

インゲンマメ (*Phaseolus vulgaris* L.) 未熟子葉からの 効率的な不定芽形成と品種・系統間差異

玉掛 秀人*

インゲンマメの未熟子葉からの不定芽形成条件を明らかにした。不定芽の形成には培地へのアブシジン酸 (ABA) の添加が極めて有効であった。外植片としては、圃場より採取した未熟莢より摘出した未熟子葉を用いた。高い不定芽形成率は、未熟莢の低温 (6°C) 処理を6日間以上行い、置床する未熟子葉の大きさを4~6 mm とし、0.05mg/l 2-ナフトキシ酢酸 (NOA), 3 mg/l 6-ベンジルアミノプリン (BAP), 0.5~2 mg/l ABA, 30g/l ショ糖および2 g/l ゲルライトを含むMS基本培地での培養により得られた。高温年に採取した未熟莢より外植片を調製した時、培地置床後数日で外植片が白化枯死する現象が多発したが、上記の培養条件では白化枯死の発生をほぼ抑制することができた。不定芽から健全植物体の再分化には時間を要した。不定芽から直接健全植物体を得られることはなく、旺盛に増殖する多芽体を経由して、数回の継代の後に、しばしば形成された。未熟子葉からの不定芽形成の品種・系統間差異は大きく、「丹頂金時」、「福虎豆」、「昭和金時」等の不定芽形成率は高く、「十育B22号」、「前川金時」、「紅金時」等では低いか、全く形成されなかった。

緒 言

組織培養中に生じる体細胞突然変異を利用した有用変異体の作出や遺伝子組換えによる育種素材の作出のように、バイオテクノロジー技術を育種へ応用するためには、対象とする作物の植物体再分化系の確立が必要である。

インゲンマメは組織培養の困難な作物のひとつであり、茎頂あるいは子葉節等の分裂組織からの植物体再分化^{4,6,10)}は幾つか報告されている。しかしながら、培養変異体の作出や形質転換への利用が期待できる体細胞組織からの再分化は、実生の葉⁹⁾あるいは小花柄¹¹⁾を外植片とした報告等があるにすぎない。

そこで本研究では、培養変異の利用が可能な体細胞組織からの再分化系の確立を目指した。ダイズ^{7,8,13)}およびインゲンマメと同属のペニバナインゲン (*P. coccineus* L.)^{1,3,5)}で未熟子葉からの植物体再分化の報告があったことから、この未熟子葉を外植片として試験を行った。その結果、不定芽の形成条件が明らかになり、不定芽より多芽体を形成してから再分化植物体を得られた。本報では、効率的な不定芽形成条件および不定芽形成の品種・系統間差異について報告する。

試験方法

1. 未熟子葉からの不定芽形成条件の検討

(1) 供試材料

「丹頂金時」等の北海道立十勝農業試験場育成のインゲンマメ品種を用いた。

(2) 外植片の調製法

図1に外植片の調製法を示した。主に圃場栽培の植物体より、開花後10日~15日程度経過した未熟莢を採取し、約6°Cの冷蔵庫内で2~4日間低温処理を行った。未熟莢を70% エタノールに1分間、1% 次亜塩素酸ナトリウム溶液に15分間浸し、滅菌水で3~4回洗って、表面殺菌をした。未熟莢より未熟種子を取り出し、さらに種皮を剥いて2枚の未熟子葉を取り出した。分裂組織を取り除くために胚 (幼根および幼芽) およびその近傍1/3程度を切り落とした残りの2/3程度の未熟子葉を外植片とした。用いる材料の大きさを揃えるために子葉の長径を測定し、主に3~6 mm (1995年以降の試験では4~6 mm) のものを用いた。

(3) 培養操作

未熟子葉の培養は、30ml の不定芽形成培地の入った約200ml 容量の培養瓶に10個の外植片を置床した。培養条件は、25±2°C, 16時間照明, 2000~3000luxで行った。形成した不定芽は、再分化植物体獲得のために、植物生育調節物質を含まないMS培地¹²⁾に移植し、約1カ月毎に継代した。

2003年4月24日受理

* 北海道立中央農業試験場, 069-1395 夕張郡長沼町
E-mail:tamagahd@agri.pref.hokkaido.jp

(4) 培地条件

特に断りのない限り未熟子葉の培養培地は、MS培地を基本とし、30g/l ショ糖、8g/l 寒天(1994年以降の試験では2g/l ゲルライト)を添加した。また、種々の植物生育調節物質を添加した。全ての培地は、pHを5.8に調整した後、オートクレーブ(121℃, 15分間)で滅菌した。

(5) 調査

調査は、培養開始から5～6週間後に、置床した外植片当たりのorganogenic カルス形成率(%), 置床した外植片当たりの不定芽形成率(%), 不定芽形成数および置床した外植片当たりの白化枯死率(%)等について行った。

2. 未熟子葉培養における白化枯死発生要因の解明と制御条件の検討

(1) 開花後の莢、種子および子葉の生育調査

圃場で生育する「丹頂金時」植物体の同じ日に開花した多数の花の花柄に油性ペンで印を付け、その後の莢の伸長、種子および子葉の肥大について、20日間にわたって測定した。莢長は特定の5莢を連続して、また、種子長径および子葉長径は毎日4～5莢を採取し、それぞれ莢のなかの生育良好な1粒について測定し、平均値を算出した。

(2) 採取した未熟莢の伸長時の気温と白化枯死および不定芽形成との関連

1993～1995年の3カ年間に「丹頂金時」を供試材料に行った実験のうち、同一培養条件の6例を抽出し、莢の伸長時の気温と白化枯死率、不定芽形成率の関係を調べた。これらはいずれも、4～6mmの未熟子葉を用い、培養前の莢の低温処理期間を3日間とし、0.05mg/l 2-ナフトキシ酢酸(NOA), 5mg/l 6-ベンジルアミノプリン(BAP), 0.5mg/l アブシジン酸(ABA), 30g/l ショ糖, 2g/l ゲルライトを含む培地で培養を行った。

(3) 白化枯死制御条件

「丹頂金時」を供試し、白化枯死および不定芽形成に強

く関与すると思われる、BAP濃度、未熟子葉の大きさ、低温処理期間についてその影響を検討した。

3. 不定芽形成における品種・系統間差異の検討

未熟子葉からの不定芽形成における品種・系統間差異、および「丹頂金時」の高い不定芽形成能がどの祖先から由来するかを検討するため、インゲンマメ14品種・系統を用いて3カ年間試験を行った。置床した未熟子葉の大きさは、品種・系統により完熟種子の粒大が異なることから、「丹頂金時」の4～6mmの生育ステージに相当すると思われる大きさとした。不定芽形成培地条件は、MS培地を基本とし、0.05mg/l NOA, 5mg/l BAP, 0.5mg/l ABAを含み、1997年は、ショ糖およびゲルライト濃度を40g/lおよび2.5g/lとした。

結果および考察

1. 未熟子葉からの不定芽形成

(1) 未熟子葉からの形態形成条件の検討

ダイズの未熟子葉を高濃度のオーキシンを含む培地で培養すると未熟子葉上に不定胚が形成され、その後再分化植物体を得られることが報告されている^{7,8,13)}。そこで、2,4-ジクロロフェノキシ酢酸(2,4-D), ピクロラム(Picloram), ディカンバ(Dicamba)の3種類のオーキシンを用いて、オーキシンを単独で含む培地条件下でのインゲンマメ未熟子葉の反応を見るため、6品種を材料に培養を行った。その結果、ダイズのように不定胚が形成されることはなく、いずれの品種も2～20mg/lの濃度では白色のソフトなカルスを形成した(データ省略)。

オーキシン単独では不定胚の形成が見られなかったことから、次に種々のオーキシンとサイトカイニンの組合せた培地で、5品種を材料に未熟子葉を培養した(表1)。NOAと2-イソペンテニルアデニン(2iP)の組合せはAngelini and Allavena³⁾がペニバナインゲンの未熟子葉培養で再分化を報告している。いずれの培地においても置床した外植片は肥大し、その周囲に主に緑白色でのちに褐色になるカルスが形成された。さらに、5品

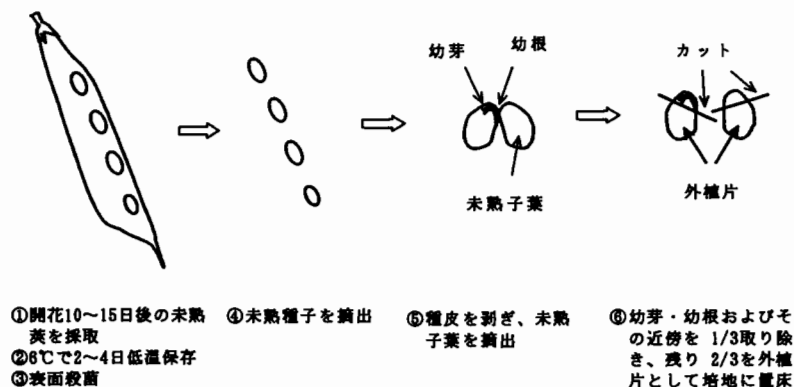


図1 外植片の調整法

種の中で「丹頂金時」でのみ、4種類の培地において白色～淡緑色～緑色で光沢のある形態が形成された（写真1）。この形態は、褐色になるカルスとは明らかに異なる特徴的な外観から、器官形成能を有するカルスと考え、organogenic カルスと呼ぶこととした。しかしながら、これらを同じ組成の培地に継代したが不定芽等を分化するには至らなかった。

前試験において、「丹頂金時」でのみ、NOAと2iPの組合せでより高頻度でorganogenic カルスの形成が見られたことから、NOAと2iPのどちらがorganogenic カルス形成に効果があるのか、一方の植物生長調節物質を他に変えて検討した（表2）。オーキシンの濃度は0.05 mg/l、サイトカイニンの濃度は5 mg/lとした。未熟子葉採取のための植物体養成は温室内で行った。or-

ganogenic カルスの形成率は、NOAと2iPの組合せに比べて他の組合せではいずれも低下した。しかしながら、NOAとBAPの組合せにおいて、置床した90個の外植片の2個から小さな葉の付いた不定芽が形成された。このNOAとBAPを組合せた培地において低率であるが不定芽が分化することは、その後の追試でも確認できた（データ省略）。

(2) 未熟子葉からの効率的な不定芽形成条件の検討

不定芽形成率の向上を目指し、インゲンマメ3品種を供試し、培地条件を検討した（表3）。NOAとBAPを含むM1培地（MS基本、0.05mg/l NOA、5 mg/l BAP、30g/l ショ糖、8 g/l 寒天）を標準とし、M2～M10培地は培地組成を1項目だけ変更あるいは追加した。

「丹頂金時」では、前試験と同様にNOAとBAPを組

表1 未熟子葉からのorganogenic カルス形成におよぼす植物生育調節剤組合せの影響（1990年）

種類	オーキシン		サイトカイニン		品種別organogenic カルス形成率 (%) ¹⁾			
	濃度 (mg/l)	種類	濃度 (mg/l)		大正金時	丹頂金時	福白金時	福粒中長
2,4-D	0.2	BAP	1		0 ²⁾	10	0	0
	0.2		10		0	0	0	0
	2		1		0	0	0	0
	2		10		0	0	0	0
NAA	0.2	Kinetin	1		0	0	0	0
	0.2		10		0	15	0	0
	2		1		0	0	0	0
	2		10		0	0	0	0
NOA	0.2	2iP	1		0	0	0	0
	0.2		10		0	20	0	0
	2		1		0	0	0	0
	2		10		0	20	0	0

1) 用いた未熟子葉の大きさは「大正金時」～「福粒中長」で3～6 mm、「姫手亡」で3～5 mm

2) それぞれの処理で置床した外植片の数は20個

表2 未熟子葉からの形態形成に及ぼすオーキシンとサイトカイニン組合せの影響¹⁾（1990年）

オーキシン 0.05mg/l	サイトカイニン 5 mg/l	置床数 (個)	O.C. ²⁾ 形成率 (%)	不定芽形成率 (%)
NOA	2iP	80	15.0	0
NAA	2iP	80	2.5	0
NOA	Zeatin	90	1.1	0
NOA	BAP	90	4.4	2.2

1) 供試品種は「丹頂金時」、培地の糖には40mg/l ブドウ糖を使用 2) organogenic カルス

表3 未熟子葉からの不定芽形成 (1991年)

品種名	培地No. ¹⁾	変更または追加した培地組成 ²⁾	置床数 (個)	白化枯死率 (%)	O.C. ³⁾ 形成率 (%)	不定芽形成 率 (%)	不定芽数
丹頂金時	M 1		70	27.1	0	2.9	2
	M 2	1 mg/l BAP (← 5 mg/l BAP)	70	0	1.4	0	0
	M 3	10mg/l BAP (← 5 mg/l BAP)	70	71.4	0	0	0
	M 4	5 mg/l Kinetin (← 5 mg/l BAP)	70	0	0	0	0
	M 5	5 mg/l 2iP (← 5 mg/l BAP)	70	0	21.4	0	0
	M 6	40g/l ブドウ糖 (←30g/l ショ糖)	70	0	11.4	7.1	5
	M 7	mMS ⁴⁾ (←MS)	70	0	0	0	0
	M 8	B 5 ⁵⁾ (←MS)	70	0	0	0	0
	M 9	2 g/l ゲルライト (← 8 g/l 寒天)	70	70.0	0	0	0
	M10	+0.5mg/l ABA	70	21.4	25.7	18.6	18
大正金時	M 1		30	20.0	0	0	0
	M 2	1 mg/l BAP (← 5 mg/l BAP)	30	0	0	0	0
	M 3	10mg/l BAP (← 5 mg/l BAP)	30	100	0	0	0
	M 4	5 mg/l Kinetin (← 5 mg/l BAP)	30	0	0	0	0
	M 5	5 mg/l 2iP (← 5 mg/l BAP)	30	3.3	10.0	0	0
	M 6	40g/l ブドウ糖 (←30g/l ショ糖)	30	0	0	0	0
	M 7	mMS ⁴⁾ (←MS)	30	0	0	0	0
	M 8	B 5 ⁵⁾ (←MS)	30	0	0	0	0
	M 9	2 g/l ゲルライト (← 8 g/l 寒天)	30	63.3	0	0	0
	M10	+0.5mg/l ABA	30	13.3	10.0	3.3	1
福白金時	M 1		30	0	0	0	0
	M 2	1 mg/l BAP (← 5 mg/l BAP)	20	0	0	0	0
	M 3	10mg/l BAP (← 5 mg/l BAP)	20	10.0	0	0	0
	M 4	5 mg/l Kinetin (← 5 mg/l BAP)	20	0	0	0	0
	M 5	5 mg/l 2iP (← 5 mg/l BAP)	20	0	0	0	0
	M 6	40g/l ブドウ糖 (←30g/l ショ糖)	30	0	0	0	0
	M 7	mMS ⁴⁾ (←MS)	30	0	0	0	0
	M 8	B 5 ⁵⁾ (←MS)	30	0	0	0	0
	M 9	2 g/l ゲルライト (← 8 g/l 寒天)	30	0	3.3	0	0
	M10	+0.5mg/l ABA	20	0	0	0	0

1) M 1 培地: MS基本, 0.05mg/l NOA, 5mg/l BAP, 30g/l ショ糖, 8g/l 寒天

2) 括弧内のM 1 培地の組成に対して変更あるいは追加した組成

3) organogenicカルス

4) MS基本培地からNH₄NO₃を除いた修正MS

5) Gamborgら (1968) によるB 5 基本培地

合せたM 1 培地で不定芽形成率は2.9%と低率であったが、ショ糖をブドウ糖に変えたM 6 培地では7.1%に高まった。また、0.5mg/l ABAを加えたM10培地では18.6%とさらに高まり、organogenic カルスの形成率も25.7%とNOAと2iPの組合せであるM 5 培地の21.4%よりも高くなった。他の2品種では、「大正金時」でABA

を添加したM10培地でのみ3.3%の低率で不定芽形成が見られた。ABAの組織培養における形態形成への効果は、ペニバナインゲンの未熟子葉からの再分化頻度の向上^{5,16)}、テーダマツ (*Pinus taeda* L.) の子葉外植片からのシュート再分化の向上¹⁵⁾などが報告されている。今回の試験で、インゲンマメにおいても、ABAは不定芽や

表4 不定芽の培養 (1991~1993年)¹⁾

培地 ²⁾	不定芽数 (個)	シュート伸長数 ³⁾	多芽体形成数 ⁴⁾	鉢上げ数 ⁵⁾	採種数 ⁶⁾
MSHf ¹⁾	13	9	4	4 (17)	1 (1)
M10 ²⁾	7	2	2	2 (11)	0
MSNBG ³⁾	5	1	1	1 (1)	1 (1)

1) 供試品種は「丹頂金時」

2) MSHf (MS, 植物生長調節物質無添加), M10 (MS, 0.01mg/l NOA, 5mg/l BAP, 0.5mg/l ABA), MSNBG (MS, 0.01mg/l NOA, 1mg/l BAP, 1mg/l GA3)

3) 4 カ月以内にシュートを形成した不定芽数

4) 4 カ月以内に多芽体へと発達した不定芽数

5) 1年6 カ月以内に鉢上げ可能な健全植物体を形成した不定芽数, 括弧内は鉢上げ個体数

6) 採種できた不定芽数, 括弧内は採種個体数

organogenic カルスなどの形態形成に著しい効果を示すことが明らかになった。

1 外植片当たりの不定芽形成数は概ね1個であったが、複数個形成される場合も見られた(写真2)。不定芽の形成位置は切片の周辺にほぼランダムに形成された。M1 培地等で、置床した未熟子葉が2~3日で脱色され白化枯死する現象が見られ、BAP濃度を上げたM3培地、寒天をゲルライトに変えたM9培地で特に発生が著しかった(写真3)。

形成された不定芽からの植物体再分化、鉢上げ個体からの採種の結果を表4に示した。不定芽を外植片から切り離し植物生育調節物質無添加のMS培地等に置床したところ、幾つかの不定芽は細く貧弱なシュートを伸長させたが(写真4)、その後萎れ、基部に多芽体を形成した(写真5)。鉢上げ可能な健全植物体は、不定芽より直接再分化することはなく、植物生育調節物質無添加の培地で旺盛に増殖する多芽体(写真6)を経由し、数回の継代の後にしばしば発達した(写真7)。培養開始から1年6カ月までの間に29個体の健全植物体を鉢上げし、2個体より採種する事ができた(写真8)。

インゲンマメの多芽体形成は、Rubluo and Kartha¹⁴⁾あるいはAllavena and Rossetti²⁾によって、茎頂を外植片として報告されている。多芽体からシュートを得るこ

とができたが、シュートの発達は、遺伝子型に依存することが報告されている。

今回、未熟子葉より不定芽形成、その後多芽体を経由して健全植物体を再分化する系が明らかになったが、この系は植物体の発達を制御できず、また、多くの継代を必要とする。今後、不定芽から直接、あるいは多芽体から容易に健全植物体を発達させる条件の検討が必要である。

不定芽形成能力が高いことが明らかになった「丹頂金時」を供試し、ゲル化剤および培養容器の種類が、不定芽形成におよぼす影響を検討した(表5)。培養容器が培養瓶の場合、ゲル化剤の違いはorganogenic カルス形

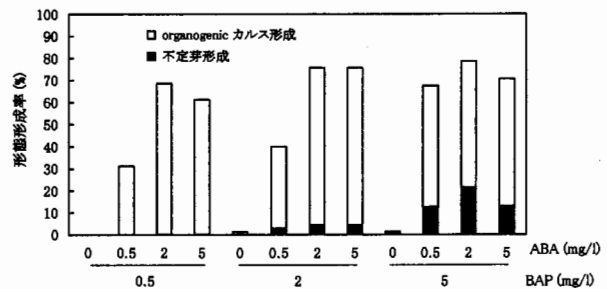


図2 未熟子葉からの形態形成に及ぼすBAPおよびABA濃度の影響 (1993年, 丹頂金時)

表5 未熟子葉からの形態形成に及ぼすゲル化剤および培養容器の影響 (1993年)¹⁾

ゲル化剤	培養容器	置床数 (個)	白化枯死率 (%)	O.C. ²⁾ 形成率 (%)	不定芽形成率 (%)	不定芽数
寒天 (0.8%)	培養瓶 ³⁾	80	2.5	53.8	7.5	7
アガロース (0.8%)	培養瓶	80	13.8	42.5	18.8	19
ゲルライト (0.2%)	培養瓶	80	6.3	45.0	31.3	33
寒天 (0.8%)	シャーレ ⁴⁾	80	0	10.0	2.5	2

1) 供試品種は「丹頂金時」 2) organogenic カルス 3) 約200ml容量のガラス瓶 4) 90×20mmプラスチックシャーレ

成率にはあまり影響を与えなかったが、不定芽形成率には大きく影響し、これまで主に使用した寒天の7.5%に対してアガロースでは18.8%, ゲルライトではさらに31.3%と寒天の約4倍に高まった。培養容器としてプラスチックシャーレを用いると organogenic カルス形成率、不定芽形成率ともに著しく低下した。

BAP および ABA 濃度が不定芽形成におよぼす影響を検討した(図2)。供試品種には「丹頂金時」を用いた。BAP が0.5mg/l の低濃度では、ABA 濃度が0.5, 2 mg/l と高くなるにつれて organogenic カルス形成率は高まったが、いずれの ABA 濃度でも不定芽は形成されなかった。2 mg/l BAP では、organogenic カルスの形成は0.5mg/l BAP と同様の傾向であり、また0.5~5 mg/l ABA で2.9~4.3%の低率で不定芽形成が見られた。5 mg/l BAP では、organogenic カルス形成率は ABA 濃度が0.5~5 mg/l の範囲では同程度となり、不定芽形成率はこれまで用いてきた濃度である0.5mg/l ABA で12.5%であるのに対して、2 mg/l で21.4%と高まり、5 mg/l ではやや抑制された。ABA 無添加区についてみると、BAP 濃度が0.5mg/l では形態形成は見られなかったが、2 mg/l で organogenic カルス、5 mg/l で不定芽が低率で形成された。この試験により、不定芽形成には2 mg/l 以上の BAP が必須であり、ABA は適当な BAP の存在のもとで不定芽形成率を高めることが明らかになった。

2. 未熟子葉培養における白化枯死発生要因の解明と制御条件の検討

(1) 白化枯死発生要因の解明

未熟子葉からの不定芽形成条件の検討において、培養を開始して数日以内に置床した外植片が白化枯死する現象がしばしば発生した。この現象は、これまでの試験から、試験により発生の有無があること、高濃度の BAP 添加や小さな外植片の使用等で発生が高まることが明らかとなっていたが、5 mg/l の BAP 濃度、3~6 mm の未

熟子葉を用いる等の培養条件を限定することでかなり制御できるものと考えた。しかしながら、1994年に培地条件を検討する幾つかの試験を実施したところ、上の培養条件においても約60~70%の白化枯死が生じ、このため不定芽形成率が著しく低下し、この培養系が培地組成以外の条件によって大きく左右される不安定な系であることが明らかになった。

白化枯死現象は培地等の培養条件が同じにもかかわらず、7~8月が高温であった1994年に多発し、年次により、あるいは同一年でも培養開始日の違い、つまり未熟莢採取日の違いによって、発生程度に大きな違いが見られた。その原因の一つとして、培養に用いる未熟子葉を圃場栽培の植物体より採取した未熟莢より摘出していることによると考えられた。このため、開花後採取までの莢の生育はこの間の気象、特に温度条件に強く影響され、このことがその後の培養に影響を与えるものと考えられた。図3は、開花後の莢、種子および子葉の長さがどのように推移するかを調査した結果である。開花直後からまず莢の伸びが急激に進み、莢の伸びが落ち着いた頃から、子葉の肥大が進んだ。図4は、開花後の子葉長(長径)の推移を、異なる開花日について調査した結果である。子葉長が4 mm に達するまでの日数は、開花日の違いによって10日、11日、14日と異なり、子葉の生育は気温によって大きく左右された。

そこで、1993~1995年の3カ年間に「丹頂金時」を供試材料に行った実験のうち、同一培養条件の6例を抽出し、莢の伸長時の気温と白化枯死率、不定芽形成率の関係を検討した。これらの培養条件は、4~6 mm の未熟子葉、培養開始前の莢の低温処理期間は3日間、0.05 mg/l NOA, 5mg/l BAP, 0.5mg/l ABA, 30g/l ショ糖, 2g/l ゲルライトを含む培地であった。表6には白化枯死率、不定芽形成率および莢伸長時の気温との相関係数を示した。白化枯死率は、莢の伸長時の気温、特に採取前5日間の平均気温と高い正の相関($r=0.944$, 1%水準で有意)が見られ、また、不定芽形成率とは高い

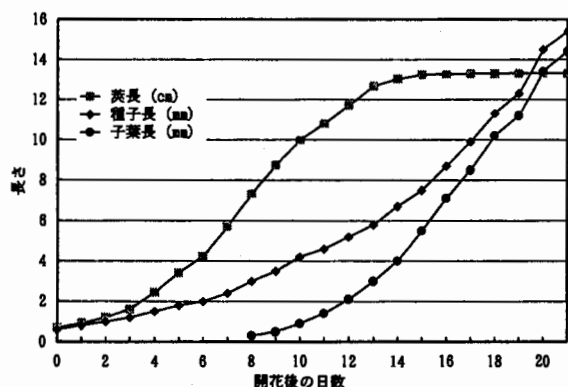


図3 開花後の莢、種子および子葉の生育 (丹頂金時, 1995年8月6日開花)

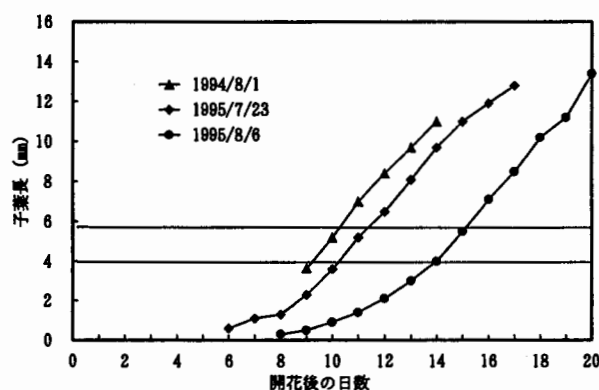


図4 開花後の子葉の生育 (丹頂金時)

表6 白化枯死率、不定芽形成率および莢の伸長時の気温との相関係数¹⁾ (n = 6)

	白化枯死率	不定芽形成率	採取前の平均気温			
			当日	前日	5日間	10日間
白化枯死率	—	-0.957 **	0.832 *	0.853 *	0.944 **	0.894 *
不定芽形成率		—	-0.924 **	-0.906 *	-0.916 **	-0.836 **
当日			—	0.975 **	0.899 *	0.796
前日				—	0.954 **	0.888 *
5日間					—	0.967 **
10日間						—

1) * : 5%水準, ** : 1%水準で有意。

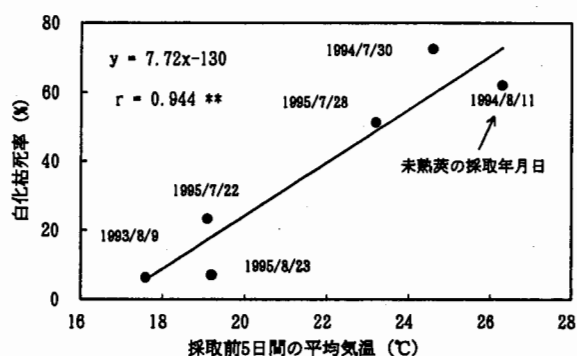


図5 未熟莢採種前の気温と白化枯死率との関係 (丹頂金時)

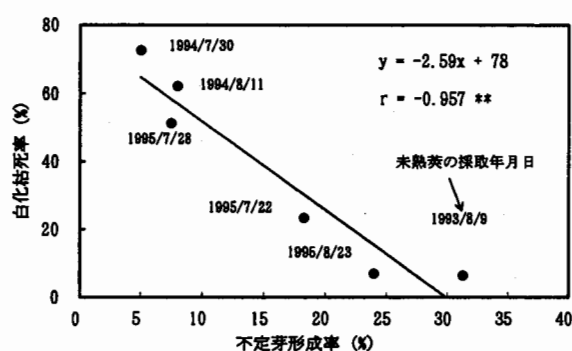


図6 不定芽形成率と白化枯死率との関係 (丹頂金時)

負の相関 ($r = -0.957$, 1%水準で有意) が見られた。

図5には、採取前5日間の平均気温と白化枯死率との関係をプロットした。白化枯死率は1994年の高温年で高く、1993年の低温年で低い値となり、また1995年では、平均気温が高いとき白化枯死率が高い傾向であった。図6には、白化枯死率と不定芽形成率との関係をプロットした。白化枯死率が低いときには、20~30%の不定芽形成率となったが、高くなると不定芽形成率は10%を切った。

(2) 白化枯死発生制御条件の検討

白化枯死現象は、高温時に未熟莢を採取した場合に多発することが明らかになった。圃場採取の未熟莢を用いた安定的で効率的な不定芽形成のためには、莢伸長時の気温に左右されることがなく、白化枯死の発生が少なくかつ不定芽形成率の高い培養条件を見いだすことが必要であった。そこで、白化枯死および不定芽形成に強く関与すると思われる、BAP濃度、未熟子葉の大きさおよび低温処理期間の3点についてその影響を検討した。

BAP濃度の白化枯死および不定芽形成に及ぼす影響は顕著で、白化枯死は4 mg/l以上で多く見られ、不定芽形成率は、3 mg/l以上で20%を越えた (表7)。この結果から、BAP濃度は3 mg/lが適当と思われた。用いる

未熟子葉の大きさに関しては、3 mg/l BAPでは、4 mm以上でほとんど白化枯死は見られず、不定芽形成率は、4~6 mmで最も高くなった。また、5 mg/l BAPでは、4~6 mmでも23.1%の白化枯死が見られたが、不定芽形成率はやはりこの大きさで最も高くなった (表8)。

低温処理期間に関しては、低温処理をしない場合に比べて2日間および4日間で、白化枯死率が著しく高くなった (表9)。この原因は明らかではないが、未熟莢採取時の高温と処理時の低温 (6°C) との著しい温度差が影響していると考えられた。いずれにしても、これまでの2~4日間の低温処理期間は、白化枯死率が高くなりやすい不適な条件であり、6日間以上の低温処理期間が必要であった。

以上の試験より、未熟莢の低温処理期間を6日間以上とし、外植片には4~6 mmの大きさの未熟子葉を使用し、培地のBAP濃度を3 mg/lとすることで、白化枯死の発生をほぼ抑制でき、かつ高い不定芽形成率が得られることが明らかになった。

3. 品種・系統間差異の検討

不定芽形成の品種・系統間差異を、3カ年間検討した結果を表10に示した。1995年の試験では、不定芽形成率

表7 BAP濃度の影響¹⁾ (1995年)

BAP濃度 (mg/l)	白化枯死率 (%)	形態形成率 ²⁾ (%)	不定芽形成率 (%)
0	0	14.2	0
1	0	59.2	1.7
2	0	87.5	8.3
3	0.8	75.0	27.5
4	11.7	46.7	21.7
5	21.7	45.8	24.2

1) 供試品種は「丹頂金時」、3 反復の平均、置床数は各反復とも40

2) 形態形成率=organogenic カルス形成率+不定芽形成率

表8 未熟子葉の大きさの影響¹⁾ (1995年)

BAP濃度 (3 mg/l)

大きさ (mm)	白化枯死率 (%)	形態形成率 ²⁾ (%)	不定芽形成率 (%)
2~4	18.1	54.4	18.8
4~6	1.5	64.5	23.0
6~8	0	43.4	13.3
8~10	0	31.8	11.7

BAP濃度 (5 mg/l)

大きさ (mm)	白化枯死率 (%)	形態形成率 ²⁾ (%)	不定芽形成率 (%)
2~4	48.9	22.7	9.8
4~6	23.1	42.4	18.1
6~8	8.6	23.2	5.4
8~10	0	27.3	11.5

1) 供試品種は「丹頂金時」、2 反復の平均、置床数は140および100

2) 形態形成率=organogenic カルス形成率+不定芽形成率

表9 低温保存期間の影響¹⁾ (1995年)

低温保存 期間(日)	白化枯死率 (%)	形態形成率 ²⁾ (%)	不定芽形成率 (%)
0	13.4	64.2	35.0
2	35.0	36.7	22.5
4	41.0	46.3	24.2
6	0	87.5	34.3
8	0	85.3	30.8
10	0	85.3	38.3
12	0	92.8	34.0

1) 供試品種は「丹頂金時」、2 反復の平均、置床数は40~60および50~60

2) 形態形成率=organogenic カルス形成率+不定芽形成率

は、「丹頂金時」、「福虎豆」、「十育B30号」および「昭和金時」で高く、10%を越えた。1996年の試験では、不定芽形成の見られた品種・系統はいずれも前年に比べて高い不定芽形成率を示した。「北海金時」、「十育B30号」、「福虎豆」および「丹頂金時」で不定芽形成率は高く、30%を越えた。1997年の試験では、不定芽形成は、1996年に比べて著しく低下した。これは、培地組成の変更が一つの原因と考えらるが、「丹頂金時」および「昭和金時」では10%を越える不定芽形成率を示した。

不定芽形成率は、同一品種においても年次間の差が見られたが、「丹頂金時」、「福虎豆」および「昭和金時」は各年次とも比較的高い不定芽形成を示し、「十育B22号」、「前川金時」および「紅金時」等は、各年次とも不定芽形成は低いか形成されず、大きな品種・系統間差異が示された。「北海金時」、「福白金時」および「福粒中長」では、1996年のみ高い不定芽形成率を示しており、さらに培養条件の検討が必要と思われる。「大正金時」の変異体である「大正金時(多節)」は、3カ年間とも「大正金時」と同様な値を示した。

図7には、「丹頂金時」の育成系譜とそれぞれの品種・

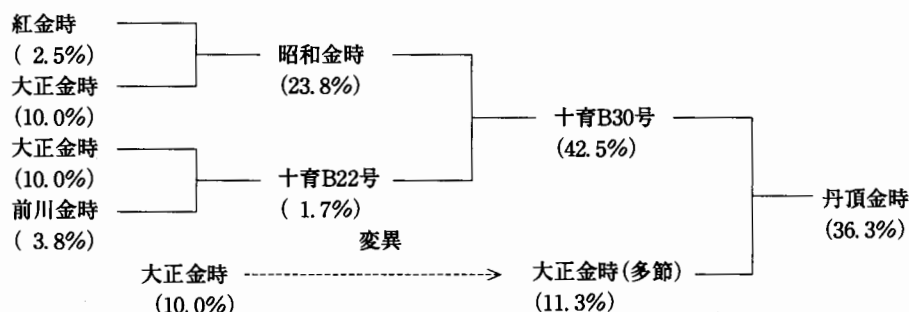


図7 「丹頂金時」の系譜と1996年の試験での不定芽形成率

表10 未熟子葉からの不定芽形成における
品種・系統間差異 (1995~1997年)

品種・ 系統名	大きさ ¹⁾ (mm)	不定芽形成率(%)			
		1995年	1996年	1997年	平均
丹頂金時	4~6	17.5	36.3	20.0	24.6
福白金時	4~6	1.3	18.8	2.5	7.5
大正金時	4~6	3.8	10.0	1.1	5.0
北海金時	4~6	5.7	47.5	6.7	20.0
昭和金時	4~6	12.9	23.8	16.7	17.8
福粒中長	4~6	0	23.8	0	7.9
十育B22号	3~5	2.2	2.5	2.2	2.3
十育B30号	4~6	13.8	42.5	1.1	19.1
紅金時	4~6	0	2.5	2.2	1.6
前川金時	3~5	0	3.8	3.3	2.4
大正(多節)	4~6	4.4	11.3	2.2	6.0
洞爺大福	5~8	0	0	0	0
福虎豆	3~5	15.6	38.8	8.9	21.1
姫手亡	3~5	0	0	1.1	0.4

1) 用いた未熟子葉の大きさ

系統の1996年の未熟子葉からの不定芽形成率を示した。この系譜より、「丹頂金時」の不定芽形成能は母親の「十育B30号」より受け継がれ、また「十育B30号」の不定芽形成能は母親の「昭和金時」より受け継がれたものと推察された。

今回の一連の試験により、体細胞突然変異の出現が期待できるインゲンマメの未熟子葉からの効率的な不定芽形成条件が明らかになった。また、その品種・系統間差異の存在が明らかになった。しかしながら、不定芽からの健全植物体の獲得は容易でなく、長期間の継代が必要で、獲得率は低かった。育種への応用には、今後、不定芽からの効率的な健全植物体再分化条件、さらに採種条件の確立が必要である。

謝 辞：本稿をとりまとめるに当たり、御校閲を頂いた中央農業試験場農産工芸部長村上紀夫博士および農産工芸部主任研究員紙谷元一氏に深く御礼申し上げます。

引用文献

- 1) Allavena, A., Rossetti, L. "Organogenesis from in vitro culture of immature cotyledons of *Phaseolus coccineus*". Ann. Rep. Bean Improv. Coop. 29, 132-133 (1986).

- 2) Allavena, A., Rossetti, L. "Micropropagation of bean (*Phaseolus vulgaris* L.); effect of genetic, epigenetic and environmental factors". Scientia Horticulturae. 30, 37-46 (1986).
- 3) Angelini, R. R., Allavena, A. "Plant regeneration from immature cotyledon explant cultures of bean (*Phaseolus coccineus* L.)". Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 19, 167-174 (1989).
- 4) Franklin, C. I., Trieu, T. N., Gonzales, R. A., Dixon, R. A. "Plant regeneration from seedling explants of green bean (*Phaseolus vulgaris* L.) via organogenesis". Plant Cell, Tissue and Organ Culture 24, 199-206 (1991).
- 5) Genge, A., Allavena, A. "Factors affecting morphogenesis from immature cotyledons of *Phaseolus coccineus* L.". Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 27, 189-196 (1991).
- 6) Kartha, K. K., Pahl, K., Leung, N. L., Mroginski, L. A. "Plant regeneration from meristems of grain legumes: soybean, cowpea, peanut, chickpea, and bean". Can. J. Bot. 59, 1671-1679 (1981).
- 7) Lazzeri, P. A., Hildebrand, D. F., Collins, G. B. "A procedure for plant regeneration from immature cotyledon tissue of soybean". Plant Mol. Biol. Rep. 3, 160-167 (1985).
- 8) Lazzeri, P. A., Hildebrand, D. F., Collins, G. B. "Soybean somatic embryogenesis: Effects of nutritional, physical and chemical factors". Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 10, 209-220 (1987).
- 9) Malik, K. A., Saxena, P. K. "Regeneration in *Phaseolus vulgaris* L. Promotive role of N6-benzylaminopurine in cultures from juvenile leaves". Planta. 184, 148-150 (1991).
- 10) McClean, P., Grafton, K. F. "Regeneration of dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) via organogenesis". Plant Sci. 60, 117-122 (1989).
- 11) Mohamed, M. F., Coyne, D. P., Read, P. E. "Shoot organogenesis in callus induced from pedicel explants of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.)". J. Am. Soc. Hortic. Sci. 118, 158-162 (1993).
- 12) Murashige, T., Skoog, F. "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures". Physiol. Plant. 15, 473-497 (1962).
- 13) Ranch, J. P., Oglesby, L., Zielinski, A. C. "Plant regeneration from embryo-derived tissue cultures of soybeans". In Vitro Cell. Dev. Bio. 21, 653-658 (1985).

- 14) Rubluo, A., Kartha, K. K. "In vitro culture of shoot apical meristems of various *Phaseolus* species and cultivars". J. Plant Physiol. 119, 425-433 (1985).
- 15) Sen, S., Newton, R. J., Fong, F., Neuman, P. "Absciscic acid: a role in shoot enhancement from loblolly pine(*Pinus taeda* L.) cotyledon explants". Plant Cell Reports. 8, 191-194 (1989).
- 16) 玉掛秀人, 中川善一, 南忠, 佐藤仁. "ベニバナインゲン未熟子葉からの植物体再分化系の確立と体細胞育種への応用". 北海道立農試集報. 82, 103-112(2002).

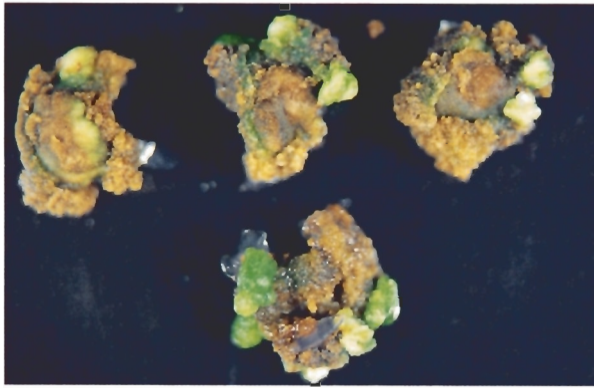


写真1 未熟子葉上に形成した organogenic カルス



写真2 未熟子葉上に形成した不定芽

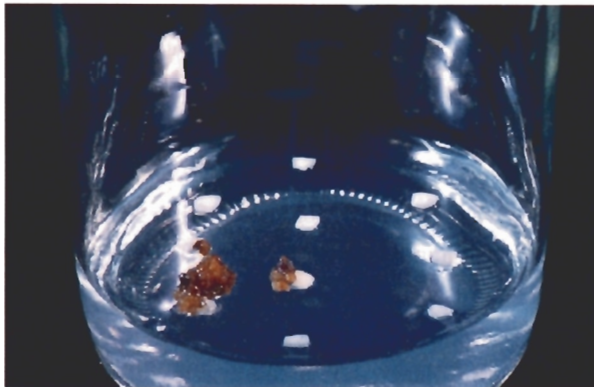


写真3 未熟子葉の白化枯死



写真4 不定芽からの細いシュート

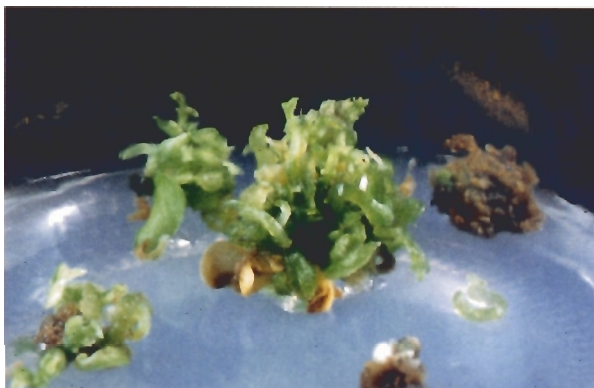


写真5 不定芽からの多芽体形成

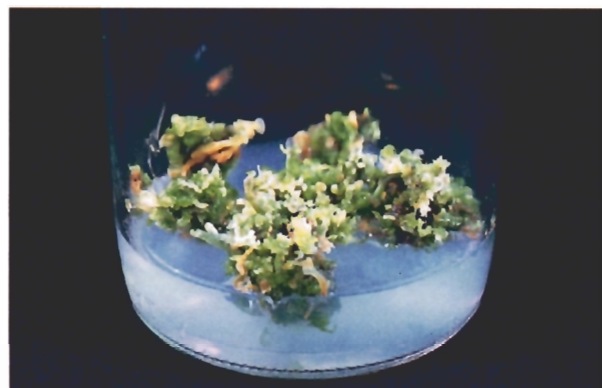


写真6 旺盛に増殖する多芽体



写真7 多芽体からの健全植物体形成



写真8 鉢上げ植物体からの温室での採種

Adventitious Bud Formation from Immature Cotyledons of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and its Genotypic Difference

Hideto TAMAGAKE*

Summary

Adventitious bud formation from immature cotyledons was demonstrated for the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Immature cotyledons were prepared as explants from immature pods that were collected from plants growing in the field. Addition of abscisic acid (ABA) to the medium was effective for adventitious bud formation. High frequency of adventitious bud formation was achieved when the explants, which were prepared from 4-6-mm immature cotyledons, were cultured on Murashige and Skoog (MS) basal medium containing 0.05 mg/l 2-naphthoxyacetic acid (NOA), 5mg/l benzylaminopurine (BAP), 0.5-2mg/l ABA, 30g/l sucrose, and 2g/l gelrite. Furthermore, before preparation of explants, low-temperature (6°C) processing of immature pods was required for six days or longer. In high temperature years, bleaching of explants was frequently observed within several days after culture. Bleaching of explants showed positive correlation with the temperature of the pod growth period, but culture conditions mentioned above limited bleaching generation to a low rate. Regeneration of healthy plants from adventitious buds required a long period. When adventitious buds were separated from explants and then transferred to MS medium without plant growth regulators, some developed into spindly shoots and finally multiple buds. These multiple buds proliferated vigorously and survived for more than two years when subcultured monthly. After several subcultures, rooted healthy plants often developed from multiple buds. Genotypic difference was observed in the ability of adventitious bud formation from immature cotyledons. Adventitious buds formed stably at high frequency in 'Tanco-kintoki', 'Fuku-toramame' and 'Showa-kintoki'.

* Hokkaido Central Agricultural Experiment Station, Naganuma, Hokkaido, 069-1395 Japan
E-mail: tamagahd@agri.pref.hokkaido.jp