

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

玉掛 秀人^{*1} 中川 善一^{*2} 南 忠^{*3} 佐藤 仁^{*1}

不定芽経路による植物体再分化系の培養法は、変異体の作出が可能なことから、ベニバナインゲン未熟子葉を用いて同培養系を確立した。最も効率的な植物体再分化は、7～11mmの未熟子葉を外植片とし、MS基本培地に0.05mg/l NOA, 5 mg/l BAP, 1～2 mg/l ABA, 45～60g/l ショ糖, 2 g/l ゲルライトを添加した不定芽形成培地への置床で得られた。この条件により、置床した外植片当たりの植物体形成率は15%程度を示した。未熟子葉培養により再分化した植物体 (R_1 世代) あるいはその後代 (R_2 世代) より採取した未熟子葉の培養では、不定芽形成率、植物体形成率ともに高まる場合が多かった。幾つかの実験で得られた再分化個体は系統番号を付し、節培養により増殖し、温室にてポリポットに鉢上げした。鉢上げ個体の活着は、鉢上げ後の天候に大きく左右されることが多く、活着率は平均50%程度であった。圃場へ移植した再分化個体は、湿害の影響がないときには順調に生育し、移植系統の70～90%から後代種子を得ることができた。再分化当代 (R_1 世代) の百粒重は、広い分布幅を示し、培養変異出現の可能性が示された。また、再分化当代と次世代 (R_2 世代) の百粒重に正の相関関係が認められ、再分化当代での大まかな粒大選抜が可能と思われた。再分化個体からの大粒選抜によって、原品種より明らかに百粒重の重い系統 (R_7 世代) を選抜育成することができた。

緒 言

ベニバナインゲンは北海道で約500ヘクタール(2000年)の作付けがあり、網走および胆振地方の重要な地域特産作物となっている。他の豆類に比べ子実の大きいことが特徴であり、甘納豆や煮豆として利用されるが、近年、安価な輸入品との競合が大きな問題となっている。輸入品は粒大が小さい欠点があることから、輸入品との差別化を図り道産品を今後も安定生産していくためには、より大粒で既存品種と同程度あるいはさらに早生の品種が求められている。

中央農業試験場では、1971年よりベニバナインゲンの育種を開始し、1976年には在来種からの純系分離により「大白花」を育成した¹⁾。その後二十年以上経過したが、新たな品種は育成されていない。その理由として、ベニバナインゲンの育種素材が乏しいこと、結莢率が低く交雑育種が困難なことなどを指摘できる。

近年、作物の品種改良においてバイオテクノロジーの利用が盛んに行われている。組織培養過程を経て再分化した植物体には、体細胞変異(平易には培養変異とも言われる)と呼ばれる様々な変異が高率で生じることが知られている²⁾。変異体の中から有用形質をもつ個体を選抜することで、幾つかの作物では新品種が育成されており^{3,4)}、新しい育種法(体細胞育種)として注目されている。この育種法を取り入れるには、体細胞変異体の出現が期待できる細胞あるいは組織からの植物体再分化系の存在が必要であるが、ベニバナインゲンの組織培養に関する研究や報告は少ない^{5,6,7)}。

そこで、本研究では、ベニバナインゲンの新たな変異拡大の方法として体細胞変異体の利用を取り入れるため、その基礎となる体細胞からの植物体再分化系の確立を目指し、培養条件を検討した。さらに、得られた再分化個体を圃場に移植し、後代種子を獲得するとともに、特性の評価と大粒系統の選抜を行い、この培養系の育種への利用の可能性も検討した。

試験方法

1. 未熟子葉からの効率的な植物体再分化系の確立

(1) 供試材料

「大白花」および「大白花」を材料に未熟子葉培養により得られた再分化個体を用いた。

2001年12月10日受理

^{*1} 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

^{*2} 同上(現:北海道立植物遺伝資源センター, 073-0013 滝川市)

^{*3} 同上(現:北海道立上川農業試験場, 078-0397 上川郡比布町)

(2) 外植片の調製

圃場栽培の植物体より未熟莢を採取した。約6℃の冷蔵庫内で3～4日間低温保存を行った後、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、さらに種皮を剥いで2枚の子葉を取り出した。分裂組織を取り除くために幼根、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て培地に置床した。用いる材料の大きさを揃えるために長径を測定し、特に断りのないときは5～10mmのものをを用いた。未熟子葉からの不定芽形成および植物体再分化に及ぼす未熟子葉の大きさの影響および外植片の調製法の影響を検討した。

(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(長径7mm以上の時は7個)の外植片を置床した。培養開始から7～8週間後に、外植片に形成した不定芽あるいは既に伸長したシュートを外植片より切り離し、植物体再分化培地に移植した。さらに1～2回同培地に継代して健全植物体を養成した。培養条件は、25±2℃、16時間照明、2,000～3,000luxで行った。

(4) 培地条件

特に断りのない限り不定芽形成培地は、MS培地⁸⁾を基本とし、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 アブジジン酸(ABA)、30g/l ショ糖、2g/l ゲルライトを添加した。また、植物体再分化培地は、MS培地を基本とし、30g/l ショ糖、8g/l 寒天を添加した。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。試験は主に未熟子葉からの不定芽形成および植物体再分化に及ぼす不定芽形成培地の組成(植物成長調節物質の種類と濃度、糖の種類と濃度、ゲル化剤の種類等)の影響を検討した。

(5) 調査

未熟子葉を置床してから7～8週間後に、緑色～黄緑色～白色の光沢のあるカルス様の形態(写真1、以下organogenicカルスと呼ぶ)を形成した外植片数、不定芽を形成した外植片数および全不定芽数を調査し、置床子葉当たりのorganogenicカルス形成率(%)および不定芽形成率(%)を算出し、この合計を形態形成率(%)とした。

植物体再分化培地に不定芽を移植し、数回の継代の後、得られた植物体数を調査し、置床不定芽当たりの植物体形成率(%)および置床子葉当たりの植物体形成率(%)を算出した。

再分化系確立試験は1990～1999年の10カ年間実施した。

2. 再分化個体からの後代種子の採種および変異調査と選抜

(1) 供試材料

「大白花」およびその再分化後代を材料に未熟子葉培養により得られた再分化個体を用いた。

(2) 再分化個体の鉢上げ

1993～1998年にかけて各試験で未熟子葉より不定芽経由で得られた再分化植物体は、節培養によってクローン増殖を行った。植物成長調節物質無添加のMS培地で2～3回継代を行い、それぞれの再分化個体を10個体程度の植物体に増殖し、系統番号を付した。培養瓶のキャップには、鉢上げ後の活着率を高めるためにメンブレン付きアルミ箔を用いた。翌年5月上旬～6月中旬にかけて、継代後2～3週間経過した植物体を、温室へ移動し、キャップをゆるめて2日間、キャップを取って2日間順化後、市販の育苗土の入ったポリポットに1～2個体を鉢上げし、灌水した。鉢上げ後、ポットをコンテナに入れ、2枚重ねにした不織布をかけ、急激な乾燥を防いだ。3～5日後には夜間、5～7日後には完全に不織布をはずした。

(3) 再分化当代系統(R₁)の圃場への移植と採種

鉢上げ後、活着し生育の良好な個体を、各年6月下旬～7月上旬に圃場に移植した。1系統について、1994～1996年は8個体(1反復)、1997～1999年は4個体(2反復)を、畦幅75cm、株間50cm、1株2本立で移植した。但し、十分な移植苗が得られなかった系統については、1個体のみの移植となる場合もあった。施肥量は、N、P₂O₅、K₂OおよびMgOをそれぞれ6.0、9.9、7.7および2.2kg/10aとした。各年秋に各系統、反復毎に採種を行った。1995および1997年は、系統、反復毎に粒数および粒重を調査し、各系統の百粒重を算出した。

(4) 再分化後代系統(R₂以降)の変異調査および選抜

再分化後代系統(R₂以降)については、中央農業試験場畑作部の標準耕種法に準じて栽培した。1系統について、R₂世代は4個体、R₃世代以降は10個体を、畦幅75cm、株間50cm、1株1本立で5月下旬に播種した。収穫後、個体毎に粒数、粒重を調査し、百粒重を算出した。百粒重を主に、熟期、粒数および粒形等を考慮して選抜した。

結 果

1. 未熟子葉からの効率的な植物体再分化系の確立

(1) 未熟子葉からの不定芽形成条件の検討

ベニバナインゲンと同じインゲンマメ(*Phaseolus*)属であるインゲンマメ(*P. vulgaris* L.)の未熟子葉からの再分化条件を検討する中で、品種「丹頂金時」の未熟子葉を植物成長調節物質としてNOAおよびBAPを含む

表1 未熟子葉からの不定芽分化 (1991年)

培地No.	培地組成 ¹⁾	置床数 ²⁾ (個)	枯死率(%)	形態形成率(%)	不定芽形成率(%)
M 1 ³⁾		40	0	2.5	0
M 2	1mg/l BAP (←5mg/l BAP)	40	0	12.5	0
M 3	10mg/l BAP (←5mg/l BAP)	40	2.5	2.5	0
M 4	5mg/lカイネチン (←5mg/l BAP)	40	0	5.0	0
M 5	5mg/l 2iP ⁴⁾ (←5mg/l BAP)	40	5.0	27.5	0
M 6	40g/lブドウ糖 (←30g/lシヨ糖)	40	0	20.0	2.5
M 7	mMS ⁵⁾ (←MS)	40	0	0	0
M 8	B 5 ⁶⁾ (←MS)	40	7.5	0	0
M 9	2g/lゲルライト (←8g/l寒天)	40	0	12.5	5.0

¹⁾ M 1 培地の組成と変更した点 ²⁾ 長径3~5mmの未熟子葉³⁾ M 1 培地: MS基本, 0.05mg/l NOA, 5mg/l BAP, 30g/lシヨ糖, 8g/l寒天 ⁴⁾ 2-イソペンテニルアデニン⁵⁾ MS基本培地からNH₄NO₃を除いた修正MS基本培地 ⁶⁾ Gamborgら (1968) による B 5 基本培地

培地で培養することで、低率で不定芽が形成されることが明らかになった⁹⁾。そこで、ベニバナインゲンにおいても不定芽形成が見られるかを、「大白花」を材料に培地条件を変えて検討した。表1に示すようにNOAおよびBAPを含むM1培地を標準にして、以下は培地組成を1項目だけ変更した。その結果、糖としてブドウ糖を用いたM6培地およびゲル化剤としてゲルライトを用いたM9培地で、不定芽の形成(写真2)が、それぞれ2.5%、5.0%と低率で見られた(表1)。サイトカイニンBAPから2iPに変えたM5培地では、organogenicカルスの形成率は高かったが、不定芽は形成されなかった。M6培地およびM9培地で形成された不定芽は植物体再分化培地へ移植後、シュートを伸長させ(写真3)、数回の継代の後には鉢上げ可能な植物体に生育した(写真4)。

(2) 不定芽形成および植物体再分化に及ぼすABA、糖およびゲル化剤の影響

不定芽形成培地におけるABA、糖およびゲル化剤の不定芽形成とその後の植物体再分化に及ぼす影響を1995~1997年の3カ年間検討した。図1~図2には3カ

年間の平均値と標準誤差を示した。ABA添加培地は無添加培地に比べて、不定芽形成率はより高く、不定芽形成に与えるABAの影響は顕著だった(図1)。一方、不定芽形成に及ぼす糖とゲル化剤の影響は判然としなかった。不定芽からの植物体形成は、培地組成による一定の傾向は見られなかった(データ省略)。その結果、置床子葉当たりの植物体形成率は、不定芽形成率の高かったABA添加培地で3.7~7.8%と高くなった(図2)。

(3) 不定芽形成および植物体再分化に及ぼす未熟子葉の大きさの影響

培養に用いる未熟子葉の大きさの影響を1995年と1996年の2カ年間検討した。両年ともほぼ同様な結果が得られたので、1996年の結果を表2に示した。不定芽形成率は7~11mm程度で25.4~29.5%と高く、11mmを越える大きさではやや低下した。また、不定芽からの植物体形成率は、大きさとの関係が判然とせず、置床子葉当たりの植物体形成率は、不定芽形成率の高い7~11mmで高かった。以上から、用いる未熟子葉の大きさを7~11mm程度に限定することで、より効率的に再分化植物体

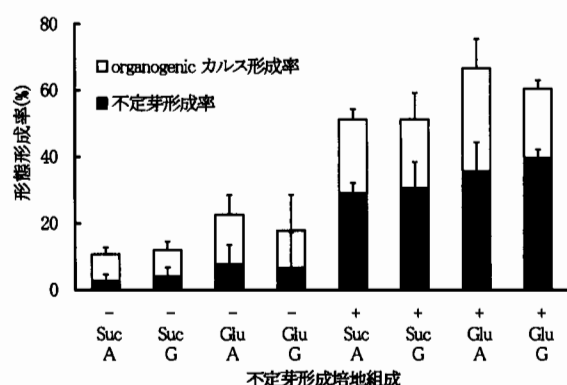


図1 未熟子葉からの形態形成に及ぼすABA、糖、ゲル化剤の影響

- : ABA無添加, + : 0.5mg/l ABA, Suc : 30g/l シヨ糖, Glu : 40g/l ブドウ糖, A : 8g/l 寒天, G : 2g/l ゲルライト, 縦線は標準誤差

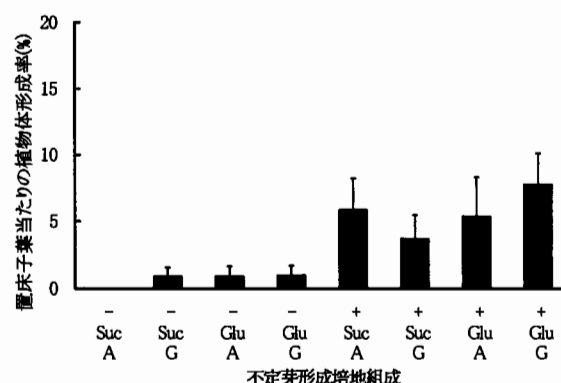


図2 未熟子葉培養における置床子葉当たりの植物体形成

- : ABA無添加, + : 0.5mg/l ABA, Suc : 30g/l シヨ糖, Glu : 40g/l ブドウ糖, A : 8g/l 寒天, G : 2g/l ゲルライト, 縦線は標準誤差

表2 不定芽形成および不定芽からの植物体再分化に及ぼす未熟子葉の大きさの影響 (1996年)

大きさ (mm)	置床数	形態形成率 (%)	不定芽形成率 (%)	全不定 芽 数	置床不 定芽数	植物体 形成数	植物体形成率 (%)	子葉当たりの 形成率 ¹⁾ (%)
3- 4	154	40.3	7.1	11	11	1	9.1	0.7
4- 5	156	50.6	22.4	39	39	4	10.3	2.6
5- 6	119	43.7	20.2	24	15	2	13.3	2.7
6- 7	176	44.9	19.9	36	27	9	33.3	6.8
7- 8	126	57.9	25.4	36	27	8	29.6	8.5
8- 9	105	59.0	29.5	34	28	6	21.4	6.9
9-10	97	51.5	27.8	31	30	13	43.3	13.9
10-11	61	42.6	27.9	17	17	6	35.3	9.8
11-12	107	40.2	23.4	25	15	1	6.7	1.6
12-13	101	23.8	11.9	15	13	5	38.5	5.7
3-13 合計	1202	45.8	20.7	268	222	55	24.8	5.5
7-11 合計	389	54.2	27.5	118	102	33	32.4	9.8

¹⁾ 置床子葉当たりの植物体形成率=植物体形成数/置床数×100, 但し不定芽のコンタミによる損失の補正として(全不定芽数/置床不定芽数)を掛けている

表3 不定芽形成および不定芽からの植物体再分化に及ぼすショ糖およびABA濃度の影響 (1998年)

ショ糖 濃度 (g/l)	ABA 濃度 (mg/l)	置床数 ¹⁾	不定芽 形成率 (%)	植物体 形成率 (%)	子葉当たり の形成率 (%)
30	0.5	70	12.9	33.3	4.3
45	0.5	103	9.7	70.0	6.8
60	0.5	69	14.5	50.0	7.2
30	1	84	15.5	38.5	6.0
45	1	98	29.6	63.3	19.4
60	1	84	16.7	71.4	11.9
30	2	70	20.0	35.7	7.1
45	2	84	23.8	66.7	16.7
60	2	70	31.4	50.0	15.7

¹⁾ 長径7~11mmの未熟子葉を使用

が得られることが明らかになった。

(4) 不定芽形成および植物体再分化に及ぼすショ糖濃度およびABA濃度の影響

不定芽形成培地のショ糖濃度を30, 45, 60g/lの3段階, ABA濃度を0.5, 1, 2mg/lの3段階で組合わせて, 1998年と1999年の2カ年間検討した。両年ともほぼ同様な結果が得られたので, 表3には1998年の結果を示した。ABA濃度が1~2mg/lで形態形成率および不定芽形成率がやや高まり, ショ糖濃度が45~60g/lで不定芽からの植物体形成率が高まる傾向が見られた。その結果, ABA濃度およびショ糖濃度を, それぞれこれまで用いていた0.5mg/l, 30g/lから1~2mg/l, 45~60g/lに変えることで, 置床子葉当たりの植物体形成率は, 約3~4倍に高まることになった。

(5) 不定芽形成および植物体再分化に及ぼす外植片の調製法の影響

外植片の調製法を変えて, 不定芽等の形態がどの部位に形成されるか, また不定芽形成, 植物体形成に及ぼす

表4 不定芽形成および不定芽からの植物体再分化に及ぼす外植片の調製法の影響 (1995年)

切り方	置床数	不定芽 形成率 (%)	植物体 形成率 (%)	子葉当たり の形成率 (%)
全体	81	18.5	0.0	0.0
2/3	81	28.4	12.0	3.9
1/2先端	115	9.6	10.0	1.0
1/2末端	115	19.1	10.0	1.9
1/3先端	100	6.0	50.0	3.0
1/3中間	100	26.0	19.2	5.0
1/3末端	100	14.0	6.3	1.0
四方切る	100	0.0	—	—

影響を検討した(表4)。不定芽形成率は, 胚(幼芽および幼根)を取り除いた全体を培養したときよりも胚の近傍1/3を除いた2/3を培養した方が高かった。また全体を培養した時に, 胚を取り除いた部位から不定芽が形成されることはなく, 形成された不定芽から植物体が発達することなかった。1/2あるいは1/3の調製では, 先端(胚のついていた方)よりも末端あるいは中間で不定芽形成率が高かった。子葉の周囲を切った外植片では, 不定芽は形成されなかった。以上の結果から, 不定芽は, 子葉の周辺の表面から形成され, 形成部位は先端よりも中間~末端に多いことが明らかになった。

(6) 不定芽形成および植物体再分化に及ぼす再分化系統間差異の検討

1993年に実施した再分化系確立試験で得られた未熟子葉からの再分化個体, 7個体を節培養によりそれぞれ8~10個体に増殖して系統とし, PC93-1-R₁~PC93-7-R₁の系統番号を付した。翌年, 各系統毎に6月に圃場へ移植し, 9月に着莢の良好だった5系統より未熟莢を採取し, 未熟子葉培養の再分化系統間差異を調査した(表

表5 未熟子葉からの不定芽形成および不定芽からの植物体再分化における系統間差 (1994年)

品種・系統 ¹⁾	置床数 ²⁾	不定芽 形成率 (%)	植物体 形成率 (%)	子葉当たり の形成率 (%)
PC93-1-R ₁ (1)	70	17.1	50.0	10.7
PC93-2-R ₁ (1)	49	4.1	—	—
PC93-3-R ₁ (1)	63	27.0	33.3	11.1
PC93-5-R ₁ (1)	70	40.0	50.0	25.0
PC93-6-R ₁ (1)	49	32.7	17.6	7.2
大白花 (0)	84	28.6	13.3	4.8

¹⁾ 括弧内は、系統が未熟子葉培養を経た回数²⁾ 用いた未熟子葉の大きさは3～8mm

表6 未熟子葉からの不定芽形成および不定芽からの植物体再分化における系統間差 (1995年)

品種・系統 ¹⁾	置床数 ²⁾	不定芽 形成率 (%)	植物体 形成率 (%)	子葉当たり の形成率 (%)
PC94-2-R ₁ (1)	89	39.3	19.0	8.1
PC94-9-R ₁ (2)	73	19.2	33.3	6.8
PC94-10-R ₁ (2)	68	20.6	66.7	14.7
PC94-20-R ₁ (2)	44	27.3	55.6	15.2
大白花 (0)	181	19.3	5.6	1.2

¹⁾ 括弧内は、系統が未熟子葉培養を経た回数。「PC94-2-R₁」は「大白花」を、「PC94-9-R₁」と「PC94-10-R₁」は「PC93-1-R₁」を、「PC94-20-R₁」は「PC93-5-R₁」をそれぞれ材料に用いて作出した再分化個体(「PC93-1-R₁」と「PC93-5-R₁」は「大白花」より作出した再分化個体)²⁾ 用いた未熟子葉の大きさは3～10mm

5)。再分化系統の不定芽形成率は、コントロールの「大白花」の28.6%に対して4.1～40.0%と大きな差が見られた。植物体形成率は、コントロールに比べて明らかに高い系統が多く、再分化系統「PC93-5-R₁」の子葉当たりの植物体形成率は25.0%とコントロールの約5倍となった。

1995年には、1994年に作出した再分化系統のうち、十分な着莢の見られた4系統を供試した(表6)。不定芽形成率は、「PC94-2-R₁」で39.3%、「PC94-20-R₁」で27.3%と高く、他の2系統はコントロールと大差なかった。不定芽からの植物体形成率は、4系統ともコントロールより高く、特に未熟子葉培養を2回経た「PC94-10-R₁」および「PC94-20-R₁」は、それぞれ66.7、55.6%と極めて高く、子葉当たりの植物体形成率も極めて高くなった。

1996年は、1994年に作出した再分化系統の次世代(R₂)を材料に用いた(表7)。R₂系統の不定芽形成率は、「PC94-2-R₂」および「PC94-20-R₂」で高く、植物体形成率および子葉当たりの植物体形成率は、「PC94-10-R₂」および「PC94-20-R₂」で高かった。この結果は、前年の

表7 未熟子葉からの不定芽形成および不定芽からの植物体再分化における系統間差 (1996年)

品種・系統 ¹⁾	置床数	不定芽 形成率 (%)	植物体 形成率 (%)	子葉当たり の形成率 (%)
PC94-2-R ₂ (1)	296	45.6	24.1	11.8
PC94-9-R ₂ (2)	195	28.7	37.7	11.8
PC94-10-R ₂ (2)	222	40.5	51.1	23.0
PC94-20-R ₂ (2)	101	46.5	44.9	21.8

¹⁾ 括弧内は、系統が未熟子葉培養を経た回数。「PC94-2-R₂」は「大白花」を、「PC94-9-R₂」と「PC94-10-R₂」は「PC93-1-R₁」を、「PC94-20-R₂」は「PC93-5-R₁」をそれぞれ材料に用いて作出した再分化個体の次世代(「PC93-1-R₁」と「PC93-5-R₁」は「大白花」より作出した再分化個体)

表8 再分化個体の鉢上げ後の活着状況

鉢上げ 年次	鉢上げ月日	鉢上げ 個体数	活 着 個体数	活着率 (%)
1995年	5/15～5/18	286	71	24.8
	5/24～5/25	60	45	75.0
	5/29～5/31	157	103	65.6
	6/ 5～6/ 6	82	36	43.9
	6/19	78	60	76.9
小計		663	315	47.5
1996年	5/ 7～5/10	252	182	72.2
	5/13～5/17	824	555	67.4
	5/21～5/22	246	146	59.3
	5/27～5/30	288	158	54.9
	6/ 3～6/ 6	172	75	43.6
小計		1782	1116	62.6
1997年	5/15～5/16	604	320	53.0
	5/19～5/23	1056	475	45.0
	5/27～6/ 6	980	603	61.5
	6/ 9	42	5	11.9
小計		2682	1403	52.3
3カ年間合計		5127	2834	55.3

R₁世代での結果とほぼ同様の傾向であり、再分化に関する形質が後代に遺伝することが示唆された。

2. 再分化個体からの後代種子の採種および変異調査と選抜

(1) 再分化個体の鉢上げ

未熟子葉より不定芽経由で得られた再分化植物体を温室にてポリポットに鉢上げして、圃場への移植苗を養成した(写真5)。1995～1997年の鉢上げ後の活着状況を表8に示した。メンブレン付きアルミ箔の使用にも係わらず、鉢上げ後枯死する個体がかかなりあった。鉢上げ後の活着率は、鉢上げ月日により11.9～76.9%と開きがあり、3カ年間を平均すると55.3%となった。

(2) 再分化当代系統(R₁)の圃場への移植と採種

1994年の試験で得られた37の再分化系統、274個体(1

表9 1994年に作出した再分化系統の後代種子の採種(1995年)

培養材料	鉢上げ 系統数	移植 系統数	採種 系統数	採種数 ¹⁾ (粒)	百粒重 ²⁾ (g)
大白花	10	10	7	215 (4~115)	135.4 (125.6~142.2)
PC93-1-R ₁	6	6	6	326 (25~77)	133.5 (116.4~159.4)
PC93-3-R ₁	6	6	4	54 (3~35)	126.6 (126.6)
PC93-5-R ₁	10	9	8	284 (13~55)	119.5 (103.5~148.9)
PC93-6-R ₁	6	6	3	42 (4~19)	107.4 (105.7~109.5)
合計	38	37	28	921	

¹⁾ 括弧内は範囲²⁾ 10粒以上採種できた系統の平均値, 括弧内は範囲

表10 1996年に作出した再分化系統の後代種子の採種(1997年)

培養材料	鉢上げ 系統数	移植 系統数	採種 系統数	採種数 ¹⁾ (粒)	百粒重 ²⁾ (g)
大白花	117	113	80	2865 (1~127)	123.9 (62.2~186.2)
PC94-2-R ₂	48	46	30	780 (3~99)	123.3 (88.1~181.1)
PC94-9-R ₂	24	24	20	559 (1~97)	135.4 (90.0~183.0)
PC94-10-R ₂	60	59	43	1155 (1~105)	118.5 (79.4~148.4)
PC94-20-R ₂	20	19	13	319 (2~78)	134.9 (97.1~152.1)
合計	269	261	186	5678	
大白花胚 ³⁾	14	14	14	834 (14~86)	120.5 (101.4~141.6)

¹⁾ 括弧内は範囲²⁾ 10粒以上採種できた系統の平均値, 括弧内は範囲³⁾ 未熟種子の胚を培養して得られた個体

～8個体/系統)を翌年6月28日に圃場へ移植した。移植後の活着は良好で、その後湿害で生育は幾分停滞したが、ほぼ順調に生育した(写真6)。移植した37系統のうち28系統(75.6%)から3～115粒の後代種子が得られた(表9)。培養中の苗の生育、葉色に系統間差が見られたが、移植後の生育、葉色との関係は見られなかった。10粒以上採種出来た再分化系統の百粒重は、103.5～159.4gの開きがあった。また、培養材料により平均値に差があり「大白花」由来系統で135.4gと重く、「PC93-6-R₁」由来系統では107.4gと軽かった。

1996年は、1995年の試験で得られた82系統を7月4日に圃場へ移植した。移植後湿害のために多くは活着せず枯死し、また活着した個体も生育が著しく抑制され、19系統にのみ1～35粒の種子を得た(データ省略)。

1997年は、1996年に作出した再分化系統のうち261系統を6月23日に圃場へ移植した。移植後の生育はほぼ良好で186系統(71.3%)から1～127粒の種子を採種できた

(表10)。コントロールには、「大白花」の未熟種子より摘出した胚(幼芽および幼根)を培養し、14個体の *in vitro* 植物体を作成し、再分化系統と同様にクローン増殖し、移植、採種した。再分化系統の百粒重は、62.2gから186.2gまでの広い変異幅があった。また、培養材料により平均値に差があり「PC94-9-R₂」および「PC94-20-R₂」では、コントロールの胚由来培養個体より約15g重かった。図3には「大白花」由来再分化系統の百粒重分布を示したが、コントロールに比べて広がっており、180gを越える系統も存在した。

(3) 再分化次世代(R₂)系統の百粒重分布

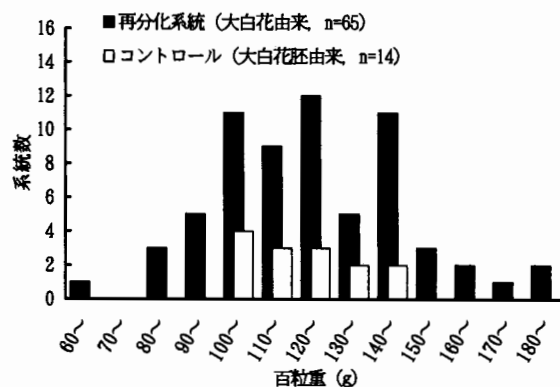
1996年に未熟子葉培養によって得られた再分化系統の次世代(R₂)系統(各系統4粒)を、1998年に播種した。収穫後、個体毎に粒重、粒数を調査し、百粒重を算出した。図4には「大白花」由来再分化系統の系統内の個体毎の百粒重分布を示した。但し、8月下旬以降の多雨により圃場の一部で湿害の影響により生育障害を受けた系統が見られたため、湿害の影響を強く受けたと思われる収穫粒数が1～9粒の系統は除外した。「大白花」由来系統は、比較的湿害の影響を受けず、広い百粒重分布を示したが、コントロールの「大白花」の分布を大きく越えることはなかった。

(4) 再分化当代(R₁)系統と次世代(R₂)系統の百粒重の相関

「大白花」由来R₁系統の百粒重(1997年調査)とR₂系統の百粒重(1998年調査)の相関を図5に示した。R₂系統の百粒重は、各系統毎に10粒以上採種できた個体の粒重および粒数を合計し、算出した。ただし、湿害の影響により本来の特性を十分に発揮していないと思われる1～9粒の個体は除き、さらに1個体のデータしかない系統は除外した。相関係数は0.616となり1%水準で有意な正の相関を示した。

(5) 選抜系統の大粒形質の維持

1995年～2000年の6ヶ年において再分化個体より系統

図3 再分化当代系統(R₁)後代種子の百粒重分布(1997年)

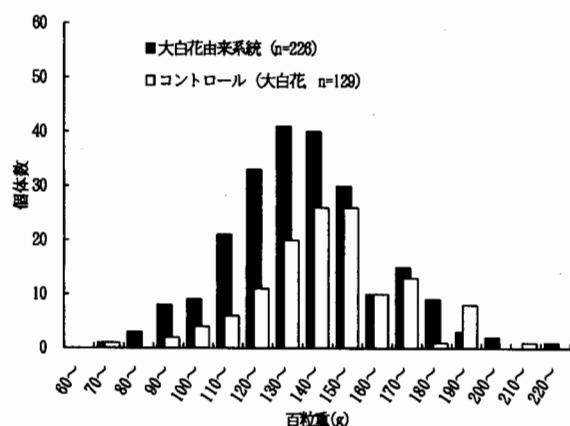


図4 再分化 R_2 系統後代種子の百粒重分布 (1998年)

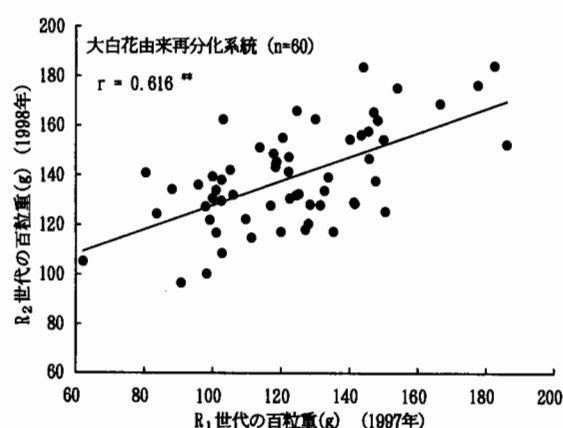


図5 再分化当代と次世代での百粒重相関

を養成し、「大白花」を上回る大粒系統の育成を目標に選抜を継続した。栽培期間中順調に生育し、収穫できた年は少なく、1996年および1998年は一部の圃場で、湿害による枯死あるいは生育不良、収穫粒数の減少、1999年は、夏期の高温による着莢の遅れ、登熟期後半の多雨による腐敗粒の多発、収穫粒数の減少が見られた。

2000年で R_7 世代の系統PC93-1-7-3-1-1は、1993年に未熟子葉培養により作出された「大白花」由来再分化個体の選抜系統である。この選抜系統の百粒重の平均は、205.0gで「大白花」に比べ11%重く、また、系統群内で大粒化の変異は維持されており、大粒の変異は固定されているものと考えられた (表11)。

考 察

1. 未熟子葉からの効率的な植物体再分化系の確立

ペニバナインゲンの植物体再分化は、Allavena and Rossettiniにより1986年に最初に報告されている⁵⁾。100 mg/l ABAを含む培地で24時間処理後、インドール酢酸 (IAA) と BAP を含む培地で培養された2枚の未熟子葉からシュートが形成され、再分化植物体が得られている。

表11 大粒選抜により育成された系統¹⁾の百粒重の変異 (2000年)

系統番号	調査 個体数	百粒重 (g)	標準 偏差	変異係数 (%)
大白花-1	8	191.4	8.1	4.2
-2	10	188.9	14.5	7.7
-3	9	192.1	14.1	7.3
-4	10	175.5	28.8	16.4
系統平均 系統間		187.0		4.2
選抜系統-1	9	195.3	19.7	10.1
-2	9	218.6	20.6	9.4
-3	6	204.8	20.0	9.8
-4	10	201.3	16.0	7.9
系統平均 系統間		205.0		4.8

¹⁾ PC93-1-7-3-1-1 (R_7)

さらに、得られた再分化植物体の後代を用いた実験により、Angelini and Allavena は、オーキシン NOA とサイトカイニン 2 iP の植物成長調節物質の組合せが未熟子葉からの再分化に効果的であると述べている⁶⁾。

そこで、まず最初に北海道の栽培品種「大白花」を用い、主に NOA と 2 iP を含む培地での未熟子葉培養の反応を検討した。置床して3～4週間経過した頃から、外植片の周りに最初は白色で次第に褐色になるカルスが形成されるとともに、一部の外植片で1～4 mm ほどの緑色～黄緑色～白色の光沢のあるカルス様の形態が形成された (写真1)。この形態は、他のカルスとは容易に区別でき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。この organogenic カルスからの植物体再分化をめざし、糖濃度や植物成長調節物質の組成等を変更した数種類の培地に継代したが、肥大するのみで再分化には至らなかった。その後の実験で、ペニバナインゲン未熟子葉からの不定芽形成の成功は、同時に平行して実施していたインゲンマメの未熟子葉培養において不定芽形成に成功した NOA および BAP を含む培地で得られた。不定芽形成に適するサイトカイニンの種類は、本実験では BAP, Angelini and Allavena の報告では 2 iP と異なるが、実験材料のサイトカイニン感受性の違いによるものと思われた。

体細胞変異を利用して恒常的に育種を進めていくためには、育種規模に見合った十分な数の変異体の作出が必要である。植物体獲得率の向上をめざし、不定芽形成培地の培地組成を検討した。その結果、0.5mg/l ABA の添加は不定芽形成に極めて効果的であり、さらに、ABA 濃度を0.5mg/l から1～2 mg/l と高くすることによって、不定芽形成率がより高まること、また、ショ糖濃度を30 g/l から45～60g/l と高くすることによって、不定芽からの植物体形成率が高まることが明らかになった。培養効

率を端的に示す値である子葉当たりの植物体形成率から判断すると、今回の試験で得られた最適不定芽形成培地の組成は、MS 培地を基本とし、0.05mg/l NOA, 5 mg/l BAP, 1~2 mg/l ABA, 45~60g/l ショ糖, 2 g/l ゲルライトを含む培地条件であった。この条件により、子葉当たりの植物体形成率は15%程度を示した(表3)。

外植片の調製法の検討では、胚を取り除いただけの外植片では植物体が形成されず、また、1/2に切断した末端部分や1/3に切断した中間あるいは末端部分で不定芽や植物体の形成が多く見られた(表4)。このことは、今回組織学的研究を行っていないが、不定芽の形成が分裂組織ではない体細胞組織由来であることを示している。

未熟子葉培養により得られた再分化系統、その後代、さらには未熟子葉培養過程を2回経た再分化系統より未熟子葉を採取した時、不定芽形成率、不定芽からの植物体形成率は、培養過程を経ない原品種「大白花」に比べて、ともに高くなる場合が多かった(表5, 6, 7)。とくに、不定芽からの植物体形成率が高まる傾向が見られた。また、1994年に得られた4再分化系統(R_1)の高い植物体形成率と系統間差は、その後代(R_2)においても維持された(表6, 7)。このことは再分化能が後代に遺伝する形質であることを示している。

2. 再分化個体からの後代種子の採種および変異調査と選抜

未熟子葉培養によって得られた再分化個体の温室への鉢上げでは、初期には、鉢上げ後の活着率が著しく劣ったが、鉢上げ前の植物体培養の際に培養瓶のキャップにメンブレン付きアルミ箔を使用することで、活着率はかなり向上した。しかしながら、表8に見られるように、鉢上げ日時により活着率は変動し、3カ年平均で50%をやや越える程度であった。これは、鉢上げ時の植物体の根痛みや、その後の発根が遅く、また貧弱なため、鉢上げ後の天候に左右されやすいことが原因と思われた。温度および湿度の制御されていない温室であったため、極端な晴天が続くと蒸れや乾燥により枯れ、極端な曇天が続くと腐敗により枯れた。移植後の天候に左右されず、高い活着率とするために、鉢上げ前の植物体の培養期間、順化期間等について検討したが、効果的な条件を見いだすことは出来なかった。体細胞育種を効率的に進めて行くには、活着率の向上は重要であり、今後の問題点として残った。現状では、圃場への移植に必要な苗を確保するには、節培養によりやや多めに植物体数を増やし、活着状況を見ながら数回に分けて鉢上げする必要がある。

圃場へ移植した苗は、湿害の影響がない場合、順調に活着・生育し、7月下旬以降には茎葉の旺盛な伸長と開花・結実が見られ、移植系統の70~90%から後代種子を採種することができた。ペニバナインゲン是一般に耐湿

性が弱く、湿害の影響を受けやすいため、苗の移植には排水の良い圃場の選定が必要である。

再分化当代(R_1)系統の百粒重を1995年および1997年の2カ年間調査した結果、広い分布幅を示し、粒大に関する体細胞変異出現の可能性が示された。但し、コントロールとした未熟胚由来の植物体の供試数が少なく、残念ながらこのことを強く断言できるデータとは言えない。しかしながら、百粒重においてコントロールの平均の1.5倍を示す系統が認められたことも事実である。さらに、 R_1 系統(1997年調査)と R_2 系統の百粒重(1998年調査)に有意な正の相関関係が見られた(図5)。このことは、 R_1 世代においても粒大に関する遺伝的能力が現れていることを示しており、種子からではなく、培養瓶より取り出して鉢上げ後圃場に移植した R_1 世代でも大まかな粒大選抜が可能と思われた。

今回の試験により、ペニバナインゲンの体細胞組織からの効率的な再分化系が確立できたことから、体細胞変異を利用した品種改良の可能性が示された。ペニバナインゲンは、一般に結実率が4~10%と低く、また高温時の結実も劣る性質がある。冷涼な北海道が栽培適地となっているが、北海道においても高温年には夏期間の結実が劣り、生育後期の結実により収穫期に未熟な莢が多く出るなど、栽培上の不安定要因となっている。また、花の構造上から部分他殖性の強い作物であると言われており、このことは育種を煩雑にしている。体細胞変異は、目に見える形質ばかりでなく、内部成分など様々な形質に出現することが報告されている。今回、粒大形質に関して選抜を行ったが、今後体細胞育種を進め、着眼点を変えた選抜を行うことにより、高温時の結実の良い変異体、結実率が高く高収量の変異体、あるいは花の構造の変異などによる自殖性の高い変異体など、育種上有用な素材が得られる可能性がある。

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場長下野勝昭博士および農産工学部長村上紀夫博士に深くお礼申し上げる。

引用文献

- 1) 及川邦男, 野村信史, 天野洋一. “花豆新品種「大白花」の育成について”. 北海道立農業試験場集報. 38, 99-105 (1977).
- 2) Larkin, P. J., Scowcroft, W. R. “Somaclonal variation-a novel source of variability from cell culture for plant improvement”. Theor. Appl. Genet. 60, 197-214 (1981).
- 3) Arihara, A., Kita, T., Igarashi, S., Goto, M., Irikura, Y. “White Baron: A non-browning somaclonal Variant of Danshakuimo (Irish Cobbler)”. American

Potato J. 72, 701-705 (1995).

- 4) 岩本嗣, “ソマクローナル変異選抜法によるフキの育種”. 農業および園芸, 75, 241-247 (2000).
- 5) Allavena, A., Rossetti, L. “Organogenesis from in vitro culture of immature cotyledons of *Phaseolus coccineus*”. Ann. Rep. Bean Improv. Coop. 29, 132-133 (1986).
- 6) 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).
- 7) Genge, A., Allavena, A. “Factors affecting morphogenesis from immature cotyledons of *Phaseolus coccineus* L.”. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 27, 189-196 (1991).
- 8) Murashige, T., Skoog, F. “A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures”. Physiol. Plant. 15, 473-497 (1962).
- 9) 北海道立中央農業試験場, “菜豆未熟子葉からの植物体再分化系の確立”. 平成12年度北海道農業試験会議成績会議資料. 2001.

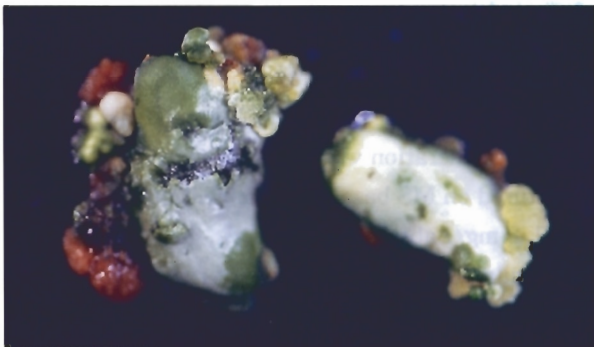


写真1 形成されたorganogenicカルス

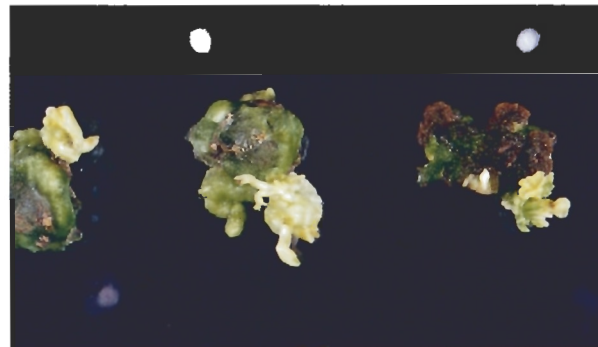


写真2 形成された不定芽



写真3 不定芽からのシュートの伸長



写真4 再分化植物体



写真5 移植前の鉢上げ植物体



写真6 再分化当代系統の圃場での生育 (1995.8.15)

Plant Regeneration from Immature Cotyledons of Scarlet Runner Bean(*Phaseolus coccineus* L.) and Application to Somaclonal Breeding

Hideto TAMAGAKE^{*1}, Zen-ichi NAKAGAWA^{*2},
Makoto MINAMI^{*3} and Hitoshi SATO^{*1}

Summary

An efficient and reproducible protocol for plant regeneration from immature cotyledons of the scarlet runner bean (*Phaseolus coccineus* L.) has been developed. Since regenerated plants are derived from somatic tissue, appearance of somaclonal variants can be expected. Adventitious buds were first formed from immature cotyledons; then, regenerated plants were obtained from adventitious buds by subculture 1-3 times on Murashige and Skoog (MS) basal medium without plant growth regulators. Most efficient plant regeneration was achieved when the explants, which were prepared from 7-11 mm immature cotyledons, were cultured on MS basal medium containing 0.05 mg/l 2-naphthoxyacetic acid (NOA), 5 mg/l benzylaminopurine (BAP), 1-2 mg/l abscisic acid (ABA), 45-60 g/l sucrose, 2 g/l gelrite. In this condition, frequency of plant regeneration, calculated as the percentage of regenerated plants per original plated explants, was approximately 15%. Sometimes immature cotyledons from regenerated plants growing in the field were cultured; in many such cases, plant regeneration occurred at higher rates. Regenerated plants obtained in several experiments were micropropagated by nodal culture and transferred to pots containing compound soil in a greenhouse. Growth of plants after transfer to pots was strongly affected by weather, and only about 50% of plants transferred to pots survived and grew healthily. Plants in pots were transplanted to the field as R_1 lines. Without excess-moisture injury during the growth period, R_1 lines grew smoothly and progeny seeds were obtained from 70-90% of R_1 lines. A 100-seed weight of R_1 lines had wide distribution, indicating possible appearance of somaclonal variants. Moreover, the 100-seed weight of R_1 lines showed a positive correlation with that of their progeny (R_2 lines). This means that rough selection for seed size in the R_1 generation was enabled. By selection of heavier seed weights from regenerated plant progeny lines, we were able to select a line (R_2 generation) which seeds were clearly heavier than the original variety 'Ooshirohana' at the 100-seed weight.

^{*1} Hokkaido Central Agricultural Experiment Station, Naganuma, Hokkaido, 069-1395 Japan
E-mail:tamagahd@agri.pref.hokkaido.jp

^{*2} ibid. (Present; Hokkaido Plant Genetic Resources Center, Takikawa, Hokkaido, 073-0013 Japan)

^{*3} ibid. (Present; Hokkaido Kamikawa Agricultural Experiment Station, Pippu, Hokkaido, 078-0397 Japan)