

キャベツ実生組織からの多芽体の形成 および分化個体にみられた変異

北浦健生 高柳りか 三浦泰昌

Effects of Plant Growth Regulators on Multiple Shoot Formation from Cabbage Seedling and Derived Genetic Variations of the Regenerated Plants.

Takeo KITAURA, Rika TAKAYANAGI and Yasumasa MIURA

緒 言

三浦半島で栽培されている“夏まき冬どりキャベツ”では降霜後に発生する腐敗病が問題になっている。腐敗病は、降霜時に凍害を受けた箇所への*Pseudomonas viridiflava*または*P. marginalis*の感染により引き起こされる細菌病であり^{1,2)}、その対策としては寒冷紗等の被覆資材による“べたがけ”が有効である³⁾。この対策技術は腐敗病発生の引き金になる凍害の回避を目的としたものであるが、腐敗病菌に対する抵抗性品種が育成されれば、腐敗病対策が一層確実になるのに加え、被覆資材費等の節約も可能となろう。

抵抗性品種の育成には種々の方法が考えられるが、近年、培養中に発生する変異を利用した抵抗性品種の育成の可能性について多くの作物で検討されている。アブラナ科野菜においても種々の培養系の確立がこれまで報告されており、培養中に発生する変異の育種への利用の可能性が考えられるが、細胞選抜に関する報告はこれまでのところない⁴⁾。そこで細胞・組織培養を利用した腐敗病抵抗性キャベツの育成・増殖の可能性について検討するため、まず組織培養系の確立に取り組んだ。

本研究では、キャベツの培養系を確立するために、カルス、不定芽および不定根の形成条件、特に多くの不定芽が同時に形成される多芽体形成条件を明らかにし、次に培養中の変異発生の有無を調査し、組織培養の品種改

良への利用の可能性を検討した。

材料および方法

本研究では、形態形成におよぼす生長調節物質の影響を実験1および実験2で検討し、次に培養由来個体の自殖次代の形質を実験3で調査した。

実験1. 形態形成におよぼす生長調節物質の影響

培養には外植片として、無菌的に発芽させた品種“金春”(サカタのタネ)の実生の3組織(子葉、胚軸および根)を用いた。種子は70%エタノールで1分間、続いて次亜塩素酸ナトリウム溶液(有効塩素1%)で30分間滅菌処理を行い、その後滅菌水で2回洗浄した。滅菌した種子を直径18mmの試験管内の0.1%(W/V)ハイポネックスおよび3%(W/V)しょ糖を含む寒天培地に1試験管あたり1粒置床した。発芽条件は25℃、12時間日長(3000lux)とした。

は種8日後の実生を子葉、胚軸および根の3組織にメスで分割し、MS培地にNAAとBAを各々4種類の濃度で組み合わせ添加した、16種類の培地に置床した。培養には直径6cmのシャーレを用い、生長調節物質の添加濃度はNAAおよびBAともに0.1、1.0および10ppmの3濃度とした。培養条件は25℃、12時間日長(3000lux)とし、置床30日後にそれぞれの外植片における形態の変化を調査した。

実験2. 多芽体形成条件の検討

実験1の結果、同時に多数の不定芽の形成される多芽体が形成されたため、外植片を胚軸および根に限定して多芽体の形成におよぼす生長調節物質の影響を検討した。

供試品種には“金春”を用い、無菌発芽させた実生の胚軸および根をNAAとBAを数段階の濃度で組み合わせて添加した8種類のMS培地に置床した。生長調節物質の添加濃度は、NAA:0.1ppmの1種類、BA:1.0, 3.0, 10, 30ppmの4種類とした。培養は実験1と同一条件で行い、置床25日後に各外植片における多芽体の形成状態を調査した。

実験3. 培養過程における変異発生調査

実験2で形成された多芽体由来の個体を用い、培養中の変異発生の有無を検討した。遺伝的変異には優性と劣性の変異が存在する。一般に優性変異は再分化当代の個体に現れるが、本試験では顕著な形態変異はみられなかったため、ここでは劣性変異発生の有無を調査した。劣性変異は自殖次代ではじめて発現されるため、再分化個体を自殖した次代の2系統の形質調査を行なった。

ただし、ここで供試した“金春”は交雑品種であるため、自殖次代にみられる変異が劣性突然変異によるものか、異型接合していた遺伝子が同型接合して表現型に現れたものかが明らかではない。そのため、基品種の“金春”および培養を行なわない“金春”の自殖次代を対照系統として形質の比較、調査を行なった。

栽培は、1989年8月31日には種し、11月24日に定植した。施肥は、元肥として堆肥を1t/10aおよび化成肥料をN:P:Kの各々18kg/10a施用し、追肥として1990年2月23日に化成肥料をN:P:K各6kg/10a施用した。試験区の配置は乱塊法の4反復とした。

結 果

実験1. 形態形成におよぼす生長調節物質の影響

外植片からはカルス、不定芽および不定根の形成がみられたが、添加濃度の違いによりそれぞれの形成状況は異なった(第1表)。形成状況別に見ると、カルスは各外植片ともに切り口の部分から分化し、さらに根では根毛のつけお付近からも分化した。カルス形成率は供試した3外植片ともに高い値を示した。ただし、NAA単独で1.0ppm以上の濃度で添加した培地に根を置床した場合には、カルス形成が抑制された。

不定芽の形成率は胚軸で高く、子葉では低かった。3外植片ともにNAAを0.1ppm以下の濃度で添加した区で

不定芽が形成された。胚軸および根における不定芽の形成状況はほぼ一致しており、形成率はBAの添加濃度に伴って高まる傾向がみられた。また、高濃度のBA添加区では多芽体も形成された。

不定根の形成についてみると、形成率は子葉および根で高い値を示した。また、組織によって不定根形成におよぼす生長調節物質の影響が異なった。すなわち、子葉では、NAA1.0ppm以上の添加濃度で不定根形成率が高い値を示したが、0.1ppm以下ではBAの添加濃度が高まるほど形成率が低下した。胚軸でも、NAAが0.1ppm以下の添加区ではBAの添加濃度が高まるほど形成率が低下したが、NAA1.0ppm以上の添加区ではBA濃度1.0ppmで高い形成率を示した。さらに、根では1.0ppm以上のNAA添加区で不定根が形成された。

また根では、不定芽と不定根の形成条件は明瞭に異なり、NAAの添加濃度0.1ppm以下では不定芽が形成され、1.0ppm以上では不定根が形成された。

実験2. 多芽体形成条件の検討

カルスの形成に続いて、多芽体が形成された(第1図)。多芽体の形成におよぼす生長調節物質の影響を第2図に示したが、BAの1.0-10ppmの添加により多芽体形成率が増加した。一方NAA添加区(0.1ppm)では、多芽体形成率が減少する傾向が見られた。

多芽体の形成に及ぼすBA濃度の影響は外植片ごとに異なり、胚軸ではBA3.0ppmの添加により高い形成率を示した。一方、根においては、胚軸との切断部分では1.0ppm、それ以外の根の部分では10ppmのBA添加により高い不定芽形成率を示した。また、根ではNAA0.1ppmおよびBA3.0ppmの添加区でも高い多芽体形成率を示した。

実験3. 培養過程における変異発生調査

多芽体由来の培養2系統(C₁, C₂系統)では奇形葉を形成する個体および不結球の個体が発生し、また結球の遅い個体が多数発生した(第3図、第2表)。

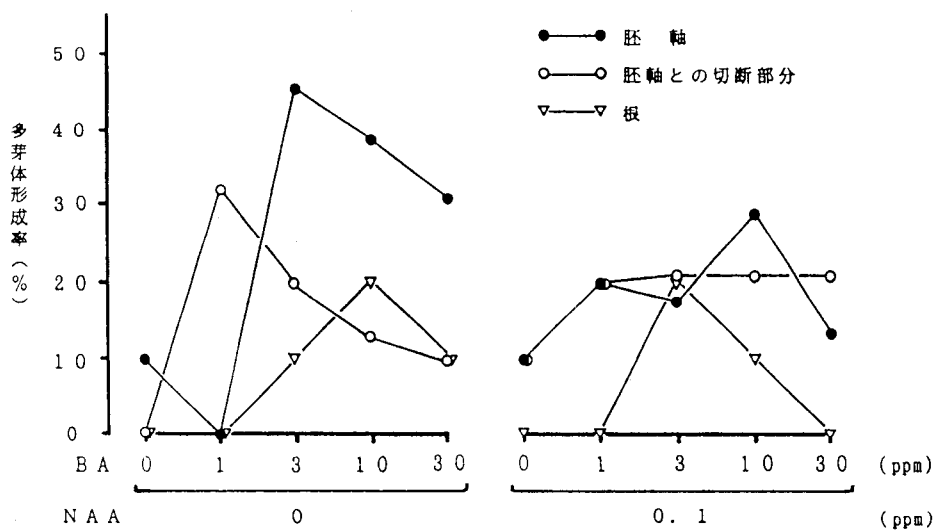
一方、基品種およびその自殖系統では奇形葉を形成する個体および不結球個体は観察されなかった。また、結球の遅い個体は基品種ではほとんど発生しなかったが、自殖系統では多数発生した(第2表)。

奇形葉の形成部位は外葉に限定され、結球部にはほとんど発生しなかった。

第1表 器官別にみたキャベツの不定芽および不定根形成率におよぼす生長調節物質の影響

NAA	BA	子 葉			胚 軸			根		
		C	B	R	C	B	R	C	B	R
0ppm	0ppm	100%	0%	100%	100%	33.3%	33.3%	100%	25%	25%
0	0.1	75	0	25	83	0	16.7	75	0	0
0	1.0	100	0	12.5	100	9.1	18.2	100	25	0
0	10	100	0	0	100	41.7	2	100	50	0
0.1	0	100	0	100	100	16.6	50	100	0	0
0.1	0.1	100	0	75	100	8.3	66.	100	0	0
0.1	1.0	100	0	25	100	33.3	33.3	100	25	0
0.1	10	100	12.5	0	100	25.0	8.3	100	25	0
1.0	0	100	0	100	100	0	0	25	0	100
1.0	0.1	100	0	100	100	0	8.3	100	0	75
1.0	1.0	75	0	100	100	0	75	100	0	75
1.0	10	75	0	87.5	75	0	50	100	0	50
10	0	100	0	100	100	0	0	0	0	100
10	0.1	100	0	100	91.6	0	50	75	0	100
10	1.0	100	0	100	91.6	0	75	100	0	75
10	10	100	0	100	75	0	58.3	75	0	75

注 *) アルファベットはそれぞれ、C:カルス形成率、B:不定芽形成率およびR:不定根形成率を示す。



第2図 多芽体形成におよぼす生長調節物質の影響

第2表 キャベツ再分化自殖次代の形質

系統名	系統の内容	供試数	結球の遅れ	奇形葉	
				I	II
金春	供試基品種	20	1	0	0
S	基品種自殖次代	20	11	0	0
C 1	再分化自殖次代	20	10	3	2
C 2	再分化自殖次代	20	11	2	2

註 奇形葉 I は不結球個体を示す。
奇形葉 II は中肋部の小葉の発生を示す。
奇形葉 I、II は必ずしも同一個体に発生していない。

考 察

一般に、組織培養には相反する2つの利用面が考えられる。すなわち、遺伝的に均一な栄養体の増殖を目的とする場合と、培養中に発生する変異を積極的に利用する場合である。しかし、一つの培養系について考えると、同時に2つの利用目的を満足させることは不可能であり、目的を正しく設定することが重要になる。

本研究では、まずキャベツの培養系を確立し、続いて利用面からその培養系を評価することを目的として行なった。そこで、ここではまず形態形成におよぼす生長調節物質の影響を考察し、次に培養中の変異の発生について考察する。

1. 形態形成におよぼす生長調節物質の影響

組織培養系を確立する場合、はじめに培地への生長調節物質、特にオーキシンおよびサイトカイニンの添加方法を検討した報告が多い。本研究でも、培地への生長調節物質の添加がキャベツ組織の形態形成におよぼす影響について検討した結果、キャベツの実生組織からカルス、不定芽および不定根を形成させることができた。

原田²⁾によれば、一般に、オーキシンの添加は不定根の形成に有効であり、サイトカイニンの添加は不定芽の形成に有効であるという²⁾。本研究の結果を生長調節物質の影響の点から見ると、NAAは不定根形成に、BAは不定芽形成に有効であり、原田²⁾と一致していた。特にNAA濃度の違いが形態形成におよぼす影響は大きく、不定芽はNAA0.1ppm以下の添加区でのみ形成された。また根では、NAA濃度0.1-1.0ppmを境にして不定芽と不定根の形成状態が明瞭に異なり、生体内の生理状態に大きな影響をおよぼしていると推察された。今後、さらにキャベツの形態形成に関する研究を行なう場合、本培

養系は有効な研究手段になり得るものと考えられた。

一方、外植片に用いる組織ごとに、不定芽および不定根形成率におよぼす生長調節物質の影響は大きく異なった。古くから、植物体内の植物ホルモン濃度は組織ごとに異なり、生長点に近いほどオーキシン濃度の高いこと⁹⁾、IAAの生長に対する好適濃度は組織ごとに異なること⁸⁾が知られている。培養に用いる外植片においてもこのような生理的不均一性の存在が考えられ、このことが形態形成の様相の違いと関連している可能性がある。

応用面からみると、本実験は培養系を確立する際の供試組織の選定の重要性を示したものと考えられる。外植片に用いる組織の選定および生長調節物質の添加量を検討した本研究の結果から有効な培養条件を考察すると、外植片には胚軸を用い、3 ppmのBAを添加したMS培地を用いることが有効と考えられた。

2. 培養過程における変異の発生

一般に突然変異は劣性形質として発生するものと考えられており、培養中に発生する変異についても劣性形質の可能性が高い。本研究の結果、培養当代では顕著な変異は観察されなかったため、培養中に発生する変異の有無の検討は劣性形質について行なった。すなわち、劣性形質の場合、変異は再分化した当代では表現型には現れず、自殖次代に同型接合して表現型に現れる。そのため、劣性の変異を検出するには再分化個体の自殖を行ない、次代の表現型を調査する必要がある。

ただし、本研究で供試したキャベツ品種“金春”はF₁品種であり、突然変異以外にも多くの劣性遺伝子が異型接合している可能性が高い。そのため、自殖次代に現れた形質が劣性の突然変異によるものか、基品種に由来存在していた遺伝子の分離によるものかが明らかではない。そこで突然変異と遺伝子の分離を区別するために、培養

系統の他に基品種およびその自殖系統を供試した。そして基品種の自殖系統には現れず、培養系統にのみ現れた形質を変異により発生したものと推定した。

本研究の結果、奇形葉の形成および不結球個体は、培養系統にのみ観察され基品種およびその自殖系統にはみられないことから、培養過程で発生した変異と推定した。一方、結球の遅れは、培養系統のみならず自殖系統にも発生したことから、基品種に由来から存在していた劣性遺伝子が、同型接合して表現型に現れた形質と推定した。

本研究では、奇形葉および不結球という2つの変異が観察されたが、その変異の発生率は20%前後で、一般に自然界で考えられている 10^{-5} ~ 10^{-8} の突然変異率と比較して非常に高い値であった。したがって、本研究で確立した培養系は変異の誘発に有効であり、他の生理形質に対する品種改良への利用の可能性が高いものと考えられる。

ただし、本研究で観察されたように、発生する変異の方向性については予想が困難であり、品種改良に利用するには多数個体を取り扱う必要がある。

さらに、現在行なわれている細胞選抜は再分化当代を対象にしている例が多いが、本研究で明らかなように劣性の突然変異も高率で発生していることから、選抜後代の形質調査が今後重要になるものと考えられた。

摘 要

組織培養中に発生する変異を品種改良に利用することを目的に、まずキャベツの組織培養法を検討し、培養過程における変異発生の有無を調査した。

キャベツ品種“金春”の実生の子葉、胚軸および根を外植片として種々の生長調節物質を濃度を変えて添加し

たMS培地に置床し、組織の形態変化を観察した。その結果、各組織ともカルス形成後に不定芽が形成され、特にBAの添加濃度を3ppmにすると多芽体が形成されることが明らかになった。

次に、変異発生の有無を明らかにするため、形成された多芽体由来の個体の自殖次代および、基品種とその自殖次代を栽培して形質を調査した。その結果、再分化次代では不結球個体および外葉の中肋部に小葉を形成する個体が発生し、培養過程における劣性変異の発生がうかがえた。

以上の結果から、本培養技術は育種のための変異の拡大に利用できるものと考えた。

引用文献

- 1) 後藤正夫 (1956) 農業および園芸, 31: 85-86
- 2) 原田 宏 (1983) 培養技術の利用, 作物育種の理論と方法 (村上寛一監修), 養賢堂 (東京), PP. 219-277
- 3) 五十嵐大造, 大林延夫 (1985) 神奈川園試研報., 32: 35-41
- 4) 五十嵐大造, 岡田益己 (1989) 神奈川園試研報., 38: 15-19
- 5) 佐藤隆徳 (1991) 第4章 野菜 3. アブラナ科野菜, 農林水産研究文献解題 (農林水産技術会議事務局編), 農林統計協会 (東京), PP. 395-413
- 6) Scott, T.K. and Briggs, W.R. (1960) Am. J. Bot., 47: 492
- 7) 陶山一雄, 大林延夫 (1982) 植物防疫, 36: 68-71
- 8) Thimman, T.V. and Sweeney, B.M. (1937) J. Gen. Physiol., 21: 123

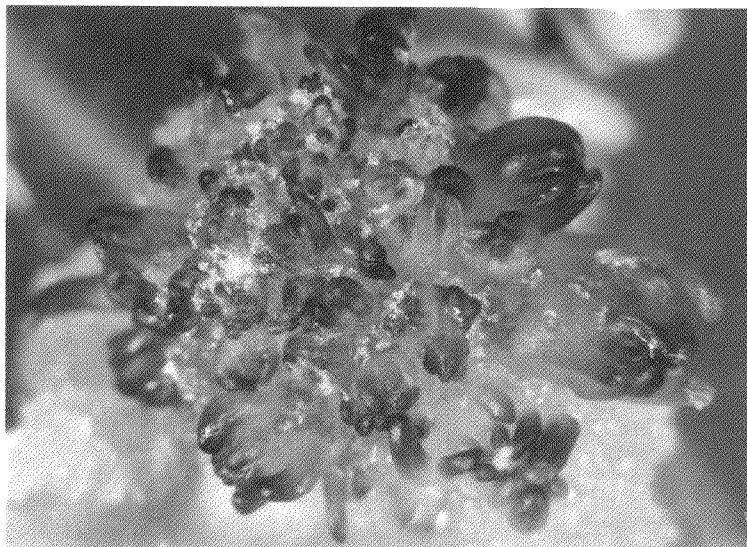
SUMMARY

As genetic variations of regenerated plants have been used in many breeding programs, so we tried to use this new technic for cabbage breeding. The objectives of this study were 1) to know the effects of plant growth regulators on multiple shoot formation and 2) to evaluate derived genetic variations of the regenerated plants.

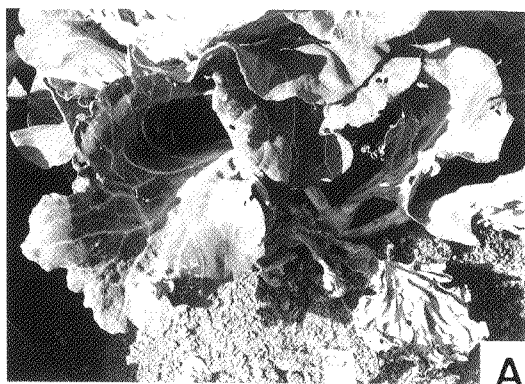
Many explants produced calli, adventitious buds, multiple buds and roots, using 7-day old cotyledons, hypocotyls and roots as explants and some combinations of NAA and BA in the regeneration media. The optimal condition for multiple bud formation was to use hypocotyl as explant and MS medium with 3ppm BA.

To evaluate genetic recessive variations, we cultivated selfed lines of regenerated and original plants in the field, and found two variations for leaf characters at a high rate,

The results indicate that we can use tissue culture for cabbage breeding.



第1図 キャベツの多芽体



第3図 培養系統の自殖次代における変異

A : 不結球個体 B : 奇形葉形成個体