(上胚軸の調製方法は、これまでの実験と同じで、無菌種子をホルモンプリーのMS培地に置床して発芽後伸長したものをを用いた)5本置床し、25°C, 3000 lux, 16時間照明下で培養した。

カルス誘導培地のホルモンとしてNAAを4濃度(0.05, 0.1, 0.5, 及び1.0 mg/l), BAPを3濃度(1.0, 2.0, 及び4.0 mg/l)とし、それらを組合わせて合計12種類の培地を供試した(Table 1-17)。上胚軸置床後4週間目に、上胚軸の両端に形成されたカルスを切り取り、0.2 mg/l BAPを含む培地に移植した。カルスは、培養瓶に5個ずつ置床した。カルス移植後4週間目に再分化率を調査した。対照として2 mg/l 2,4-Dで形成されたカルスを0.2 mg/l BAPで2カ月間培養したものをを用いた。

結果

供試した3品種において、処理した全てのカルス誘導培地でカルスが形成された。カルスの形状は、硬質でコンパクトであり、カルスから不定芽の再分化が確認された。0.2 mg/l BAPの培地に継代後4週間目で調査したところ、3品種ともにNAAが0.05 mg/l 及び0.1 mg/lの低濃度の時に不定芽形成率が高く、NAA濃度が

0.5 mg/l, 1.0 mg/lにまで高くなると不定芽形成率が低下し、不定根形成率が高まった。カムイダイナゴンでは、1.0 mg/l NAAを含む3種の処理区で不定根形成率が高かった(Table 1-17)。

最も不定芽形成率が高かったNAAとBAPの組合せではハツネショウズを用いて、0.05 mg/l NAA+2 mg/l BAPとした場合の形成率が90%であった。同様にエリモショウズでは、0.1 mg/l NAA+2 mg/l BAPで、83%、カムイダイナゴンでは、0.05 mg/l NAA+1 mg/l BAPで72%であった。このように、品種によって不定芽形成におけるカルス誘導培地のNAAとBAP濃度の最適の組合せが異なったが、全体的には、NAAは0.05 mg/lか0.1 mg/lで形成率が高く、またBAPは、1.0 mg/lか2.0 mg/lで高かった。また、2 mg/lの2,4-Dのみを添加したカルス誘導培地で形成されたカルスを0.2 mg/lのBAPを含む再分化培地で培養した区と比較すると、培養期間が2カ月目における不定芽形成率は明らかにNAAとBAPで誘導したカルスの方が高かった。さらに、カルスを0.2 mg/lのBAPに移植した時点で不定芽のみられるカルスもあった。

しかし、この培養系では、カルスの増殖が遅く、また、継代培養でのカルスの維持が困難であった。また、継代後、早期に再分化しないカルスでは、継代を重ねてもなかなか不定芽の形成がみられなかった。

考察

本実験では、2,4-Dを含む上胚軸から誘導したカルスを数回継代し、その乳白色で形状の柔らかいカルス(以下ソフトカルス)から植物体を再分化させることができた。カルスからの個体再分化はプロトプラスト培養法や各種のストレス処理やトキシシンを用いた細胞選抜のための基礎技術として重要である。

上胚軸を合成オーキシシンの一種である2,4-Dを含む培地で培養したところ、切断面からカルスが形成された。植物体に傷をつけるだけでも切断面にカルスが形成されることがあるが、アズキでは、傷をつけない部分にもカルス化が起こったので、2,4-Dはアズキ上胚軸からのカルス形成に重要な役割を果たしていると思われる。

再分化培地のBAPの濃度としては、上胚軸から再分化させる時とは異なり1.0 mg/lが適当であった。ソフトカルスからの不定芽形成率は、供試した6品種の中では20%程度であり高率でなかったが、上胚軸からの不定芽再分化と同様に品種間差がみられ、再分化率の高い品種(ハツネショウズ)と低い品種(エリモショウズ)があった。前節の実験で上胚軸からの再分化率が高かったベニダイナゴンではカルスからの再分化率も高い傾向に

Table 1-17. Effect of NAA and BAP concentration in the callus induction media on shoot and root formation from epicotyl-calli¹⁾

Cultivar	Induction media ²⁾			No. of calli	No. of shoots	Frequency (%) of shoot	No. of roots
	NAA	BAP (mg/ℓ)	2,4-D				
Hatsune-shozu	0.05	1.0		50	31	62	0
	0.05	2.0		50	40	90	1
	0.05	4.0		50	33	66	1
	0.1	1.0		50	14	28	1
	0.1	2.0		46	22	48	3
	0.1	4.0		48	11	23	1
	0.5	1.0		50	3	6	1
	0.5	2.0		50	6	12	2
	0.5	4.0		50	1	2	2
	1.0	1.0		50	4	8	6
	1.0	2.0		50	5	10	8
	1.0	4.0		50	2	4	3
			2.0	25	2	8	3
Erimo-shozu	0.05	1.0		50	21	42	1
	0.05	2.0		50	13	26	1
	0.05	4.0		50	12	24	0
	0.1	1.0		40	23	58	1
	0.1	2.0		40	33	83	2
	0.1	4.0		40	29	73	1
	0.5	1.0		50	12	24	6
	0.5	2.0		50	2	4	6
	0.5	4.0		50	1	2	3
	1.0	1.0		50	1	2	6
	1.0	2.0		50	1	2	4
	1.0	4.0		50	2	4	1
			2.0	25	1	4	2
Kamui-dainagon	0.05	1.0		50	36	72	2
	0.05	2.0		50	8	16	0
	0.05	4.0		50	1	2	0
	0.1	1.0		50	9	18	2
	0.1	2.0		50	12	24	3
	0.1	4.0		50	26	52	2
	0.5	1.0		50	8	16	7
	0.5	2.0		50	6	12	7
	0.5	4.0		50	9	18	4
	1.0	1.0		50	4	8	15
	1.0	2.0		50	3	6	20
	1.0	4.0		50	3	6	16
			2.0	25	1	4	3

1) Calli were cultured on regeneration MS medium containing 0.2mg/ℓ BAP in glass jars.

2) Concentration of plant growth regulators of callus induction media.

あったが、エリモショウズのように上胚軸からは比較的不定芽の再分化率が高いがソフトカルスからの再分化率は低いような品種もあった。これによりカルス化の状態、すなわち2,4-Dで誘導されたソフトカルスと前節で行ったBAP単独の再分化培地で形成された硬いカルスには再分化能に差があると思われた。

また、2,4-Dで誘導されたソフトカルスを用いた実験で、NAAとBAPを組合わせた再分化培地(0.05 mg/ℓ NAA+10.0 mg/ℓ BAP)で培養した場合、BAP単独の

再分化培地の場合に比べて、不定芽形成率の高まる傾向が認められた。しかし、不定芽が初めに再分化する迄には両者ともに3～4カ月を要したため、カルスからの再分化系において、期間短縮はさらに検討する必要がある。

ショ糖濃度を10～90 g/ℓの4段階に設定してソフトカルスからの再分化に及ぼす影響をみたところ、30 g/ℓ区で不定芽形成率が高かった。これは、上胚軸からの再分化系と同じ結果であった。

カルスを継代培養して行くとカルスからの器官分化が見られなくなることが知られている。Murashige と Nakano (1965) はタバコ細胞の継代培養において、培養開始後1年半で不定根分化能が、そして3年後には不定芽分化能が消失することを報告している。また、同様の試験において、継代培養中の細胞の染色体数を測定したところ、6年間継代した細胞ではほとんど全ての細胞が異数性であることを見出し、これが再分化能消失の原因であると考えた(Murashige と Nakano, 1967)。本実験でも1年間経過したソフトカルスでは再分化能が低下しており、その原因として染色体異常や再分化能に関与する遺伝変異などが考えられる。

サイトカイニンの作用を制御する ABA が培養系の不定芽分化に有効であることを示したのは山口ら (1972) が最初である。彼らはそれまで植物体の再分化が困難であったサツマイモにおいて、塊根組織片を ABA と 2,4-D を含む培地で培養し、その後に ABA を含まない培地で培養したところ不定芽が形成されたことを報告した。これを端緒にして他の植物種でも ABA の効果が報告された (Shepard, 1980 ; Torrizo ら, 1986 ; Sen ら, 1989)。アズキにおいてはソフトカルスに ABA を前処理した結果、再分化率は若干向上したが顕著な効果はみられなかった。ABA の効果も植物種や組織に依存していると思われる。

尾崎 (1985) は、0.05 mg/l NAA+1.0 mg/l BAP、及び 0.1 mg/l NAA+2.0 mg/l BAP を含む培地等で形成された硬いコブ状のカルスを 0.2 mg/l 及び 1.0 mg/l の BAP を含む培地に移植したところ不定芽形成が認められたことを報告している。用いた供試品種は異なったが、同様の実験を行ったところ、本試験では全ての処理区で不定芽形成がみられた。しかし、この様な培地で形成されたカルスは硬くて継代培養が困難であった。さらに不定芽の形成がみられないカルスはそのまま長期間維持すると、ソフトカルスと同様に再分化率が低下した。これに対して、2,4-D 単独で形成されたソフトカルスは増殖が良好で、形態的にも柔らかくて継代しやすく細胞選抜などには適していると思われた。

Organogenic カルスはホルモンフリー培地で維持することができ、このカルスが形成されてから7カ年経過した現在でも再分化能を有しており、継代毎に不定芽が再分化している。この組織はホルモンフリーの液体培地でも増殖することができ、実際に増殖したカルスからの再分化を確認している。この organogenic カルスの形成率をさらに高めると同時に、植物体の再分化条件を明らかにできれば、極めて効果的な培養系を確立し得るもの

と思われる。

以上のように上胚軸からのカルス誘導条件とカルスからの再分化条件を明らかにすることができた。さらに、これらの再分化植物体を順化し、鉢上げに成功して多くの種子を採取することができた。この方法で得られた植物体を用いることによって、アズキの細胞育種に新しい道を開くことができるであろう。

第3節 プロトプラストからの植物体再分化

植物のプロトプラストは、1892年に Klercker によって原形質分離させた組織の一端をかみそりで機械的に切断することにより得られたのが最初である。酵素を用いてプロトプラストを得たのは、Cocking (1960) であり、さらに、1968年になって Takebe らによって市場より購入可能な酵素によりプロトプラストを調製できることが示された。そして1971年に Takebe らはタバコの葉肉プロトプラストからの植物体再分化にも成功した。以来多くの植物でプロトプラストからの再分化が報告されている。

このように植物のプロトプラストから植物体が再分化されるようになり、この技術が作物育種に応用されるようになった。たとえば、作物の品種育成における遺伝変異の拡大に適用でき、「細胞育種」と呼ばれる分野が成立した。1973年に Carlson がプロトプラスト培養及び細胞選抜によりタバコ野火病菌抵抗性のタバコを作出して以来、耐病性やその他の有用形質が多数得られている (真山, 1990)。

さらに、プロトプラストは相互に融合する性質があり、体細胞雑種が作られる。また、微量注入法、エレクトロポレーションの方法によりプロトプラストへ直接遺伝子を導入することが可能となり、その細胞からの植物体再分化も多数報告されている (マメ科のダイズでは Dhir ら (1991) が報告)。

本節では上胚軸及び培養細胞からプロトプラストを単離し、その初期培養の条件を検討し、さらに得られたプロトプラスト由来のカルスからの効率的な個体再分化を検討した。

1) 上胚軸からのプロトプラストの単離及び培養

前節までの実験結果から、アズキの上胚軸は植物体再分化能が高く、かつ材料の調製が容易で大量に得られることが明らかとなった。そこで、まず、上胚軸組織に由来するプロトプラスト培養系の確立を試みた。

材料及び方法

(1) 供試材料

ハツネショウズ、サホロショウズ、及びカムイダイナ

ゴンの種子を MS 基本培地 (30 g/l ショ糖, 8 g/l 寒天, pH 5.8) に無菌的に播種し、発芽後 1 週間程度経過させて、莖長で 4~5 cm に伸長した上胚軸を用いた。

(2) プロトプラストの単離及び培養方法

酵素液は、下記の組成の酵素液を CPW 塩 (Frearson ら, 1973) を含む 0.4 M マニトール液で半分量に希釈して使用した。上胚軸を鋭利なかみそりで縦に 1 mm 幅に細断した上胚軸約 2 g を酵素液が 20 ml 入った 100 ml の三角フラスコに入れて 25°C の暗黒下で 16 時間処理した。

酵素液: 1% セルラーゼオノズカ RS, 0.1% ペクトリアーゼ Y 23, 1.5% ドリセラゼ, 0.4 M マニトール, CPW 塩, pH 5.7

酵素処理後 44 μ m のステンレスメッシュでプロトプラスト-酵素懸濁液をろ過し、ろ液を遠沈管にとり、それに等量の W 5 液 (Menczel ら, 1981) を加えて 850 rpm で 5 分間遠心した。沈澱を W 5 液に懸濁して同じ条件下で再遠心した。得られた沈澱を 8 ml の 0.6 M ショ糖液に懸濁し、2 ml の 0.4 M マニトール液を積層し、850 rpm で 5 分間遠心した。遠心後、マニトールとショ糖の界面に集まったプロトプラストをパスツールピペットで回収し、0.4 M マニトール液に再懸濁し、血球計算盤でプロトプラスト数を数え、細胞密度 1×10^5 /ml に調整して、培養に供した。

プロトプラストの活性 (生存率) は、単離されたプロトプラストを 0.5 M マニトール + 1% エバンスブルー染色液 (Kanai と Edwards, 1973) に懸濁して検鏡し、藍色に染色されない細胞を生細胞とした。1 シャーレ当たりランダムに 200 細胞以上について 2 回計測した。2 シャーレを計測して得られた平均値を生存率とした。

(3) プロトプラストの培養

MS 培地を基本培地とする固体培地と液体培地を用いた。浸透圧の調整はグルコースで行った。ホルモンは、1 mg/l 2,4-D と 1 mg/l BAP を基本として用いて、以下の初期培養条件を検討した。6 cm のプラスチックシャーレに培地を 3 ml 入れ、培養開始後 10 日間は暗黒下で、それ以降は弱光下において 25°C で培養した。分裂率は培養 14 日後に全細胞当たりの分裂細胞の割合で示した。1 シャーレにつき 200 個以上ずつ 2 回数えて 1 処理につき 3 シャーレを計測して平均とした。

培養初期の分裂に及ぼす条件としてアミノ酸であるプロリンとポリアミンであるスベルミジンの添加の有無について検討した。ホルモン条件としては、1 mg/l 2,4-D 単独区、及び 1 mg/l NAA 単独区、また、2,4-D、及び NAA と 1 mg/l の BAP、及びカイネチンをそれぞれ

組合わせた合計 6 種類の培地を設定し (Table 1-19 参照)、プロトプラストの分裂率を調査した。

浸透圧調節剤としてソルビトール (0.3 M) とグルコース (0.3 M, 0.4 M) の比較を行った。さらにアガロースの効果についても検討した。プロトプラストをアガロースに包埋する場合には、プラスチックシャーレにプロトプラストと液体培地の懸濁液 (1.5 ml ないし 2 ml) をあらかじめ入れておき、これに 1% のアガロースを含む培地を懸濁液と等量混ぜ、最終的な濃度が 0.5% になるように調整した。

液体培養の場合には、培養開始後 14 日目にグルコースを 0.2 M に減じた培地 2 ml をシャーレに添加した。アガロースで包埋した場合には、プロトプラストの入ったアガロースの平板をステンレスの計量スプーンで 4 片に切り分け 2 片を新しいシャーレに移し、それぞれのシャーレに 0.2 M の液体培地 (MS 基本培地, 0.5 mg/l 2,4-D, 1 mg/l BAP) を添加した。さらに、両培地ともに 2 週間毎にグルコース濃度をさらに 0.1 M に下げた新しい液体培地を添加し、コロニーの生育を促した。

(4) 再分化培地の検討

培養開始後 40~50 日の小カルスを増殖培地上 (MS 基本培地, 30 g/l ショ糖, 0.5 mg/l 2,4-D, 1 mg/l BAP, 8 g/l 寒天) で 2 週間培養し、直径 2~3 ml 程度に増殖させた後、再分化培地に置床した。培養容器はガラス製の培養瓶で、瓶あたり 5 個のカルスを置床した。培養条件は 25°C で 3000 lux, 16 時間日長に置いた。再分化培地はホルモンとして BAP, NAA, IAA を組合わせたもの、もしくは BAP 単独の培地を用いて、1 か月毎に同じ種類の培地で継代した。再分化培地に置床後 3 か月目に再分化率を調査した。形成された不定芽はホルモンプリーの MS 培地に移植して発根を促した。

結果

プロトプラストの収量は上胚軸 1 g 当たり $1 \sim 2 \times 10^5$ 個程度であった。プロトプラストの生存率は 99% 以上であり、活性の高いプロトプラストを単離できた。上胚軸由来のプロトプラストの第 1 分裂は培養開始後 6~7 日に認められた。また、供試した 3 品種において、液体培地では分裂率が低く 2~3% であったが、プロトプラストをアガロースに包埋した固体培地の場合には、分裂率は液体培地に比べて 5 倍以上も高くなった。さらにプロリンやスベルミジンを添加することによって分裂率は大幅に高まった (Table 1-18)。ただし、その効果は、品種や添加物によっても異なった。ハツネショウズでスベルミジンを添加したときに得られた 33% が最高の分裂率であった。

培養初期の培地のホルモン組成に関して検討したのが Table 1-19 である。3 品種全てにおいて 2,4-D 及び NAA 単独区の場合に分裂率は低く、サイトカイニンの BAP と組み合わせることによって分裂率は高まり、特に 2,4-D と BAP を組合わせた時に、20%以上の分裂率となった。NAA と BAP の組合せでは、10%程度分裂したが、2,4-D と BAP との組合せに比べて分裂率は低かった。サイトカイニンとしてカイネチンを用いた場合、2,4-D と組合わせると 2,4-D を加えない場合よりも若干分裂率は高くなったが、その効果は小さかった。NAA とカイネチンの組合せでは、むしろカイネチンが阻害的に作用して NAA の単独区よりも分裂率が低くなる傾向にあった。

また、浸透圧については、培地中のアガロースの有無に拘らず、グルコースの濃度は 0.4 M より 0.3 M で分裂

率が高かった。また、浸透圧調節剤としてグルコースの代わりに 0.3 M のソルビトールを用いたところ、分裂率はグルコースの場合よりも低かった (Table 1-20)。なお、この場合でも、プロトプラストをアガロースに包埋した固体培地で分裂率が高かった。

次にカムイダイナゴンのプロトプラスト由来のカルスからの再分化を試みた (Table 1-21)。これによると培養開始後 3 カ月で、供試した 6 種類の培地全てにおいて不定芽の分化がみられたが、再分化率は 1~3%と低率であった。また、Table には示していないが、ハツネショウズ、サホロショウズの場合もプロトプラスト由来のカルスから再分化個体が得られた。

これらの再分化植物の外観はほとんどの個体で正常であったが、ハツネショウズの 1 個体で下位の葉の半分が薄い緑色を呈したものがみられた。再分化個体は、ホルモンフリー培地で発根を促し、順化して鉢上げし、温室でポット栽培した。この結果、カムイダイナゴンから 3 個体、ハツネショウズから 3 個体、サホロショウズからは 4 個体の再生植物が生育して採種することができた。

2) 培養細胞からのプロトプラストの単離及び培養

前節において上胚軸から直接プロトプラストを単離して培養したところ、プロトプラストは分裂してコロニーを形成し、やがてカルスに生育し、そのカルスから植物体の再分化に成功した。しかし、プロトプラストの収量が低かったために、さらに実験を進めて培養の初期条件やカルスからの再分化条件を検討することが困難であった。そこで、上胚軸から誘導されたカルスからプロトプラストを単離して、その培養系の確立を試みた。

材料及び方法

(1) 供試材料

上胚軸由来のカルス (誘導方法は本章第 2 節の上胚軸カルスからの植物体再分化と同様) を液体培地 (MS 基本

Table 1-18. Effect of spermidine and proline on protoplast division on MS medium after 14 days of culture¹⁾

Cultivar	Basal ²⁾ medium	+A ³⁾	+spd ⁴⁾	+pro ⁵⁾
Hatsune-shozu	2.0	16.0	33.0	28.0
Sahoro-shozu	2.2	12.0	19.4	24.5
Kamui-dainagon	2.9	19.6	27.2	28.5

- 1) Protoplasts were cultured at a density of $10^5/\text{mL}$.
- 2) MS medium supplemented with 0.3M glucose, 1mg/ℓ 2,4-D and 1mg/ℓ BAP.
- 3) Basal medium containing 0.5% agarose.
- 4) Basal medium containing 0.5% agarose and 1.5mg/ℓ spermidine.
- 5) Basal medium containing 0.5% agarose and 1.5mg/ℓ proline.

Table 1-19. Effect of plant growth regulators on protoplast division in agarose-solidified MS media after 14 days of culture

Frequency (%) of protoplast division ¹⁾				
2,4-D	NAA	BAP	KIN	
(mg/ℓ)				
			Hatsune-shozu	Sahoro-shozu
1.0			6.0	8.0
1.0	1.0		20.1	25.6
1.0		1.0	8.0	10.9
	1.0		3.5	4.0
1.0	1.0		10.6	13.8
1.0	1.0	1.0	2.5	3.9

- 1) Protoplasts were cultured at a density of $10^5/\text{mL}$.

Table 1-20. Effect of osmotic pressure on protoplast division on MS medium after 14 days of culture¹⁾

Cultivar	Glucose(0.3M)		Glucose(0.4M)		Sorbitol(0.3M)	
	Agarose		Agarose		Agarose	
	- ²⁾	+ ²⁾	-	+	-	+
Hatsune-shozu	7.3	19.8	3.6	13.0	1.8	3.5
Sahoro-shozu	4.0	16.8	3.5	12.0	2.0	8.5
Kamui-dainagon	18.1	38.6	10.0	25.2	12.2	17.6

- 1) Protoplasts were cultured MS medium containing 1mg/ℓ 2,4-D, 1mg/ℓ BAP and 0.5mg/ℓ MES at a density of $10^5/\text{mL}$.
- 2) -: Liquid medium, +: Agarose (0.5%)-solidified medium.

Table 1-21. Effect of plant growth regulator on plant regeneration via callus from protoplast¹⁾

Growth regulator in the medium			No. of calli	No. of shoots	Frequency (%) of shoot formation	No. of o. c. ²⁾	Frequency (%) of o. c. formation	No. of root
BAP	NAA	IAA						
0.2			100	1	1.0	1	1.0	0
1.0			100	2	2.0	2	2.0	2
1.0	0.1		100	1	1.0	0	0.0	3
2.0	0.1		100	3	3.0	0	0.0	2
5.0	0.1		100	1	1.0	0	0.0	2
1.0		0.1	100	1	1.0	1	2.0	1

1) Protoplasts were isolated from epicotyl of a cultivar Kamui-dainagon.

2) o. c.: organogenic calli.

培地, 30 g/l ショ糖, 2 mg/l 2,4-D)において培養した。培養容器は100 mlの三角フラスコで培地量は30 mlとした。まず, 約1 gのカスを1週間培養し, その懸濁液を径710 μ mのメッシュでろ過し, メッシュを通った懸濁液5 mlを新しい液体培地に移植した。継代は同じ液体培地で7日ごとに行い, 培養条件は25°C, 約1,000 lux, 16時間日長, 回転数100 rpmで回転振とう培養した。プロトプラストの単離に用いた材料は, 継代4~10日後のカスとした。供試品種はハツネショウズ, サホロショウズ, エリモショウズ, アカネダイナゴン及びベニダイナゴンの5品種を用いた。

(2) プロトプラストの単離

カスを0.4 Mのマニトール液で洗浄後, 下記の酵素液で20 rpm, 16時間, 25°C, 暗黒下において処理してプロトプラストを単離した。処理したカスの量は, Packed cell volume (圧縮細胞量) で4 mlであり, その細胞を酵素液が20 ml含まれる100 mlの三角フラスコに懸濁した。

酵素液: 1%セルラーゼオノズカ RS, 0.1%ペクトリアーゼ Y 23, 1.5%ドリセラゼ, 0.4 M マニトール, CPW 塩, pH 5.7

酵素処理後, 44 μ mのステンレスメッシュでプロトプラスト-酵素懸濁液をろ過し, ろ液を遠沈管にとり, 850 rpmで5分間で遠心した。沈澱を10 mlの0.4 Mのマニトール液に再懸濁して再び遠心した。その沈澱を8 mlの0.6 M ショ糖液に懸濁し, その上に2 mlの0.4 Mのマニトールを積層して850 rpmで5分間遠心した。以下の調製方法は前節と同様に, 遠心後マニトール液とショ糖液の界面に集まったプロトプラストをパスツールピペットで回収し, 0.4 Mのマニトール液に再懸濁し, 血球計算盤でプロトプラスト数を測定して所定の濃度により培養に供した。プロトプラストの生存率の測定方法は前節と同様である。

(3) プロトプラストの培養

MS培地を基本培地とし, 浸透圧の調整はグルコースで行った。ホルモンは, 2,4-DとBAPを用いて, 6 cmのプラスチックシャーレに培地を3 ml入れ, 以下の初期培養条件を検討した。プロトプラストをアガロースに包埋する方法としては, まず, プロトプラストと液体培地の懸濁液1 mlをシャーレに入れ, そこに, 0.8%のアガロースを含む培地を2 ml添加して, 混合した。したがって最終的にアガロース濃度は0.53%となった。培養開始より10日間は暗黒下で, それ以後は弱光下において25°Cで培養した。分裂率は培養10日目の全細胞当たりの分裂細胞の割合により示した。1シャーレにつき200個以上2回数え, 1処理につき3シャーレを計測して平均した。

検討項目は以下の通りである。すなわち, ①2,4-DとBAPのホルモンバランスで, 濃度はTable 1-22に記載してある。②浸透圧はグルコースで調整し, 濃度は, 0.2, 0.3, 及び0.4 Mとした。③培養開始時の細胞密度は0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 及び 5.0×10^5 個/mlとした。④アガロースとしてシグマのタイプVIIを用いて無添加区(液体培地)と0.53%添加区(固体培地)を設定し, それぞれの処理区について分裂率を比較した。

(4) 再分化培地の検討

培養開始後40~50日の小カスを増殖培地上(MS基本培地, 30 g/l ショ糖, 0.5 mg/l 2,4-D, 1 mg/l BAP, 8 g/l 寒天)で直径2~3 mm程度に増殖させた後, 再分化培地に置床した。再分化培地はホルモンとしてBAPとカイネチン, ゼアチン, ABA, IAAをそれぞれを組み合わせたもの, もしくはBAP単独の各培地を設定し, さらにカサミノ酸を添加した場合もあった(Table 1-24参照)。カスは, ガラス瓶に5個ずつ置床した。培養条件は25°C, 約3,000 lux, 16時間日長で, 1カ月毎に同じ再分化培地に継代した。再分化培地に置床して3カ月後

Table 1-22. Effect of 2,4-D and BAP concentrations on protoplast division in liquid and agarose-solidified MS media

2,4-D (mg/ℓ)	BAP (mg/ℓ)	Frequency(%) of protoplast division ¹⁾	
		liquid medium	solidified medium
0.1	0.0	1.7	2.5
0.1	0.05	6.8	7.0
0.1	0.1	13.8	16.0
1.0	0.0	1.9	7.7
1.0	0.5	10.7	29.0
1.0	1.0	14.0	30.4

1) Protoplasts were cultured at a density of 10^5 /ml.
Cultivar: Sahoro-shozu.

に再分化率を調査した。形成された不定芽はホルモンフリーの MS 培地で発根を促して生育させた。

結果

プロトプラストの収量は Packed cell volume 当たり約 2×10^6 個であり、上胚軸から単離した場合より 10 倍程度高収であった (Plate III-3A)。また、プロトプラストの活性は単離直後では 98% 以上であった。

プロトプラストの分裂に及ぼす 2,4-D と BAP の濃度比の影響をみたのが、Table 1-22 である。2,4-D の濃度は 2 段階として、BAP の濃度は無添加、2,4-D の濃度の半分量、及び 2,4-D の濃度と等量の 3 段階として、これらを組合わせた 6 種類について分裂率を比較した。これによると、BAP が無添加の時は分裂率が低く 2% 未満であったが、BAP を 2,4-D の半分量まで加えると分裂率が高まり、さらに BAP と 2,4-D とを等量加えた時に最も分裂率が高かった。アガロースを添加した培地ではその効果が大きく、分裂率は 30.4% と高率であった。これは、上胚軸から単離されたプロトプラストの場合と同様の実験結果であった。液体培地における分裂率は、2,4-D が 0.1 mg/ℓ と 1.0 mg/ℓ とでは、ほとんど差がみられなかったもので、以後の実験は 1.0 mg/ℓ の 2,4-D、1.0 mg/ℓ の BAP の組合わせにより行った。

次にグルコースによる培地の浸透圧の調整を検討した。供試した 4 品種全てにおいて、グルコースが 0.2 M の場合にはプロトプラストの分裂がみられず、その後培養を続けてもほとんどの細胞が死滅した。一方 0.3 M 区においてはどの品種でもプロトプラストは最も良く分裂し、0.4 M では分裂率が低下した (Table 1-23)。また、グルコース 0.3 M 区で 5 品種を比較するとサホロショウズとハツネショウズでは分裂率が高く、エリモショウ

Table 1-23. Effect of osmotic pressure for protoplast division on the MS media containing 1mg/ℓ 2,4-D and BAP¹⁾

Cultivar	Frequency(%) of protoplast division		
	Glucose (M)		
	0.2	0.3	0.4
Sahoro-shozu	0.0	13.8	1.7
Hatsune-shozu	0.0	15.3	3.2
Erimo-shozu	0.0	4.9	1.0
Akane-dainagon	0.0	11.9	2.0
Beni-dainagon	0.0	8.0	0.8

1) Protoplasts were cultured at a density of 10^5 /ml.

ズでは分裂率が低かった。Table には示さなかったが、マニトールで浸透圧を調整した場合に、グルコースの場合と同様、0.3 M で高い分裂率を示し、その値はグルコースに比べて 3 分の 1 以下であった。

次に、分裂に及ぼす培養開始時のプロトプラストの細胞密度の影響について検討した (Fig. 1-1)。これによると 0.25, 0.5, 1.0×10^5 /ml と細胞密度が増加するにしたがって 2 品種ともに分裂が高まった。さらに 2.0×10^5 , 5.0×10^5 と密度が高まるにつれて、分裂率は若干高まったが、培地が褐色になり、分裂の進行が遅れるか、または、全く生育が停止した。したがって細胞密度は、 1×10^5 /ml が適当と思われた。アガロースを添加して作成した固体培地と液体培地における分裂率とを比較したのが Fig. 1-2 である。供試した 5 品種のいずれにおいても固体培地の方が液体培地よりも分裂率が高かった。特にハツネショウズとサホロショウズでは固体培地の効果が顕著であった。しかし、エリモショウズとベニダイナゴンではその効果が明確ではなかった。

液体培地と固体培地におけるプロトプラストの分裂率を経時的に調査したのが Fig. 1-3 である。培養開始から 3 日目までは両培地でほとんど差がみられず、分裂はあまりみられなかったが、3 日目以降分裂率に差がみられ始め、固体培地では 5 日目 (Plate III-3B) から 10 日目にかけて分裂するものが急増し、この結果最終的な分裂率に 2 倍以上の差異を生じた。

次に生育したコロニー (Plate III-3C) を増殖培地上で培養し (Plate III-3D)、直径 2~3 mm に生育したカルスを再分化培地に置床し、植物体の再分化に及ぼすホルモンの影響について検討した (Table 1-24)。

サホロショウズのプロトプラスト由来カルスでは、不定芽の形成 (Plate III-3E) が培地 No.1, 3, 6, 及び 7 でみられ、それぞれ 1~4% の形成率となり、No.6 (1 mg/ℓ

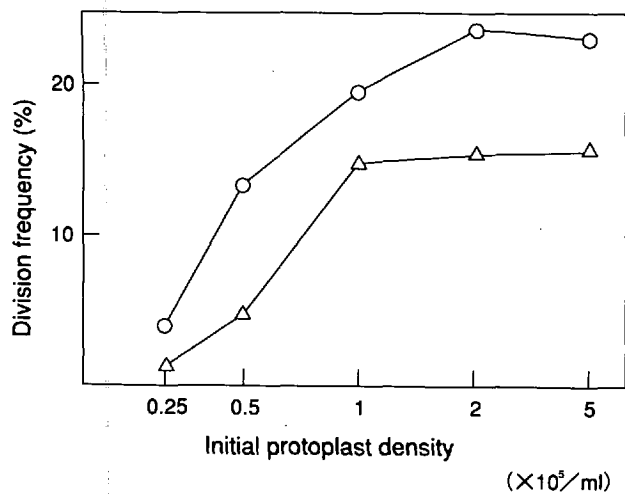


Fig. 1-1. Effect of protoplast density on protoplast divisions after 10 days of culture in MS liquid medium.

○ Hatsune-shouzu. △ Sahoro-shouzu.

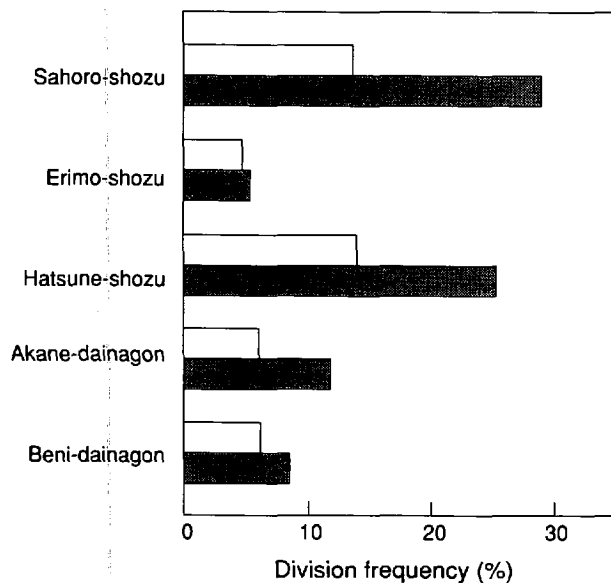


Fig. 1-2. Frequency of protoplast divisions in liquid and agarose-solidified MS medium after 10 days of culture.

□ liquid, ■ agarose-solidified.

BAP+0.1 mg/l IAA) では4%であった (Table 1-24)。不定根は全ての培地で形成されたが、特に形成率の高かったのは培地 No.2 (0.5 mg/l BAP+カイネチン+ゼアチン) で20%であった。Organogenic カルスは、4種類の培地で形成され、形成率の高かったのは培地 No. 5 (1.0 mg/l BAP) の6%であった。また、再分化個体の中には細葉で、多くの節をもつ個体が出現した (Plate

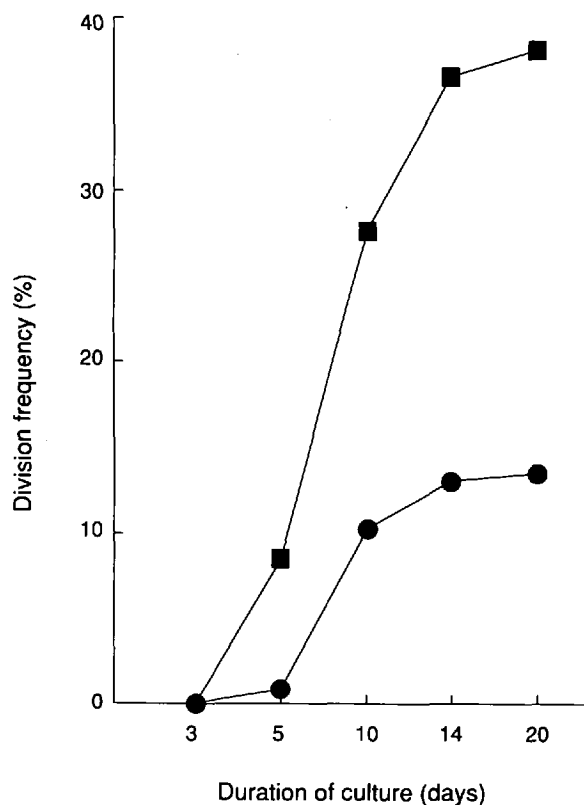


Fig. 1-3. Increase of protoplast divisions after plating in liquid and agarose-solidified MS media. Protoplasts isolated from Sahoro-shouzu were cultured at a density $10^5/\text{ml}$.

● liquid, ■ agarose-solidified.

III-3F)。

ペニダイナゴンのプロトプラスト由来カルスにおいて不定芽が形成された培地は No.5 と No.6 (1 mg/l BAP+0.1 mg/l IAA) の2種類で、それぞれ、1.3%と1.0%の形成率であったが (Table 1-25), Organogenic カルスは供試した全ての培地で形成され、培地 No.6 と No.7 (5.0 mg/l BAP) で高い傾向にあった。不定根は供試した全ての培地で形成され、形成率の高かった培地は No.2 であった。

ハツネショウズのプロトプラスト由来カルスにおいて培地 No.4 (0.5 mg/l BAP+カイネチン, 500 mg/l カサミノ酸), 5, 6, 7, 及び 8 (10.0 mg/l BAP) の5種類の培地で不定芽が形成され、培地 No.4 と No.6 では4%の形成率であった (Table 1-26)。不定根は5種類の培地で形成され、培地 No.1 (0.5 mg/l BAP, カイネチン) で12%の形成率であった。Organogenic カルスは、培地 No.3 (0.5 mg/l BAP+0.5 mg/l カイネチン, 0.1 mg/l ABA), No.5, 6, 及び 7 でそれぞれ形成され、No. 3 では10.0%の形成率であった。

Table 1-24. Effect of plant growth regulator on plant regeneration via callus from protoplast¹⁾

No.	Growth regulator						No. of calli	No. of shoots	Frequency(%)	No. of o. c. ³⁾	Frequency(%)	No. of roots	
	BAP	KIN	ZEA	ABA	IAA	CH ²⁾			of shoot formation		of o. c. formation		
<i>Cultivar: Sahoro-shozu</i>													
1	0.5	0.5					100	2	2.0	3	3.0	7	
2	0.5	0.5	0.5				50	0	0.0	2	4.0	10	
3	0.5	0.5		0.1			100	1	1.0	0	0.0	3	
4	0.5	0.5				500	100	0	0.0	0	0.0	15	
5	1.0						50	0	0.0	3	6.0	9	
6	1.0				0.1		50	2	4.0	1	2.0	1	
7	5.0						100	3	3.0	0	0.0	4	
8	10.0						50	0	0.0	0	0.0	2	
<i>Cultivar: Beni-dainagon</i>													
1	0.5	0.5					100	0	0.0	2	2.0	12	
2	0.5	0.5	0.5				150	0	0.0	5	3.3	26	
3	0.5	0.5		0.1			100	0	0.0	1	1.0	12	
4	0.5	0.5				500	100	0	0.0	4	4.0	10	
5	1.0						150	2	1.3	1	0.7	5	
6	1.0				0.1		100	1	1.0	4	4.0	2	
7	5.0						150	0	0.0	14	9.3	3	
8	10.0						130	0	0.0	2	1.5	3	
<i>Cultivar: Hatsune-shozu</i>													
1	0.5	0.5					50	0	0.0	0	0.0	6	
2	0.5	0.5	0.5				50	0	0.0	0	0.0	2	
3	0.5	0.5		0.1			50	0	0.0	5	10.0	0	
4	0.5	0.5				500	50	2	4.0	0	0.0	5	
5	1.0						50	1	2.0	4	8.0	0	
6	1.0				0.1		50	2	4.0	2	4.0	2	
7	5.0						50	1	2.0	1	2.0	0	
8	10.0						50	1	2.0	0	0.0	2	

1) Protoplasts were isolated from suspension cells.

2) CH: casein hydrolysate.

3) o. c.: organogenic calli.

エリモショウズ、アカネダイナゴンのプロトプラスト由来カルスからも同様に不定芽が形成され、供試した全ての品種から不定芽が形成された。また、その後も organogenic カルスの培養を続けることにより不定芽が形成され、培養後 10 カ月でハツネショウズでは 10 個体、サホロショウズでは 20 個体の再分化個体を得ることができた。

ところが初めに不定根が形成されたカルスでは、その後、培養を続けても不定芽は形成されず、また、organogenic カルスも形成されなかった。これは、上胚軸由来カルスからの再分化の場合と同じであった。

形成された不定芽はホルモンフリーの MS 培地で発根を促し生育させ、1 週間順化してから温室に鉢上げした (Plate III-3G)。その後、これらの再分化個体は順調に生育して結実した。採種できた個体数はサホロショウズでは 5 個体、ハツネショウズでは 6 個体、エリモショ

ウズでは 3 個体、アカネダイナゴンでは 6 個体、ベニダイナゴンでは 5 個体であった。

考察

プロトプラスト培養は遺伝子導入や細胞融合、細胞選抜などに広く用いられるが、アズキのプロトプラスト培養については Koulin Ge ら (1989) と著者ら (佐藤ら, 1989; Sato ら, 1993) の報告がある。Koulin Ge ら (1989) は、無菌的に養成したアズキの初生葉の葉肉プロトプラストを液体培地で培養してカルスを誘導し、そのカルスから植物体の再分化に成功したが、その再分化個体の特性に関しては記載していない。これに対して、本研究では、上胚軸及び上胚軸に由来するカルスからプロトプラストを単離して、再分化実験に供して種子稔性の高い再分化個体迄を得ることができた。

プロトプラストの単離に用いた組織の種類や生育ステージはその後の培養の成否を左右する重要な要素であ

る。タバコなど双子葉植物では葉が用いられるが、単子葉植物であるイネ科植物では葉からプロトプラストを単離することがかなり困難で、またプロトプラストの分裂能力も極めて低かった。したがって、イネでは再分化能の高い種子カルスからプロトプラストを単離する方法が開発されている (Fujimura ら, 1985)。前述の Koulin Ge ら (1989) は初生葉を用いていたが、今回アズキの初生葉は再分化能力が低く外植片としては不適と判断されたので、本実験では再分化能の高い上胚軸とそれから誘導したカルスを用いた。

プロトプラストの単離にはセルラーゼ・ゼオノズカ RS、ペクトリアーゼ Y 23 及びドリセラゼの混合酵素液を用いたが、これらの酵素はプロトプラストの単離に常用されており、アズキの場合も特に問題なく使用することができた。

上胚軸から直接単離する場合には、材料の細断などが必要で酵素処理が煩雑となったが、液体培養したカルスは取り扱いが簡単で酵素処理も容易であった。また、プロトプラストの収量は培養細胞を用いた方が上胚軸よりも 10 倍も高く、また分裂までに要する時間も短期間で、材料として優れていた。

一般に、プロトプラストの分裂初期にホルモンが重要な役割を果たすと言う報告が多いが、マメ科ではオーキシシン (2,4-D) とサイトカイニンの組合わせが多用されている (Puonti-Kaerlas と Eriksson, 1988; Krishnamurthy ら, 1984; Wei と Xu, 1988)。Koulin Ge ら (1989) も NAA, 2,4-D, BAP 及びゼアチンの組合わせを用いて、高い分裂率を得ている。本実験でも、2,4-D 単独区では分裂率が数%と低かったが、2,4-D と BAP とともに 1.0 mg/l で組合わせた場合には最高 30% の分裂率を示した。

プロトプラストをアガロース培地に包埋して培養する手法は広く用いられているが、マメ科でも効果的であったとする報告が多い (Puonti-Kaerlas と Eriksson, 1988; Shillito ら, 1983; Gilmour ら, 1987)。その理由としては、アガロースによる細胞壁や細胞膜の保護作用や、細胞密度の均一化等が考えられる。本実験においても、液体培地よりもアガロースに包埋して培養した方がプロトプラストの分裂率が高かった。液体培地では培養中の細胞がシャーレの端に集まり部分的に細胞密度が高くなる場合がみられ、これが細胞の分裂や生育に阻害的に働いたと考えられる。また、液体培地の場合にはプロトプラストの褐変する場合が多くみられたが、アガロースで包埋した場合には細胞密度が適正 (1×10^5 /ml) であればそのようなことはなかった。培地の浸透圧はプロト

プラスト培養において特に重要な培養条件の一つであるが、一般に植物の種類や単離した組織によって最適の浸透圧が存在するとされている。Koulin Ge ら (1989) は浸透圧調節剤としてグルコースを用い、その最適の濃度を 0.5~0.6 M としている。本試験では、グルコースの 0.3 M が最適濃度であったが、0.2 M では全く分裂がみられず、また、0.4 M でも分裂頻度が著しく低かった (1~3%)。したがって、アズキのプロトプラスト培養においても培地の浸透圧は極めて重要であり、材料によって培地の最適浸透圧が異なることが示された。

上記の条件下でプロトプラストの初期分裂を誘導することが可能となったので、培養しているシャーレの中に新たに液体培地の追加によって培養をさらに継続した。培養開始後 40~50 日には直径 1 mm 程度の小カルスに迄成長したので、これを増殖培地に移植して、直径が 2~3 mm 程度迄増殖させてから再分化培地へ移植して不定芽形成を試みた。プロトプラストに由来するカルスからの再分化も基本的には組織やカルスから再分化させた場合と同様の培養条件が重要である。そこで、ホルモンについては BAP, カイネチン, ゼアチン, ABA, IAA の組み合わせについて検討した。その結果、BAP 単独区及び BAP とカイネチン, ゼアチン, ABA, 及び IAA をそれぞれ組合わせたいずれの区においても不定芽が分化したが、その形成率は低く、最高でも 4% であった。これに対して、Koulin Ge ら (1989) の場合には、BAP 単独区、もしくは NAA や IAA との組合せにおいて、60% 前後の高い再分化率であった。これは、再分化条件の違いというより、彼らのカルスそのものが高いた再分化能を持っていたことによると考えられる。本実験では、用いた上胚軸カルスの増殖率は良かったが再分化能に関しては無選抜の細胞系であったために、それから単離したプロトプラストの再分化率も低かった。今後は embryogenic な細胞系をまず選抜し、それを用いたプロトプラスト培養系の確立を図る必要がある。

以上のように、上胚軸及びそれから誘導したカルスから単離したプロトプラストの培養系を確立できた。この培養系はプロトプラストの分裂からカルス形成までは効率的であったが、カルスからの植物体の再分化が低頻度であったためさらに改良の余地が多い。しかし、本実験で供試した 6 品種から合計 79 個体の再分化個体を得て、そのうち 35 個体は正常に生育して結実した。したがって、今後この培養系を利用することにより、アズキにおいても細胞選抜や細胞融合、さらにはエレクトロポレーションによる遺伝子導入が可能となった。

第2章 再分化個体の特性

植物における細胞組織培養の過程において体細胞変異 (somaclonal variation) を生じることが知られている (Larkin and Scowcroft, 1981)。変異の生じるメカニズムは明らかでないが、近年、有用変異個体の新しい作出法として注目され、イネにおいて実用的な品種が育成されている (伊藤, 1990)。

マメ類における培養による体細胞変異の報告は、ダイズに関するものが多いが (Barwale と Widholm, 1987; Freytag ら, 1989; Graybosch ら, 1989; Stephens ら, 1991)、アズキについての報告例はない。

そこで本章ではアズキの組織培養によって得られた多数の再分化個体の後代を育成し、圃場レベルにおける農業形質を調査し、それらの特性を明らかにしようとした。

第1節 上胚軸カルスからの再分化個体の特性

前章においてアズキ上胚軸からカルスを誘導し、そのカルスから植物体を再分化させた。その植物体を温室にて栽培することにより多数の種子を得た。

本節では、その種子を圃場で栽培し、一般的な農業形質及び形態的な変異に着目して調査を行い、それぞれの原品種と比較してどのような変異を生じるかについて検討した。

材料及び方法

1) 供試材料及び培養方法

供試品種はハツネショウズ、エリモショウズ、ベニダイナゴン及びカムイダイナゴンである。これらの供試個体数、系統数を Table 2-1 に示した。また、出芽個体数、収穫個体数も合わせて示した。これらの系統は主に第1

章で得られた再分化個体に由来する。

ここで、再分化個体当代 (培養瓶内の個体) を R_0 世代とし、その自殖により得られた後代を R_1 とし、以下 R_2 , R_3 , ……とした。

ハツネショウズでは R_1 から R_5 , エリモショウズでは R_1 から R_3 , ベニダイナゴンでは R_1 及び R_2 , カムイダイナゴンでは R_1 代をそれぞれ供試した。

なお、試験は 1988 年～1992 年の 5 カ年であった。

2) 耕種概要

1989, 90, 91 年は R_1 種子をペーパーポット (テンサイ用のペーパーポットを長さを半分にしたもの) に播種し、北海道立中央農業試験場 (長沼町) の試験圃場に移植した。

栽植様式は、 R_1 と R_2 以降の系統は畦幅 60 cm, 株間 10 cm, 1 株 1 本立とした。系統当たりの供試個体数は 35 個体として 1 系統 1 列植えとした。

供試圃場の前作は毎年トウモロコシであった。圃場管理は中耕を 2～3 回, 除草を 3～4 回, 害虫防除を 3～4 回行った。その他は、北海道立中央農業試験場畑作部の小豆地域適応性検定試験に準じた (Plate IV-4A)。

3) 形質調査

生育期や草型等は圃場での観察調査によった。また、収穫時の主茎長、主茎節数、稈実莢数、一莢内粒数及び百粒重を調査した (Plate IV-4B 参照)。調査方法は R_1 は個体毎に、また、系統については平均的に生育していると思われる個体を任意に 1 系統当たり 10 個体選びその平均値を求めた。

Table 2-1. Growth of R_1 plants from epicotyl-callus used in the field performance test.

Cultivar	Generation	Year	No. of seeded plants	No. of germinated plants	No. of adult plants	No. of harvested plants
Hatsune-shozu	R_1	1988	229	84	63	63
		1989	216	139	131	129
		1990	268	229	217	217
		1991	297	257	245	243
Erimo-shozu	R_1	1990	31	30	29	29
		1991	56	52	48	48
Beni-dainagon	R_1	1991	86	54	52	51

結果

R₀ 個体の温室における生育は、一般に原品種の通常の種子からの個体に比べ劣る傾向にあった。すなわち、R₀ の再分化個体では原品種に比較して主茎長は短く、節数は少なく、稔実莢数も1～3ヶ程度であった。鉢上げした R₀ 個体の約3割は生育途中で枯死したが残りの7割は結実に至ったのでその自殖種子を圃場試験に供試することができた。

供試材料の圃場における生育状況は、5カ年を通じて

概ね良好であり、天候（降雨）や圃場の状態により播種日は各年次で異なったが、出芽期は播種してから10日から14日後であった。開花期は1990年が平年に比べてやや早く7月中旬であったが、その他の年次はほぼ7月下旬～8月上旬であった。成熟期は1990年が9月上旬であり平年に比べてやや早く1989年は逆に9月下旬でやや遅かったが、各年次とも生育障害や病害虫の発生は認められなかった（Table 2-3 参照）。

Table 2-2 には R₁ に出現した変異体の種類と出現率

Table 2-2. Number of variants in R₁ plants regenerated from epicotyl-callus

Cultivar	Variant	Year	No. of plants	No. of variants	Frequency (%)
Hatsune-shozu	Chimeral Abnormal growth	1991	245	1	0.4
		1988	229	1	0.4
		1990	217	1	0.5
	Dwarf	1991	245	1	0.4
		1990	217	2	0.9
		1991	245	5	2.0
	Long stem	1989	131	2	1.5
		1991	245	1	0.4
	Sterile	1989	131	2	1.5
		1991	245	2	0.8
Erimo-shozu	Long stem	1990	29	1	3.4
Beni-dainagon	Sterile	1991	52	1	1.9
	Long stem	1991	52	2	3.8
	Wrinkled leaf	1991	52	1	1.9

Table 2-3. Variation range of date of seeding, germination, flowering and maturity, main stem length and 100-grain weight in R₂ lines

Line ¹⁾	Year	Date of seeding	Date of germination	Date of flowering	Date of maturity
R ₂ (10)	1989	5.26	6.12(11-13) ²⁾	7.26(25-26)	9.30(9.28-10.5)
Hatsune-shozu	1989	5.26	6.12	7.26	9.26
R ₂ (72)	1990	5.18	6.9(4-18)	7.21(17-27)	9.3(8.31-9.6)
Hatsune-shozu	1990	5.18	6.14	7.21	9.2
R ₂ (62)	1991	6.6	6.17(16-20)	8.1(7.30-8.2)	9.12(7-14)
Hatsune-shozu	1991	6.6	6.16	8.1	9.11
R ₂ (48)	1992	5.29	6.15(13-17)	8.1(7.30-8.19)	9.18(13-21)
Hatsune-shozu	1992	5.29	6.14	7.31	9.13
Line ¹⁾	Year	Main stem length (cm)	100-grain weight (g)		
R ₂ (10)	1989	34.7(25.3-41.3)	12.7(11.4-13.6)		
Hatsune-shozu	1989	30.5(19-34)	11.3		
R ₂ (72)	1990	36.4(25.3-47.0)	11.7(10.6-13.6)		
Hatsune-shozu	1990	30.2(19-37)	10.7		
R ₂ (62)	1991	26.0(12.7-42.1)	13.4(9.9-15.5)		
Hatsune-shozu	1991	27.4(20-35)	12.4(11.7-14.0)		
R ₂ (48)	1992	20.8(8.7-39.8)	13.6(11.5-15.9)		
Hatsune-shozu	1992	16.6(11-23)	12.4(11.3-13.0)		

1) Number in parenthesis means number of tested lines.

2) Number in parenthesis means range of variation.

を示した。変異体の中にはアルビノ個体（上位葉のみ白葉 (Plate IV-4C), または植物体の片側だけ白色）や通常のアズキの形態と大きく異なる生育異常個体などがみられた。この生育異常個体の特徴は主茎節間が1~2 cmと短く、葉柄は0.5~1.0 cm, 本葉は退化して葉耳のみであり、開花はみられなかった (Plate IV-4D)。なお、同様の変異体は種子に放射線を照射した R_1 個体中にも出現した (村田, 未発表)。

その他、茎長が8 cm未満の矮性個体 (dwarf), 蔓化して茎長が長くなった個体 (long stem), 開花しても莢がつかない個体 (sterile, 不稔) や品種固有の成熟期の莢色の変化した個体等が出現した。それらの頻度は, Table 2-2 に示したように0.4%から3.8%であった。なお、不稔やアルビノについてはその後代を得ることができなかったが、エリモショウズにおいては、蔓化した個体の

後代は、次世代においても主茎長が原品種に比べて明らかに長かった。ベニダイナゴン由来の蔓化した2個体は、成熟が遅く、かつ収穫できた粒数も少なく、後代検定ができなかった。

以上の変異の他にも、エリモショウズの R_2 系統で成熟期が比較原品種より20日以上遅いものが2系統見いだされた。そのうち1系統は収穫時に成熟期に達せず採種できなかった。これらの2系統は R_1 代でも原品種のエリモショウズに比べ10日以上成熟が遅かった。

次に、再分化個体の一般的な農業形質について調査した。Fig. 2-1 及び 2-2 は1991年におけるハツネショウズとエリモショウズの2品種に由来する R_1 個体の成熟期における主茎長、稔実莢数、主茎節数、百粒重の頻度分布を示した。これによると、稔実莢数以外の主茎長、主茎節数および百粒重はそれぞれ正規分布を示した。しか

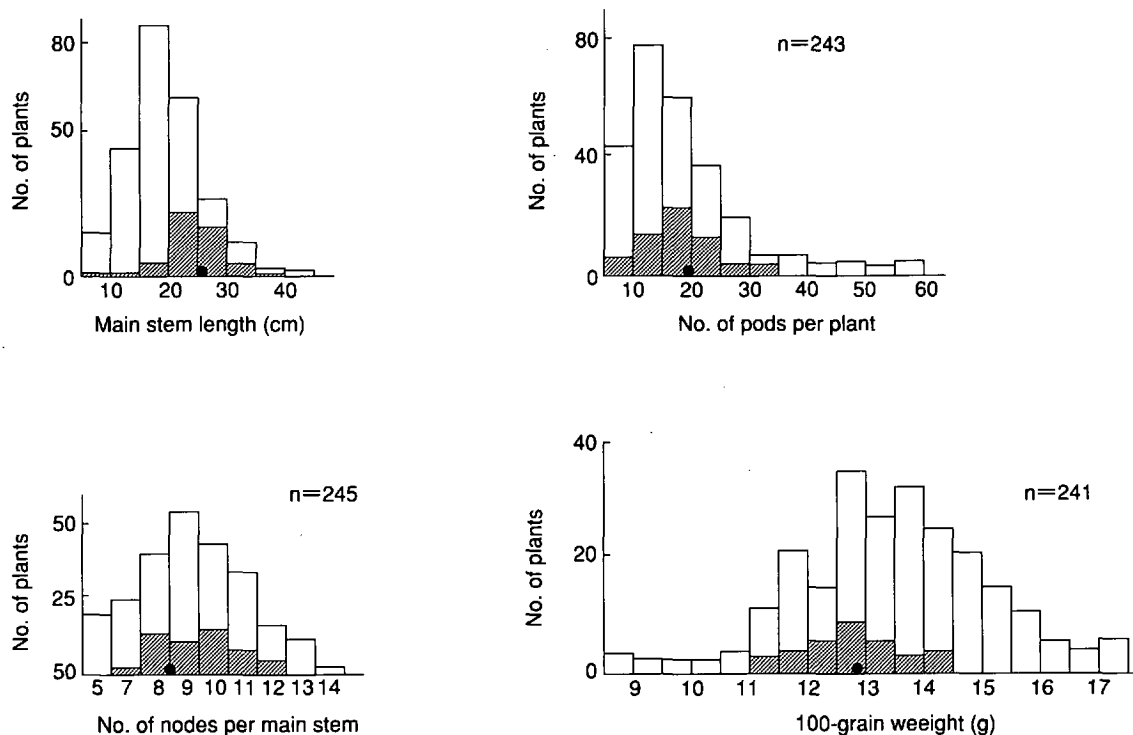


Fig. 2-1. Frequency distribution of agronomic traits in R_1 plants.

Cultivar: Hatsune-shozu.

□: R_1 plants.

n=245 for main stem length and no. of nodes per main stem

n=243 for no. of pods per plant

n=241 for 100-grain weight

▨: Control, ●: Control (mean).

n=50 for main stem length, no. of pods per main stem, and no. of nodes per main stem.

n=25 for 100-grain weight.

し、 R_1 個体では各形質において原品種の分布域から離れた個体がみられた。すなわち、主茎長については、短い方への分布の片寄りがみられ、莢数の分布は原品種より広く、平均莢数の 3 倍程度の莢数を持つ個体もみられた。

なお、百粒重に関する変異系統の選抜実験については第 3 節において検討する。

第 2 節 放射線照射種子の上胚軸培養による再分化個体及び次代系統の特性

組織培養由来の再分化個体における体細胞変異をより積極的に得るために変異原として X 線やガンマー線をまず種子に照射し、その上胚軸を培養して得られた再分化個体に由来する R_1 世代を圃場で養成して変異の誘発について検討した。

材料及び方法

X 線照射はオーミック照射用軟 X 線発生装置を用いた。また、ガンマー線の照射には農林水産省放射線育種場に依頼した。線量はそれぞれ 0, 10, 20 及び 40 krad とした。これらの種子はホルモンフリーの MS 培地に無菌的に播種し、前章の方法により上胚軸を調製して培養に供した。培地は MS 基本培地に 30 g/l ショ糖, 8 g/l 寒天, 及びホルモンとして 0.06 mg/l BAP (B 培地) または, 2.0 mg/l BAP+0.1 mg/l NAA (NB 培地) を添加したものを用いた。照射線量別に不定芽形成率と鉢上げ可能な植物体にまで生育した個体 (茎長 7~8 cm 程度) の割合を調査した。また、 R_1 代の養成と形態調査は前節と同じである。なお、供試品種及び個体数を Table 2-4 に示した。

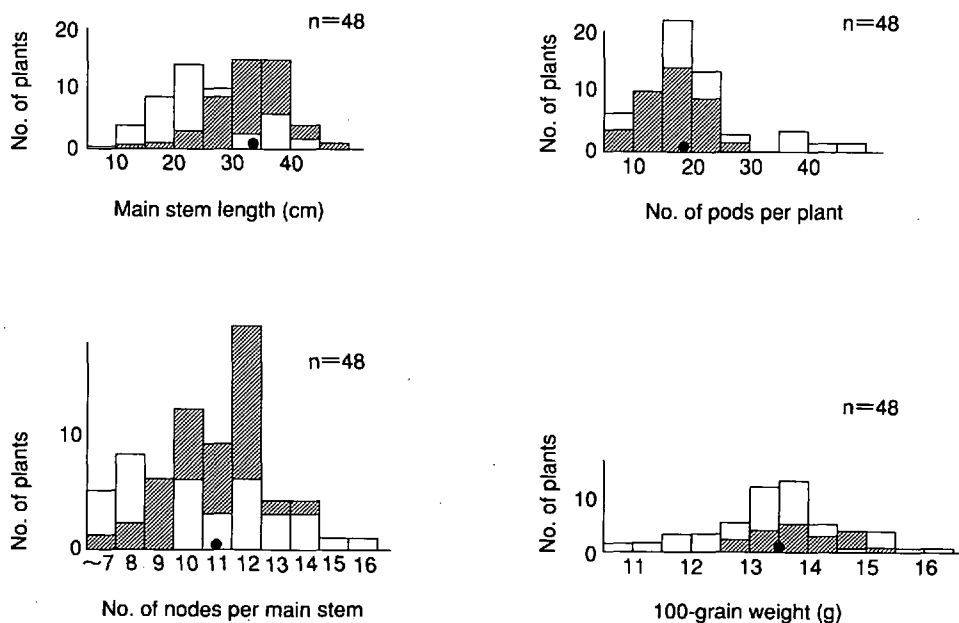


Fig. 2-2. Frequency distribution of agronomic traits in R_1 plants.

Cultivar: Erimo-shozu.

□: R_1 plants.

$n=48$

▨: Control, ●: Control (mean).

$n=56$ for main stem length, no. of pods per main stem, and no. of nodes per main stem.

$n=20$ for 100-grain weight

Table 2-4. Growth of R_1 plants from epicotyls obtained from irradiated seeds.

Cultivars	Generation	Year	No. of seeded plants	No. of germinated plants	No. of adult plants	No. of harvested plants
Erimo-shozu	R_1	1992	929	539	537	525
Hatune-shozu	R_1	1992	183	115	112	112
Kamui-dainagon	R_1	1992	409	268	267	265

Table 2-5. Growth index of epicotyl emerged from X-ray and γ -ray irradiated seeds

Mutagen	Dose (krad)	No. of seeds.	Growth index ¹⁾				
			—	+	++	+++	++++
			Frequency (%)				
Control		43	2.3	7.0	18.6	39.5	32.6
X-ray	10	87	1.2	2.3	36.8	47.1	12.6
	20	90	0.0	8.9	30.0	52.2	8.9
	40	94	6.4	10.6	30.8	42.6	9.6
γ -ray	10	99	1.0	33.3	34.3	33.3	8.1
	20	97	7.2	45.4	25.8	18.6	3.0
	40	99	37.3	23.2	28.3	11.2	0.0

1) —: No seeds were germinated.

+: Seeds were germinated and epicotyl length was smaller than 1 cm.

++: Epicotyl length was 1-3 cm.

+++: Epicotyl length was 3-8 cm.

++++: Epicotyl length was larger than 8 cm.

Cultivar: Erimo-shozu.

結果

Table 2-5 では X 線及びガンマー線照射の変異原が、発芽に及ぼす影響を示した。これによると播種後 10 日目の発芽程度は、X 線、ガンマー線ともに線量が高くなると不発芽が増え、発芽個体でも上胚軸の伸長度は明らかに抑制され、その程度は、ガンマー線照射区で著しかった。なお、各処理区において 3 cm 以上に伸長した上胚軸のみを培養に供した。

照射種子の上胚軸を培養した結果を Table 2-6 に示した。これによると上胚軸からの不定芽再分化率は、X 線 20 krad 照射では NB 培地、ガンマー線 20 krad 照射の B 培地でそれぞれ培養した区で低く、ガンマー線 40 krad 照射の B 培地及び NB 培地で培養した区で高い再分化率を示したが、それ以外の処理区では、再分化率が 50% 前後で顕著な差はみられなかった。しかし、その後の生育、つまり、鉢上げ可能な植物体にまで生育した個体率 (再分化個体率) は X 線、ガンマー線照射ともそれぞれ 40 krad 区で 33~39% という低い傾向がみられた。

これらの再分化個体 (R_0 代) の温室における生育は原品種に比べて劣っていた。また、照射種子からの再分化個体の中には、生育途中で枯死する個体が多く、採種できたのは鉢上げした個体の約 6 割であった。

Table 2-7 に形態的な変異を示した個体率の割合を示した。これによると両品種ともに照射区の再分化個体中に変異体を生じたが、無照射区ではみられなかった。例えば、エリモショウズとカムイダイナゴンでは不稔個体がみられた。また、エリモショウズでは X 線照射区で主茎長 6 cm の極めて矮化した個体が出現し、カムイダイナゴンのガンマー線照射区では稔実莢の色が原品種の白色から褐色に変ったものがあつた。変異体率は 1.3~6.7% であり、前節の変異体率よりも高い傾向を示した。

Table 2-8 にエリモショウズの照射次代 (R_1 代) における主茎長、稔実莢数及び百粒重の変異分布を照射処理及び培地別に示した。これによると、ほとんどの照射区でどの形質も原品種のエリモショウズよりも幅広い変異分布がみられた。主茎長では無照射区が照射区に比べて標準偏差が大きかった。 R_1 の稔実莢数は、原品種に比較して主茎長の分布よりも幅広い分布がみられた。また、ガンマー線 40 krad 照射で B 培地及び X 線 20 krad 照射で B 培地により培養した個体ではいずれも無照射区より標準偏差が大きかった。百粒重は粒数の少ない個体 (10 粒以下) を除いた結果であるが、上記の 2 形質と同様、幅広い分布がみられ、特に X 線 20 krad 照射の NB 培地で培養した区では、最も変異幅が広く 10.3~19.0 g

Table 2-6. Plant regeneration from epicotyls emerged from X-ray and γ -ray irradiated seeds

Mutagen	Dose (krad)	Medium ¹⁾	No. of epicotyls	No. of shoots	Frequency (%) of shoot formation	Frequency (%) of regenerated plants (%)
Control	0	B	339	150	44.2	55
	0	NB	331	196	59.0	50
X-ray	10	B	291	124	42.6	50
	10	NB	405	190	46.9	45
	20	B	387	174	45.0	39
	20	NB	495	190	38.3	44
	40	B	390	175	44.8	35
	40	NB	198	110	57.8	37
γ -ray	10	B	582	304	52.2	44
	10	NB	429	205	47.8	36
	20	B	375	153	40.8	46
	20	NB	279	125	44.8	27
	40	B	174	113	64.9	33
	40	NB	138	90	65.2	35

1) B: MS basal medium containing 30 g/l sucrose and 0.06 mg/l BAP.

NB: MS basal medium containing 30 g/l sucrose, 2.0 mg/l BAP and 0.1 mg/l NAA.

Cultivar: Erimo-shozu.

Table 2-7. Number of variants in R_1 plants regenerated from epicotyls emerged from X-ray and γ -ray irradiated seeds

Cultivar	Variant	Mutagen (dose)	Medium ¹⁾	R_1 generation		
				No. of plants	No. of variants	Frequency (%)
Erimo-shozu	Sterile	X-ray (20k)	B	27	1	3.7
		X-ray (20k)	NB	155	8	5.2
		X-ray (40k)	B	45	2	4.4
		γ -ray (20k)	B	15	1	6.7
		X-ray (40k)	B	45	1	2.2
Kamui-dainagon	dwarf	X-ray (40k)	B	45	1	2.2
	Sterile	γ -ray (10k)	B	76	1	1.3
		γ -ray (20k)	B	43	1	2.3
	Pod	γ -ray (10k)	B	76	1	1.3
	color	γ -ray (20k)	B	43	1	2.3

1) B: MS basal medium containing 30 g/l sucrose and 0.06 mg/l BAP.

NB: MS basal medium containing 30 g/l sucrose, 2.0 mg/l BAP and 0.1 mg/l NAA.

であった。

それらの変異分布を Fig. 2-3, Fig. 2-4, Fig. 2-5 に示した(X線照射区は示していない)。これによると照射区によっては正規分布からはずれた変異がみられた。また、その変異幅はそれぞれの処理区で異なっていた。主茎長では、10 cm 以下という極小個体が4個体も出現した。また、 γ 線 20 krad 区は他の処理区に比べ短い方に分布する傾向がみられた。稔実英数では他の2形質に比べ幅広い分布を示し、英数の多い個体がみられた。百粒重では、照射による変異の出現傾向は明らかでなかったが、原品種より粒大の顕著に大きい個体が出現した。

第3節 粒大変異系統の特性

アズキの粒大は品質を左右する重要な形質の一つである。粒大は通常百粒重で表わされる平均粒大の大きなものが好まれるが、さらに粒大のばらつきが小さく、いわゆる粒の揃いが求められている。

また、一般に大粒種子は、小粒種子に比べて胚が大きいあるいは胚乳や子実の貯蔵物が多く、幼植物の初期生長が旺盛である。これが最終的な収量増に結びつくか否かは環境条件に基づくが、少なくとも収量の安定性に貢献すると見てよい(由田, 1987)。

本節では粒大に関する変異体を選抜し、それらの生産

Table 2-8. Comparison of agronomic traits between Erimo-shozu and R₁ plants regenerated from epicotyls emerged from X-ray and γ -ray irradiated seeds

Trait	Mutagen (dose)	Medium	No. of plants	Mean	Range of variation	Standard deviation
Main stemlength (cm)	Control	B	56	31.6	7-52	8.7
		NB	16	34.0	18-56	9.8
	X-ray (10k)	B	10	22.4	9-32	7.0
		NB	58	28.7	12-40	6.2
	(20k)	B	27	32.0	19-52	7.0
		NB	155	29.8	13-48	6.0
	(40k)	B	45	25.0	6-32	4.9
		NB	62	28.7	14-45	6.0
	γ -ray (10k)	B	27	28.9	15-39	5.8
		NB	19	27.2	22-33	3.1
	(20k)	B	15	27.8	18-46	7.1
		NB	31	24.5	8-33	6.4
	(40k)	B	7	31.9	13-37	7.8
		NB	8	36.0	27-50	7.3
	Erimo-shozu		63	26.8	13-45	6.2
Pods per plant	Control	B	56	34.0	3-94	15.5
		NB	16	33.3	7-63	15.7
	X-ray (10k)	B	10	19.4	1-31	7.6
		NB	58	27.3	3-69	12.8
	(20k)	B	26	35.7	7-59	18.4
		NB	147	27.5	1-62	11.9
	(40k)	B	43	21.2	7-45	8.2
		NB	62	28.1	7-55	12.1
	γ -ray (10k)	B	27	26.3	4-46	12.3
		NB	19	29.9	18-51	7.3
	(20k)	B	14	26.4	18-34	4.9
		NB	31	25.5	7-68	15.1
	(40k)	B	7	44.6	3-80	24.3
		NB	8	31.3	21-72	6.4
	Erimo-shozu		63	15.0	6-28	4.9
100-grain weight (g)	Control	B	56	12.4	9.6-15.0	0.8
		NB	16	11.9	9.2-13.2	1.2
	X-ray (10k)	B	9	12.6	10.4-13.9	1.4
		NB	58	12.9	10.3-19.0	2.2
	(20k)	B	26	12.5	9.3-17.6	1.5
		NB	144	12.7	10.9-17.8	1.4
	(40k)	B	43	12.3	10.0-16.9	1.5
		NB	62	12.4	8.3-15.9	1.1
	γ -ray (10k)	B	27	13.2	11.1-16.2	1.4
		NB	19	12.6	11.6-13.6	0.5
	(20k)	B	14	12.9	11.0-14.2	0.8
		NB	31	13.4	12.0-17.5	1.1
	(40k)	B	6	12.1	10.5-12.6	0.8
		NB	8	12.2	9.9-15.8	1.6
	Erimo-shozu		63	12.4	10.6-15.2	1.0

力、耐病性、耐冷性等について検討した。

材料及び方法

供試材料は、本章第1節に供試されたハツネショウズの上胚軸カルスから再分化個体からの後代系統で、これらは1988年、89年及び90年においてR₁代で百粒重が重かった個体を選抜育成された。1988年に選抜した系統は、88Hで始まる系統番号を付け、89年及び90年の選抜系統にはそれぞれ同様に系統番号を付した。88H、89

H系統は、それぞれ1990年から1992年までの2カ年及び3カ年にわたって生産力試験を行った。また、90H系統のR₂、R₃代は、生産力試験を実施しなかった。

生産力試験の栽植様式は1株2本立、畦幅60cm×株間20cmとし、系統栽培では畦幅60cm×株間10cmとし1株1本立であった。その他の栽培条件は前節と同様である。調査株数は、系統栽培、生産力試験ともに10株ずつとした(調査項目はTable 2-11を参照)。アズキ落葉

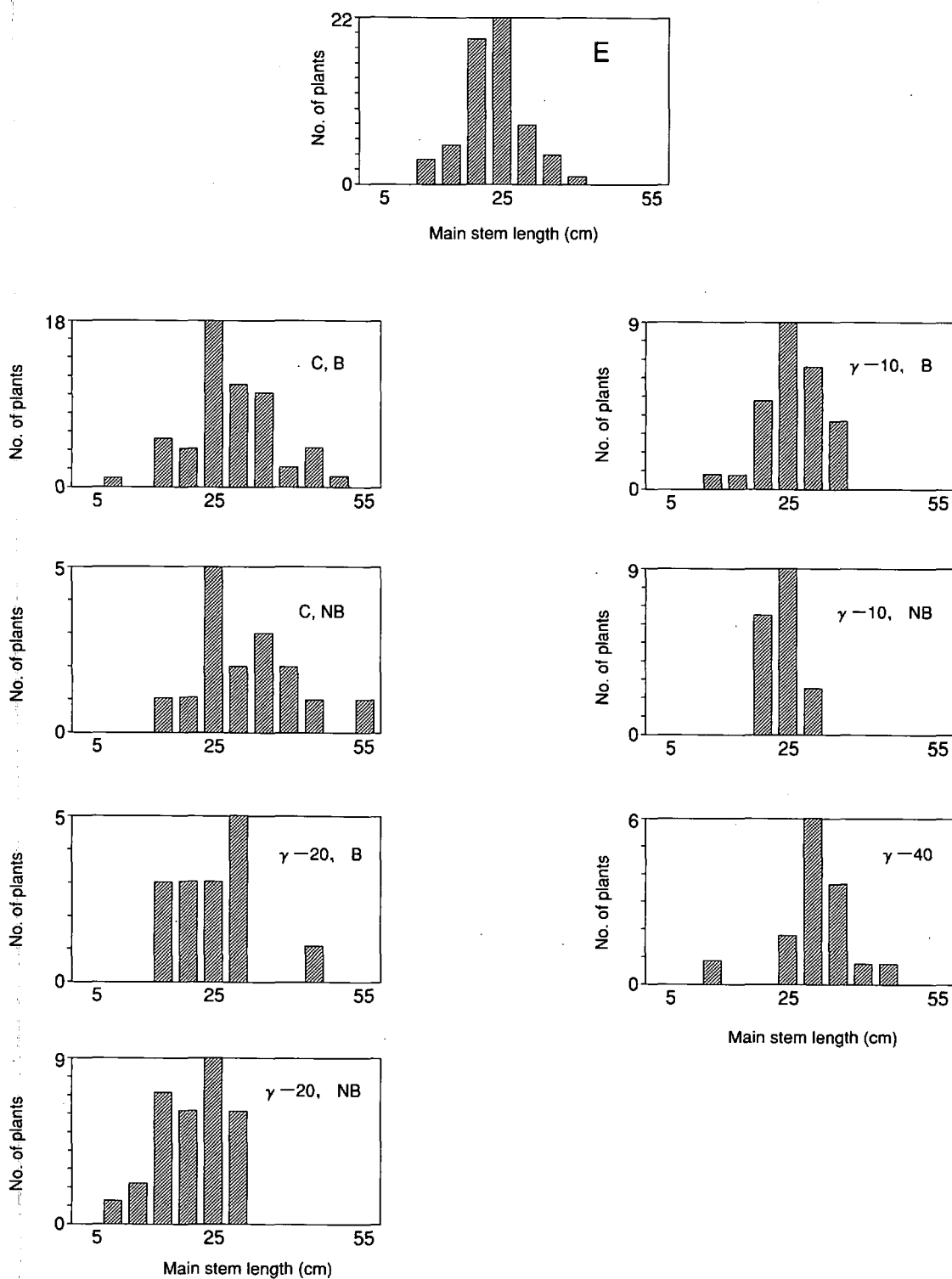


Fig. 2-3. Frequency distributions of main stem length in R_1 plants

E: Erimo-shozu.

C: Normal seeds (non-irradiated seeds).

γ -10, 20, 40: Seeds were irradiated with γ -ray in the doses of 10, 20 and 40 krad.

B: Epicotyls were cultured on MS medium containing 0.06 mg/l BAP.

NB: Epicotyls were cultured on MS medium containing 2.0 mg/l BAP and 0.1 mg/l NAA.

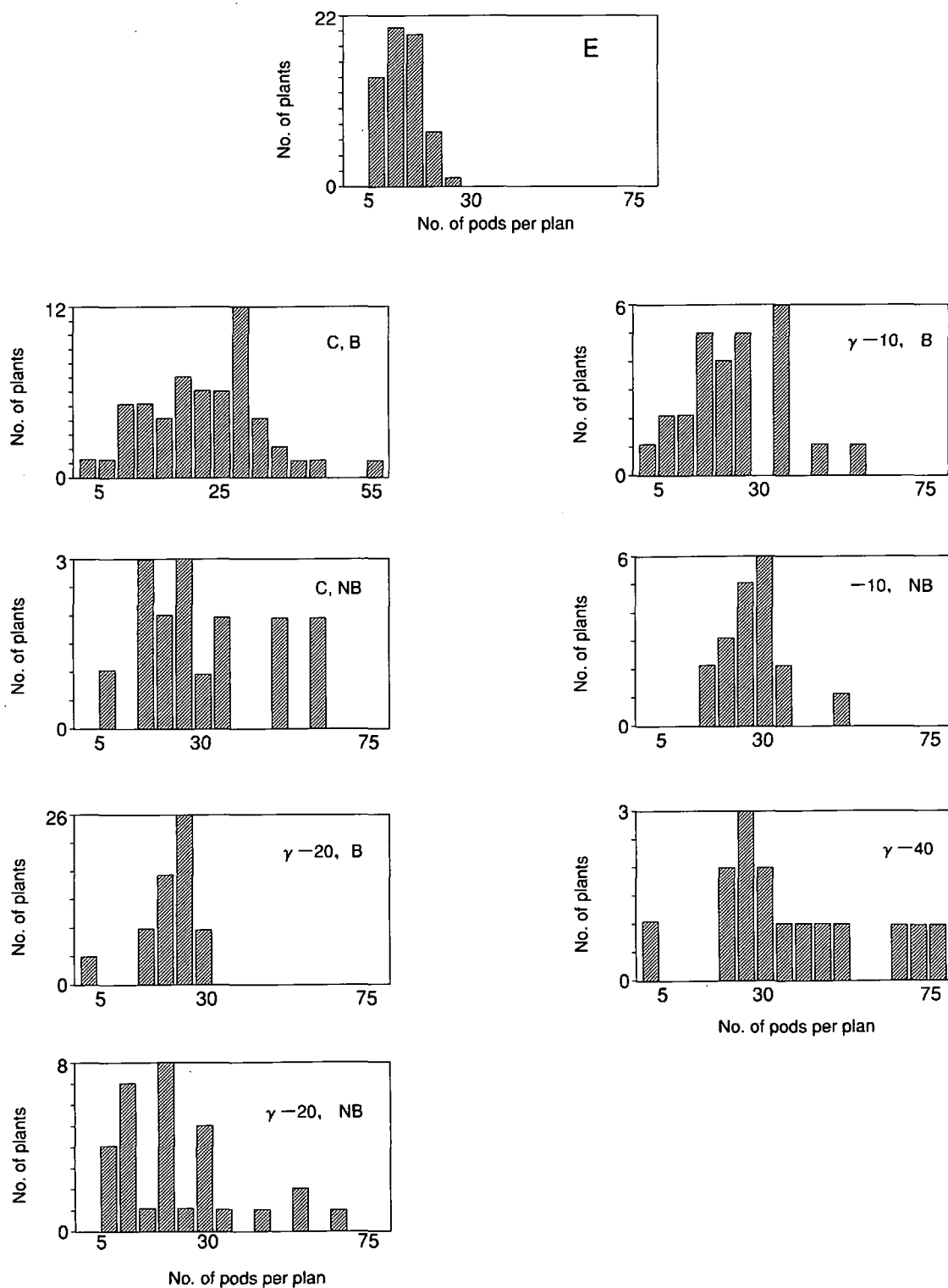


Fig. 2-4. Frequency distributions of number of pods per plant in R_1 plants.

E: Erimo-shozu.

C: Normal seeds (non-irradiated seeds).

$\gamma-10, 20, 40$: Seeds were irradiated with γ -ray in the doses of 10, 20 and 40 krad.

B: Epicotyls were cultured on MS medium containing 0.06 mg/l BAP.

NB: Epicotyls were cultured on MS medium containing 2.0 mg/l BAP and 0.1 mg/l NAA.

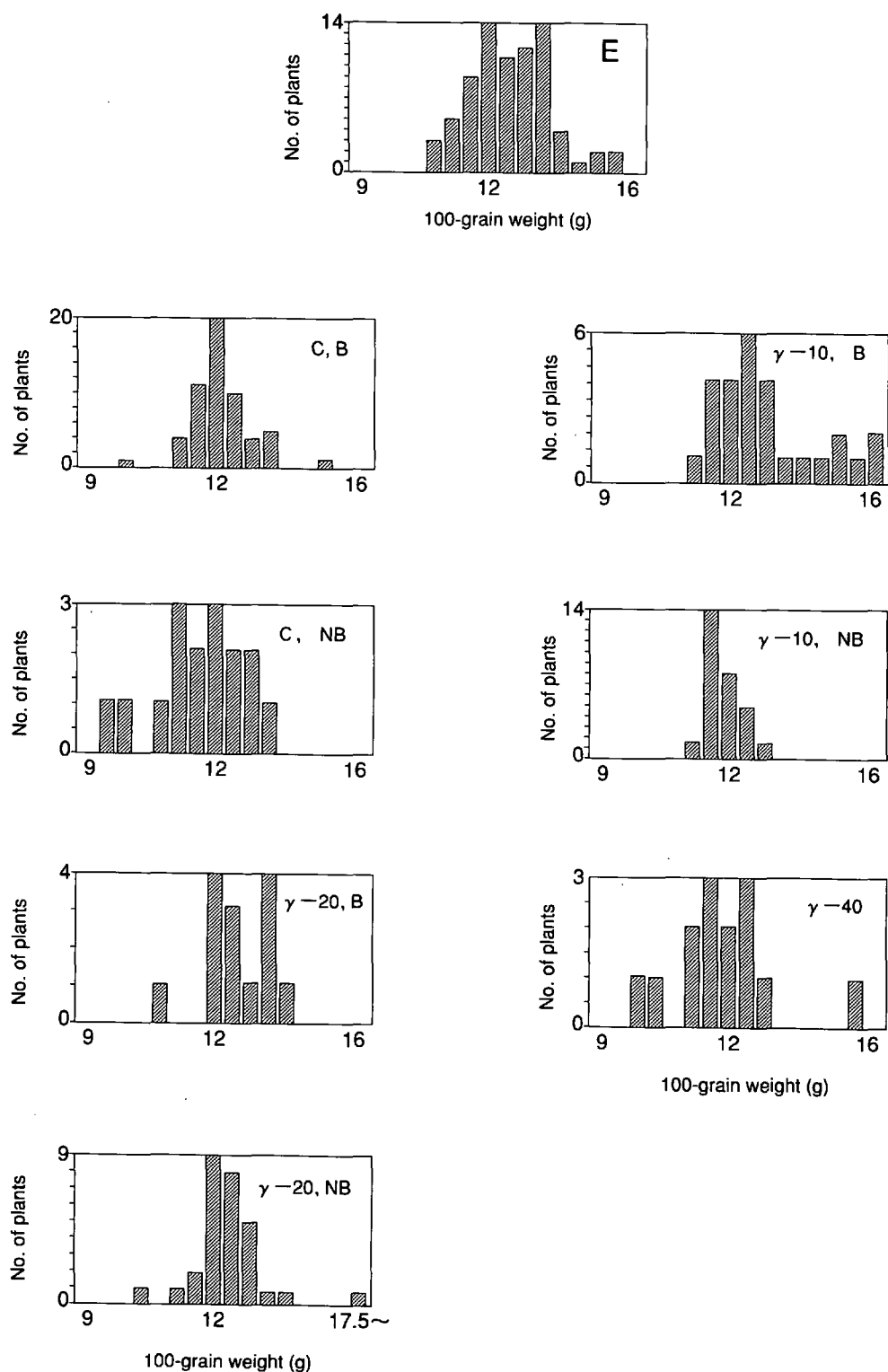


Fig. 2-5. Frequency distributions of 100-grain weight in R_1 plants
 E: Erimo-shozu.
 C: Normal seeds (non-irradiated seeds).
 $\gamma-10, 20, 40$: Seeds were irradiated with γ -ray in the doses of 10, 20 and 40 krad.
 B: Epicotyls were cultured on MS medium containing 0.06 mg/l BAP.
 NB: Epicotyls were cultured on MS medium containing 2.0 mg/l BAP and 0.1 mg/l NAA.

病の検定は北海道立十勝農業試験場(芽室町)のアズキ落葉病検定圃場で行った。供試材料はハツネショウズに由来する大粒系統の 88 H 1 (R_5 代), 89 H 1 (R_4 代) 及び 89 H 13 (R_4 代) の 3 系統であった。供試圃場の前作物はトウモロコシで、施肥量は 10 a 当たり N : 4 kg, P_2O_5 : 20 kg, K_2O : 11.2 kg, MgO : 4 kg で、栽植密度は畦幅 60 cm × 株間 20 cm, 1 株 2 本立であった。落葉病の発病指数は、0 (発病が認められないもの) から 4 (枯死したもの) までの 5 段階とした。それらを発病度 ($\{\sum(\text{発病指数} \times \text{当該個体数}) / (4 \times \text{調査個体数})\} \times 100$) で表わした (その他の調査項目は Table 2-13 を参照)。

耐冷性検定は、北海道立十勝農業試験場の耐冷性現地選抜圃(鹿追町)で行った。前作物は小麦で施肥量は、N : 3.8 kg, P_2O_5 : 24.5 kg, K_2O : 4.0 kg, MgO : 3.8 kg, 有機質肥料 30 kg/10 a であり、栽植密度は 1 株 2 本立で畦幅 60 cm × 株間 20 cm とし、試験は 2 反復であった。成熟期は、極早生 (VE) から極晩生 (VL) の 7 段

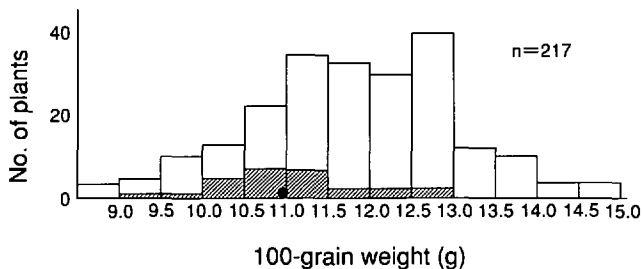


Fig. 2-6. Frequency distribution of 100-grain weight in R_1 plants regenerated from epicotyl-calli.

□ : Variation of R_1 plants (n=217).
 ▨ : Variation of control plants,
 ● : Control (mean).
 (n=25)

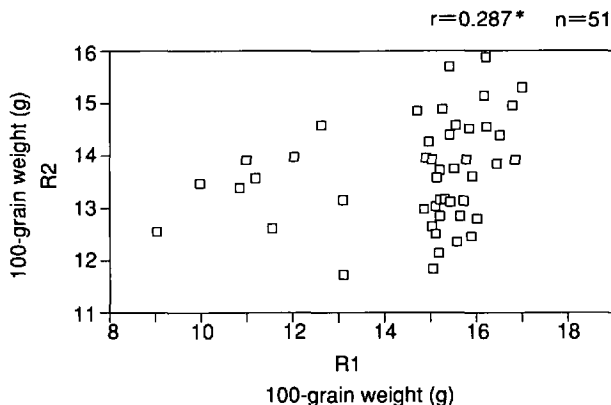


Fig. 2-7. Relationship between 100-grain weight of R_1 plants and R_2 lines regenerated from epicotyl-calli.

* : Significant at the 5 % level.

階により判定し、落葉病の発生程度は、0 (無) から 3 (甚) の 4 段階とし肉眼判定によった (その他の調査項目は Table 2-14 を参照)。

結果

1990 年のハツネショウズの R_1 代における百粒重の頻度分布を Fig. 2-6 に示した。 R_1 代の百粒重の分布幅は原品種よりも広がった。また、原品種の 20 個体の百粒重の平均値は 11.0 g であり、一方、 R_1 代で最も重かった個体で 14.9 g であった。そこで、このような大粒性を示す R_1 代の個体を選抜し、 R_2 代の系統を作った。

1992 年度のハツネショウズにおける R_1 代とその次代の R_2 系統の百粒重間の相関係数は、0.29 であり、5 % 水準で有意性がみられた (Fig. 2-7)。

R_2 系統としては、1988 年には R_1 の 63 個体中より大粒 3 系統、89 年には R_1 の 131 個体中より 2 系統、90 年には R_1 の 217 個体より大粒 7 系統、小粒 2 系統をそれぞれ選抜して次代系統を作った。

90 H 系統の 7 系統では原品種と比べて 14~24% も百粒重が大きかった (Table 2-10)。一方、小粒系統の 2 系統中 1 系統 (90 H 45) では百粒重が 9.7 g と原品種のハツネショウズに比べて約 20% も小粒化した。なお、この系統は主茎長が短く、全体的に小さかった。もう 1 つの

Table 2-9. 100-grain weight of R_1 plants and R_2 - R_5 lines regenerated from epicotyl-callus

Line	Generation	100-grain weight (g)			Mean	Relative value (%)
		1990	1991	1992		
88 H 1	R_3 - R_5	11.6	14.5	14.4	13.5	113
88 H 14	R_3 - R_4	11.5	14.1		12.8	109
88 H 57	R_3 - R_4	11.6	13.2		12.4	106
89 H 1	R_3 - R_4		15.0	14.2	14.6	115
89 H 13	R_3 - R_4		15.0	14.2	14.6	115
Hatsune-shozu		10.6	12.7	12.7	12.0 ¹⁾	100
					11.7 ²⁾	100
					12.7 ³⁾	100
90 H 23	R_1 - R_3	12.5	14.8	15.0	14.1	118
90 H 45	R_1 - R_3	9.2	9.9	10.0	9.7	81
90 H 116	R_1 - R_3	13.1	14.7	14.2	14.1	118
90 H 137	R_1 - R_3	13.3	14.9	12.5	13.6	114
90 H 138	R_1 - R_3	12.8	14.6	13.3	13.6	114
90 H 154	R_1 - R_3	13.6	15.1	14.3	14.3	120
90 H 167	R_1 - R_3	13.8	15.5	15.0	14.8	124
90 H 186	R_1 - R_3	9.5	10.9	11.9	10.8	91
90 H 195	R_1 - R_3	13.0	14.6	14.0	13.9	117
Hatsune-shozu		11.0	12.4	12.3	11.9	100

1) Mean of 1990, 1991 and 1992.

2) Mean of 1990/1991.

3) Mean of 1991/1992.

系統 90 H 186 の百粒重も原品種に比べて 1 割程度小粒化していた。

R₂ 系統内では粒大に関する個体選抜を行わず、圃場で収穫した個体の中から 5～10 個体を任意に選び、それらの自殖種子を R₃ 系統として次代の R₃ 系統群へ展開した。R₃ 系統群では他の農業形質を考慮して 1 系統ずつ選抜してこれを R₄ 系統として展開した。

このようにして育成された大粒系統について生産力試験を行った結果を Table 2-11 に示した。出芽期、開花期及び成熟期は原品種のハツネショウズとほとんど差はみられなかったが、主茎長は、これらの変異系統がやや短めであり、主茎節数はほぼ同数であったが、分枝数は大粒系統では多い傾向にあった。稈実英数は同等であったが、一英内粒数は大粒系統が少なかった。百粒重は、供試した 3 カ年の平均および 2 カ年の平均でみると 88 H 1 で 1.5 g 重く (指数 113)、89 H 1 (同 115) と 89 H 13 (同 115) では、1.9 g ほど重くなった。これらの 3 系統については t 検定の結果、3 カ年平均及び 2 カ年平均ともに原品種との間で有意な差はみられなかったが、1992 年度における 3 反復の試験では有意差がみられた。また、88 H 1 系統も 1991 年と 1992 年の 2 カ年では有意差が

認められた。したがって、これら 3 系統では、確かに大粒化したと思われる。また、子実収量については、88 H 14 及び 88 H 57 が原品種のハツネショウズに比べて低収であったが、他の 3 系統 (88 H 1, 89 H 1, 及び 89 H 13) ではハツネショウズと比べて年次によっては低収を示したものの平均するとほとんど差がみられなかった。

圃場観察ではこれらの 3 系統では英のつき方がやや異なっていた。すなわち、英数は原品種とほぼ同数であったが、これらの 3 系統においてはハツネショウズに比べ、英の稈実期間が長く、最初についた英と最後のそれとでは成熟度が異なった。そのために外観の品質が悪く、検査等級は原品種の 3 下に対して、大粒系統では 4 上～下と若干低下した。

1992 年には、北海道立十勝農業試験場において上記の 3 系統 (88 H 1, 89 H 1, 及び 89 H 13) に関する生産力試験を行った (Table 2-12)。これによると出芽期、開花期は原品種のハツネショウズとほぼ同時期であったが、89 H 1 では成熟期が 10 月 5 日で降霜のため成熟期に達せず、明らかに晩生であった。主茎長は 89 H 13 がやや低かったが、他の 2 系統は原品種と同程度であった。また、英数は 3 系統ともに原品種と同程度で、収量につ

Table 2-10. Preliminary yield trial of R₃, R₄ and R₅ lines and the original strains

Line ¹⁾	Year	Date of germination	Date of flowering	Date of maturity	Main stem length (cm)	No. of nodes	No. of branches	No. of pods	No. of grains per plant	100-grain weight (g)	Plant weight (kg/a)	Yield (kg/a)
88 H 1	1990	6.16	7.26	9.7	37.6	11.7	5.5	66.1	6.1	11.6	47.9	29.0
	1991	6.16	7.30	9.13	37.6	10.9	2.3	56.0	6.4	14.5	51.5	32.6
	1992	6.15	8.1	9.17	29.7	10.6	1.4	47.5	6.0	14.4	51.1	32.5
	Mean	6.16	7.29	9.12	35.0	11.1	3.1	56.5	6.2	13.5	50.2	31.4
88 H 14	1990	6.14	7.27	9.5	33.2	10.9	5.1	54.8	5.4	11.5	50.5	24.4
	1991	6.16	7.29	9.14	33.1	10.8	2.1	52.6	6.5	14.1	51.3	30.9
	Mean	6.15	7.28	9.10	33.2	10.9	3.6	53.7	6.0	12.8	50.9	27.7
88 H 57	1990	6.15	7.26	9.6	36.7	10.6	3.7	49.0	6.8	11.6	56.5	26.7
	1991	6.16	7.30	9.12	34.3	10.2	2.1	50.6	7.3	13.2	48.4	31.0
	Mean	6.16	7.28	9.9	35.5	10.4	2.9	49.8	7.1	12.4	52.5	28.9
89 H 1	1991	6.16	7.26	9.13	28.5	10.2	2.2	47.3	6.1	15.0	49.9	29.9
	1992	6.13	7.31	9.17	30.3	9.9	0.8	44.6	6.1	14.2	40.5	26.9
	Mean	6.15	7.29	9.15	29.4	10.1	1.5	46.0	6.1	14.6	45.2	28.4
89 H 13	1991	6.15	7.29	9.14	33.0	10.8	3.0	59.4	5.6	15.0	51.2	29.6
	1992	6.13	8.1	9.18	33.5	10.6	1.5	51.6	5.7	14.1	45.2	32.5
	Mean	6.14	7.31	9.16	33.3	10.7	2.3	55.5	5.7	14.6	48.2	31.5
Hatsune-shozu	1990	6.17	7.26	9.7	44.2	12.4	4.6	56.2	6.8	10.6	54.3	33.0
	1991	6.16	7.26	9.12	35.0	10.8	2.2	52.3	7.4	12.7	49.3	30.5
	1992	6.15	8.1	9.17	36.3	9.9	0.8	43.5	6.9	12.7	42.7	26.8
	M1 ²⁾	6.16	7.28	9.12	38.5	11.0	2.5	50.7	7.0	12.0	48.8	30.1
	M2	6.17	7.26	9.10	39.6	11.6	3.4	54.3	7.1	11.7	51.8	31.8
	M3	6.16	7.29	9.15	35.7	10.4	1.5	47.9	7.2	12.7	46.0	28.7

1) R₃-R₅: 88 H 1, R₃-R₄: 88 H 14, 88 H 57, 89 H 1 and 89 H 13.

2) M1: Mean of 1990, 1991 and 1992, M2: Mean of 1990/1991, M3: Mean of 1991/1992.

Table 2-11. Preliminary yield trial of R₄ and R₅ lines at Memuro in 1992

Line	Date of germination	Date of flowering	Date of maturity	Degree of lodging ¹⁾	Main stem length (cm)	No. of pods per stand	Yield (kg/a)	100-grain weight (g)
89 H 1 ²⁾	6.10	7.30	— ³⁾	1	49	48	24.7	16.1
89 H 13	6.11	7.29	10. 3	0	35	46	25.8	16.3
88 H 1	6.11	7.30	10. 5	0.5	42	47	27.7	15.4
Hatsune-shozu	6.11	7.30	10. 3	0.5	48	45	27.7	14.2

1) Degree of lodging: (0; resistance~4; susceptible).

2) R₄: 89 H 1 and 89 H 13, R₅: 88 H 1.

3) This line was damaged by frost at October 5th.

Table 2-12. Field test of R₄ and R₅ lines on adzuki brown stem rot¹⁾

Line	Date of germination	Date of flowering	Disease degree ²⁾	Yield (kg/10 a)	100-grain weight (g)	Percentage of scraped beans
89 H 1 (R ₄)	6.15	8. 1	72.1	120	11.9	1.4
89 H 13 (R ₄)	6.15	8. 1	39.1	162	13.5	4.6
88 H 1 (R ₅)	6.15	8. 1	44.1	142	11.9	1.8
Hatsune-shozu	6.15	8. 1	35.2	203	11.6	2.2

1) Planting density was 60 cm between row × 10 cm between plants.

Stand number was 1 and the area of plot was 1.2 m². 20 plants per plot.

2) Disease degree = (Σ(infection index × number of infected plants) / (4 × investigated plants)) × 100.

Infection indices: 0 (no infection)~4 (severely damaged).

Table 2-13. Field test of R₄ and R₅ lines on cold tolerance

Line	Date of ¹⁾ maturity	Infection index ²⁾	Yield (kg/a)	100-grain weight (g)	Coefficient of variation of grain weight (%)	Percentage of scraped beans
89 H 1	VL	1	114	14.4	24.7	7.6
89 H 13	L	1	123	14.8	23.4	10.5
88 H 1	VL	1	145	14.8	23.8	7.0
Hatsune-shozu	L	1	157	13.9	20.3	6.7

1) Maturity: VL (very early) E, EM, M (medium), ML, L, VL (very late).

2) Indices of adzuki brown stem rot infection: 0; no infection~3; severely damaged.

いては 88 H 1 は原品種と同程度であったが、他の 2 系統ではやや低収を示した。これらの大粒系統の百粒重は 3 系統全て原品種よりも重かった。

次にこれらのアズキ落葉病について検定したところ、89 H 1 は発病度で対照である原品種のハツネショウズの 2 倍以上の値を示し落葉病に対して感受性と判定された (Table 2-13)。収量も原品種の 6 割程度であった。他の 2 系統も原品種に比べて発病度が若干高い値を示したが、原品種とは有意な差がみられなかった。百粒重については 89 H 13 では原品種よりも重かったが、他の 2 系統は原品種と差がみられなかった。

耐冷性現地選抜圃場 (鹿追町) での試験結果を Table 2-14 に示した。これによると成熟期については 89 H 1 と 88 H 1 の 2 系統で原品種より遅くなり、収量も少かった。大粒系統の百粒重は原品種に比べて約 1 g 重かったが、有意差はみられなかった。また、これらの 3 系統では粒重の分散が大きく粒ぞろいが悪かった。特に、89 H 13 では屑豆率が大きかった。

考察

組織培養の過程で染色体異常や遺伝子突然変異などを高頻度に生ずる体細胞変異が知られている。また、これを積極的に育種へ利用して、再分化個体の中から有用な

変異体を選び、育種素材として利用したり、また、培地へ各種のストレス処理を加えて、変異細胞を選抜すると言う細胞選抜が発達しつつある。

一方、組織培養を利用した種苗の大量増殖や遺伝子導入の場合には、むしろ、こうした培養による変異の発生は好ましくない。したがって、あらかじめ、変異の種類や発生頻度を知ることが必要であるが、その際、再分化当代の評価に留まらず、自殖後代での特性評価も重要であることは言うまでもない。

一般に組織培養の困難なマメ類では、こうした再分化個体の農業特性に関する報告が少ない。ダイズの体細胞変異に関しては Barwale と Widholm (1987)、Freytag ら (1989)、Graybosch ら (1989)、Stephens ら (1991) 及び Komatsuda (1992) の報告があるが、アズキについては著者らによるもの (1992) 以外見当たらない。

本章の第 1 節では、第 1 章において得られた多数の再分化系統を圃場条件下で栽培して、農業形質を調査した。再分化当代 (R_0 代) は順化後、温室でポット栽培された。通常の種子から養成した個体に比べて、 R_0 個体では生育が劣ったが、鉢上げした個体のおよそ 7 割程度は開花結実に迄至った。したがって、アズキの場合には染色体異常等に起因する不稔の発生はそれほど多くなかったと考えられる。

ダイズでは再分化個体 (R_0 代) でのアルビノの発生率と自殖次代の R_1 での葉の形態異常や葉緑素欠損、不稔等の発生率がそれぞれ約 1% 程度であったと言う (Barwale と Widholm, 1987)。Freytag ら (1989) もダイズの子葉節と上胚軸からの再分化後代において伸育型の変異や葉形の変異個体が高頻度に出現したことを報告している。また、Komatsuda (1992) によると、ダイズの未熟胚からの再分化個体中、種子タンパク質になんらかの変異を生じたものが 7.1% もあった。

本実験では、 R_0 代では形態的に顕著に異なる変異体が見られなかったものの、それらの自殖によって得られた R_1 代では、アルビノ、矮性、葉の異常 (本葉が退化して葉耳のみとなった)、無限伸育型など、多数の変異体を生じた。これらの可視的な変異体の出現率は 0.4%~3.8% であった。なお、これらの変異のうち、アルビノや不稔以外は後代へ遺伝した。

R_1 代の主茎長ではそれぞれ原品種に比べて短いものが多かったが、主茎節数については原品種とほぼ同様のパターンを示した。一方、稔実莢数の変異幅は原品種に比べて多い方向へ偏った分布を示し、中には原品種の 3 倍もの莢数を付けた R_1 個体も見られた。また、百粒重については原品種に比べて小粒や大粒のものが得られた。

これらが遺伝的変異か否かについては詳細な後代検定を必要とするが、原品種の変異幅を越えた R_1 個体が多数出現したことは、 R_0 代ではヘテロであったことを強く示唆している。

第 2 節では、アズキの種子に X 線とガンマー線を照射し、その種子の上胚軸の培養より得られた再分化個体の変異を調べた。その結果、X 線とガンマー線によって上胚軸の生育が抑制され、再分化率も線量の増大に伴い低下する場合がみられた。照射区の R_1 代には無照射区で見られなかった不稔個体を生じた。また、10 krad 及び 20 krad のガンマー線照射区では短稈の R_1 個体が多かった。百粒重に関しては X 線照射区で大粒個体の出現頻度が高い傾向が認められた。したがって、培養中に生ずる体細胞変異に加えて、X 線とガンマー線照射によってさらに変異が付加されたと思われる。

江面ら (1990) はハクサイの種子にガンマー線を照射後、発芽種子の胚軸を培養して得られた個体の変異率が組織培養のみの変異率よりも高かったことを報告している。本実験においても、このように培養前に外植片へ変異原処理を行うことが変異率体の向上に有効であることを明らかにした。

なお、1988 年~1991 年の R_1 個体は上胚軸カルスよりの再分化個体次代であったが、1992 年の R_1 個体は上胚軸から直接に得られた再分化個体次代であった。前者では不稔や熟莢色変異が出現したが、後者ではそれらがみられなかった。試験年次や供試個体数も異なるので、ただちにカルスからの再分化の方が上胚軸からの直接再分化よりも変異体の出現率が高いとは結論できないが、一般にはカルスを経ると変異が多く発生するので、かかる差異を検討する必要がある。

第 3 節においては、大粒変異系統の特性を調べた。百粒重は比較的遺伝力が高く、また、製餡特性にも大きな影響を及ぼすことが知られている。その外、市場では粒揃いの良い大粒が特に好まれている。

R_1 代において百粒重の大きかった個体を選抜し、 R_2 系統を養成し、さらに選抜を加えて大粒系統を作出した。これらの百粒重は原品種よりも 10~20% も大きかった。また、大粒系統では、莢数は原品種とほぼ同数であったが、莢の稔実期間が長く、このため、粒揃いが悪く、品質が低下する場合がみられた。また、一莢内粒数は原品種より少なかった。収量は、年次によっては原品種に比べて若干低収となることがあったが、おおよそ原品種並みであった。

1992 年に北海道立十勝農業試験場 (芽室町) において、これらの大粒系統のアズキ落葉病に対する耐病性を検定

したところ、89 H 1 では明らかに罹病化していた。原品種のハツネショウズは耐病性であったので（足立ら、1988）、培養中に耐病性に関する何らかの突然変異を生じたと思われる。なお、アズキ落葉病に対する耐病性には1個の優性遺伝子が関与している（千葉、1982）。限られた実験結果ではあるが、耐病性に関する変異が培養によって誘発された可能性が考えられる。

また、耐冷性現地選抜圃場（鹿追町）では88 H 1 と89 H 1 の2系統が晩生の生育型を示した。これらは十勝農

業試験場（芽室町）においても原品種のハツネショウズに比べてやや晩生化していたが、中央農業試験場（長沼町）では差がみられなかった。したがって、これら2系統では環境条件に対する反応性にも何らかの差異を生じたものと思われた。

以上のように、アズキも培養によって各種の突然変異を比較的高頻度に生ずることが明らかとなったので、今後はさらに育種的利用を積極的に進める必要があろう。