

## 培養幼植物体レベルにおける特性検定及び選抜技術の開発

誌名	農業技術
ISSN	03888479
著者	江面, 浩 霞, 正一
巻/号	46巻7号
掲載ページ	p. 334-338
発行年月	1991年7月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター  
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council  
Secretariat



# 培養幼植物体レベルにおける特性検定及び選抜技術の開発

— 組織培養を利用したハクサイの軟腐病抵抗性個体作出の試み —

江面 浩 霞 正一

## 1. はじめに

ハクサイは茨城県の主要農産物の一つで、作付面積、生産額とも全国第1位である。そのほとんどは夏に播種し、秋冬に出荷するいわゆる秋冬ハクサイである。生産されたハクサイの出荷は10月から11月の一時期に集中して行われる。そのため市場では必ずしも有利な販売が行えていない状態である。また栽培的にも作業労力が一時期に集中し、労働過多の原因ともなっている。

これらを解決するには、出荷のピークをずらす栽培、すなわち、栽培時期を早めるか遅らせる必要がある。栽培時期を早めて、いわゆる夏ハクサイの時期の出荷とすることは茨城県地方では夏の高温のために軟腐病が発生し、栽培時期を遅らせて春ハクサイの時期の出荷とすると低温のために抽台が問題となる。地域バイオテクノロジー研究においては、夏ハクサイの栽培に適する品種を目指して軟腐病抵抗性の改良法について研究を行った。

従来、ハクサイの軟腐病抵抗性の改良は、軟腐病に対して抵抗性を有する系統から抵抗性形質を導入する方法により行われてきた。ハクサイ (*Brassica campestris*) のグループには十分な抵抗性を有する系統がなく、キャベツ (*B. oleracea*) などの近縁種からの抵抗性形質の導入が試みられてきた<sup>1)</sup>。ハクサイは、これら近縁種との間では通常の交配で種子を得ることが難しく、雑種未熟胚を培養する胚培養により雑種が作出されている。作出された雑種は、稔性を回復するために複2倍体化される。この雑種複2倍体は、軟腐病に対して抵抗性は示すものの、形態や特性が両者の中間的なものとなり、ハクサイとしての利用は困難である。

組織・細胞培養に関する研究が進展し、再生植物体のなかには様々な変異が高頻度に出現することが知られ<sup>2)</sup>、そのような変異の中には病害抵抗性など育種的

に有用な変異が含まれていることも明らかになった<sup>3)</sup>。そこで、このような変異を利用すれば病害抵抗性を有するほかは親植物と同じ形質を保った植物体が得られるのではないかと考えた。

本稿では、ハクサイの軟腐病抵抗性改良についての新しい育種的な試みとして、組織・細胞培養系を利用した抵抗性の改良について紹介する。研究は大きく次の2点に重点をおいて行った。すなわち、組織培養により高頻度に出現する変異を積極的に拡大する方法、及び拡大した変異の中から効率的に軟腐病抵抗性変異個体を選抜する方法を開発することである。

## 2. 遺伝的変異の拡大

組織・細胞培養により変異の拡大を図るため、(1)培地中の成分を変化させることによる変異の拡大、(2)胚培養を用いた変異の拡大、(3)γ線照射と培養技術を組み合わせた変異の拡大、の3つについて検討した。得られた変異を交雑育種に活用するという実用的な見地から、いずれの場合も処理後の再生植物体レベルで変異の検討を行い、各処理の変異拡大に対する効果を判断した。以下にそれぞれの概要と結果を紹介する。

### (1) 培地成分の操作による変異の拡大

ハクサイの培養系としては、子葉や胚軸を培養して不定芽を分化させ植物体を再生する不定芽培養系、薬を培養し胚様体を形成させる薬培養系、プロトプラストを培養してカルス経路で不定芽を分化させ植物体を再生するプロトプラスト培養系が報告されている。これらの中では不定芽培養系が比較的安定した培養系であるため、同法を基本的な培養系として利用した。

本研究で使用したハクサイの不定芽培養系は次の通りである。乾燥種子をMS培地に無菌播種し、3~4日後の実生の胚軸を2~3mmの大ききで切り出し、不定芽誘導培地(MS+NAA 1mg/l+BAP 1mg/l+グルコース30g/l+寒天8g/l)上で培養する。1週間後からカルスが誘導され、やがて不定芽が分化してくる。分化した不定芽はカルスから切離し、ホルモンフリー培地に移植すると発根する。培養は20℃の16時間照明下で行う。この培養系では、胚軸を切り出す時期が遅れ

Hiroshi EZURA and Masakazu KASUMI: Development of *in vitro* Techniques for Testing and Selecting Specific Using Cultured Plantlets. — Approach to Production of Resistant Plants to Bacterial Soft Rot in Chinese Cabbage by Tissue Culture. 農業技術 46(7), 1991.

るとカルスが誘導されるのみで、不定芽の分化率が低下する。

培地成分のうちMS培地の無機成分と糖の種類を変えて植物体を再生させ、変異の発生程度について検討した。その結果、本研究の範囲では検定に十分な個体の再生を行うことができず、再生植物体の変異拡大効果については明らかにならなかった。

(2) 胚培養による変異の拡大

胚培養は、交配を行い雑種胚が形成されるものの、発育初期に死滅してしまう植物間の雑種胚の救助のために行われる。本研究では、交配によって率は低い種子が形成されるハクサイ(♀)と軟腐病抵抗性素材 *Brassica sp.* (仮称C-5, 中国より導入した筍系統)の雑種胚の育成のために胚培養を用いた。この組合せの雑種のうち種子から育成した個体群と胚培養により育成した個体群を圃場に展開した。胚培養育成個体群は、種子から育成した個体群に比べて形態的に父本に類似する株の割合が多かった。また、軟腐病の発病程度も低くなった。このことは、稔性は低い交配可能な植物間の組合せについても胚培養を用いると、効率的な雑種の育成が可能ばかりでなく、父本に近い個体が得られる可能性が大きいことを示している。

(3)  $\gamma$ 線と不定芽培養系を組み合わせた変異の拡大<sup>4)</sup>

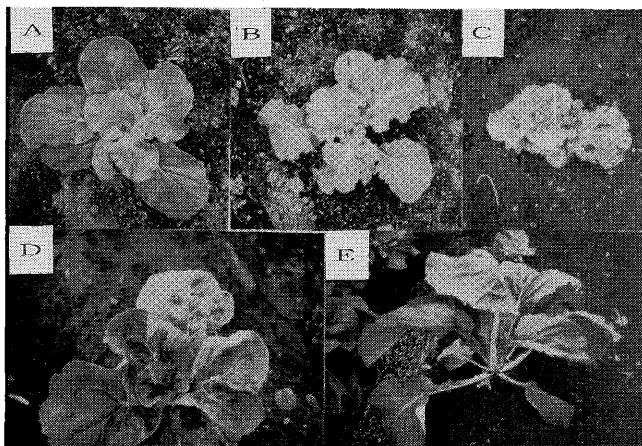
ハクサイの不定芽培養系への $\gamma$ 線照射時期としては乾燥種子の段階とカルス段階が考えられる(第1図)。カルス段階の照射は、カルス細胞が活発に増殖しており、放射線照射により高い変異出現が得られるのではないかと考えた。しかし、カルスへの照射は培養ビンに入れた状態で無菌的に行う必要があり、操作が煩雑であった。

また、照射後直ちに継代などの培養操作に移らな

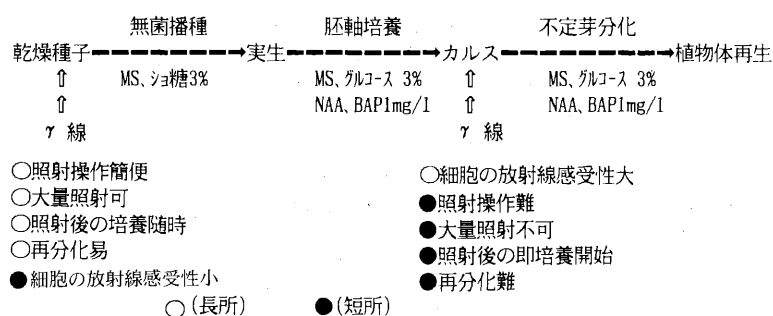
ればならないため、大量照射が困難となる。ハクサイのカルスは継代により培養期間が長期化すると再分化能力が急激に低下するので、 $\gamma$ 線により変異が拡大しても植物体への再生が極めて困難であり、ハクサイの場合、カルスへの照射は適切でなかった。

乾燥種子での照射は種子細胞の感受性が低く、変異を誘発するには高線量の $\gamma$ 線照射が必要であるが、照射操作が簡便、大量操作が可能、照射後の培養は照射種子の保存により随時行えるなどの利点がある。また、培養期間が短くなるのでカルスに照射した場合よりも再分化しやすい。このような点から、種子照射と不定芽培養の組合せによる変異拡大について検討した。

ハクサイの乾燥種子に10~200kRの $\gamma$ 線を照射したところ、100kR以上では本葉の展開率が低下したものの、すべての区で種子が発芽し子葉を展開した。従って、200kRまでのすべての区において培養する胚軸を得ることができた。各照射区の胚軸を培養した結果、



第2図 ハクサイの不定芽培養系によって出現した形態変異株  
A：正常株，B：ちりめん葉株，C：萎縮厚葉株  
D：葉緑キラム株，E：中肋幅が狭い株



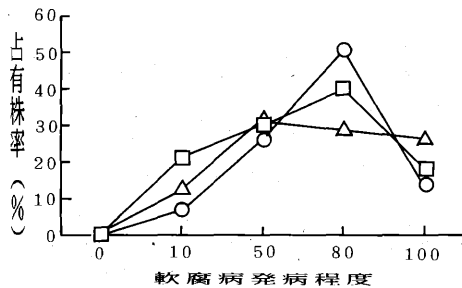
第1図 ハクサイの不定芽培養系と $\gamma$ 線照射を組み合わせた変異の拡大

カルス誘導と不定根分化に対する半減線量は約80kRであり、不定芽誘導に対する半減線量は約10kRであった。そこで、これらの試験区において多数の植物体を再生し、 $\gamma$ 線を照射していない種子から不定芽経由で再生した植物体と形態的変異を指標に変異率の変化を調査した(第2図)。 $\gamma$ 線未照射区では第2図-B, Cのような2種類の形態変異が出現したが、これらは形態的に正常なA

タイプに比べて葉が厚い傾向にあった。 $\gamma$ 線照射区ではB、Cタイプに加えて新たにD、Eタイプの変異個体が出現した。量的にみれば $\gamma$ 線照射区では正常なAタイプが未照射区の57%に対し26%に減少し、変異個体のBタイプが28から39%、Cタイプが15から39%に増加した。すなわち、不定芽培養系に $\gamma$ 線種子照射を組み合わせるにより、再生植物体における変異を量的にも質的にも拡大することができた。

#### (4) $\gamma$ 線により変異拡大処理を行った培養系で再生した植物体の軟腐病圃場抵抗性

ハクサイ(野崎2号)の $\gamma$ 線未照射種子の胚軸を培養し再生した培養当代( $R_0$ )の植物体、 $\gamma$ 線10kR照射種子の胚軸を培養し再生した培養当代( $R_0$ )の植物体及び野崎2号の実生育成株を軟腐病圃場で栽培し、軟腐病の発病程度を調査した(第3図)。実生育成株の個体群では、発病程度80を示す個体の割合が最大となった。



第3図 ハクサイ不定芽由来植物の $R_0$ 世代での軟腐病圃場発病程度

○: 実生(野崎2号)育成株, △: ガンマー線未照射種子不定芽由来植物体, □: ガンマー線照射種子不定芽由来植物体

不定芽由来の植物群においても発病程度80を示す個体の割合が最大となったが、その割合は実生育成個体群に比べて低下し、発病程度の少ない個体の割合が増加した。その傾向は、 $\gamma$ 線照射種子胚軸から再生した植物体群において顕著であった。従って、培養前のハクサイ乾燥種子に $\gamma$ 線を照射することにより再生植物体のレベルで軟腐病抵抗性に関する変異が拡大する可能性があるものと考えられた。これは、 $\gamma$ 線照射で葉が厚くなる変異個体が増加することに関連しているとも考えられるので、今後、形態変異と軟腐病発病程度についても検討を行いたい。

### 3. 変異個体選抜法

#### (1) 軟腐病に対する選抜ストレス

軟腐病に対する抵抗性個体を選抜するためのストレスとしては、病原菌そのものを利用する方法と病原菌

が培養液中に分泌する物質を利用する方法が考えられる。後者の方法では病原菌を培養したろ液がしばしば用いられている。

#### 1) 軟腐病菌を用いる方法

圃場での栽培試験の結果、軟腐病に対して感受性を示す系統(ちりめん, 野崎2号など)と抵抗性を示す系統(平塚2号, 下山千歳など)のカルス及び試験管内で播種・育成した幼植物体に軟腐病菌を接種し、菌の形態変化や軟腐症状の変化を調査した。

カルスに軟腐病菌を接種した場合、感受性系統では接種10時間後から軟腐症状が始まり、一方、抵抗性品種ではこの時点で症状は認められず、34時間後から軟腐症状が始まった。すなわち、圃場での抵抗性の強弱とカルスでの軟腐症状発現の早晩が一致した。幼植物体に接種し、試験管内の発病程度を調査した場合も圃場での抵抗性の強弱と一致した。

病原菌により選抜したカルスや幼植物体を利用する場合、除菌を行う必要がある。そのため抗生物質を用いた除菌法を検討したが、いずれの場合も十分に除菌を行うことができなかった。従って、ハクサイの培養系では軟腐病菌を用いた選抜は困難であると考えられる。

#### 2) 軟腐病菌培養ろ液を用いる方法

軟腐病菌培養ろ液を選抜に用いる場合、培養ろ液がハクサイの細胞の増殖に対して抑制効果があるか否か、また、抑制効果があった場合、その原因が病原菌の増殖の結果、培養液中に分泌された何らかの物質に起因することを確認する必要がある。

そこで、軟腐病菌の培養に用いた農研培地及びその培養ろ液を添加した不定芽誘導培地に直径5mmのハクサイ(野崎2号)のカルスを置床し、不定芽培養系に対する影響を検討した。その結果、軟腐病菌の培養ろ液がカルスの生育やカルスからの不定芽分化に対して抑制効果があることが判明した。従って、以降の不定芽培養系における各段階での抵抗性植物体の選抜は、培養ろ液をストレスとした方法を用いた。

#### (2) ハクサイの不定芽培養系と選抜時期

ハクサイの不定芽培養系は、胚軸を起点としカルス誘導、カルスからの不定芽形成、不定芽からの幼植物体の育成及び幼植物体からの成体の育成という一連の段階で進行するが、胚軸から脱分化しカルスを形成する段階で細胞レベルの変異が拡大する。これらの変異は、不定芽として再分化する段階で一部は選抜されてしまうが、ハクサイでは高頻度の形態変異が再分化植物体に認められるように、植物体レベルへも伝達され

るようである。従って、変異の選抜を行う時期はカルス以降の段階となる。具体的には、脱分化したカルス段階、カルスからの不定芽誘導段階、不定芽から養成した試験管内の無菌植物の段階及び圃場で生育させた成体の段階が想定される。選抜時期の決定に際しては次のパラメーターを考慮した。

#### 1) 選抜効果の有効性

培養系を利用した選抜の場合、選抜された細胞や個体の形質が最終的な成体の段階の性質と必ずしも一致しない場合がある<sup>5)</sup>。このような可能性は選抜を培養系の後期で行えばかなり低く抑えることができる。

#### 2) 選抜に関わる労力とスペース

選抜を培養系の初期に行えば培養室の少ないスペースで少人数で多くの細胞・個体を対象として選抜を行うことが可能である。一方、選抜が培養系の後半になると大きな温室などの栽培施設や圃場及び栽培に関わる多くの労力が必要となる。通常、育種的な目的で選抜を行うためには1万株以上の集団を対象とする必要があるが、培養室を用いれば周年を通して少ないスペースで行うことが可能である。1万株のハクサイの軟腐病抵抗性を圃場で検定しようとする40 aの圃場と育苗に要するパイプハウスが必要となる。また、それらの作業を夏の一時期に集中的に行わなければならない。

#### 3) 植物体の再生

培養系を利用して初期の細胞やカルスの段階で選抜を行い、ストレスに対して抵抗性を示す細胞が選抜されると、次はその細胞・カルスから植物体を再生させる必要がある。培養系を利用した細胞選抜の場合、しばしばこの選抜細胞からの植物体再生の難しさが問題となる。選抜を培養過程の後半で行えばこの問題は生じない。

以上の観点から、ハクサイの軟腐病抵抗性個体の選抜適期を、各段階について検討した。

#### (3) カルス段階での選抜

選抜培地として、軟腐病菌培養ろ液80%を添加した不定芽誘導培地を用いた。選抜培地にハクサイのカルスを置床したところ、1次選抜で5.8%が生存し、旺盛に生育した。これらのカルスを分割し選抜を繰り返すと、3次選抜では74.2%のカルスが生存した。これは、選抜を進めるに従ってカルス塊中の培養ろ液抵抗性細胞の割合が増加したためと考えられる。このように選抜された培養ろ液抵抗性カルスを分割し、各種ホルモンを含む再分化培地に置床したが、不定根のみの分化

が認められ、不定芽の分化はまったく認められなかった。ハクサイはアブラナ科作物の中でも分化しにくく、一度不定芽を再分化させたカルスでも継代すると急激に分化能力を失うと言われている<sup>6)</sup>。先の結果から、培養ろ液抵抗性細胞の割合の多いカルスを選抜するには数回の選抜を繰り返す必要があるが、この段階の選抜ではカルスからの植物体再生能力が低下してしまうことが明らかとなった。従って、ハクサイでは長期継代カルスからの効率的な植物体再生系が確立されないかぎり、選抜カルスからの植物体再生が困難であり、カルス段階での選抜は適切でないと思われる。

#### (4) 不定芽形成段階での選抜

無菌植物の胚軸を直接培養ろ液80%を添加した不定芽誘導培地に置床したところ、ほとんどの胚軸は培養初期に切り口部分が僅かにカルス化した後、褐変・枯死した。しかし、一部のカルスからわずかに形成されたカルス部分から、不定芽が分化した。不定芽形成率は対照区の100分の1以下であった。選抜培地に添加する培養ろ液の割合が減少するに伴って不定芽形成率が向上する傾向にあり、このことから軟腐病培養ろ液が何らかの形で不定芽形成過程を抑制していることがわかる。従って、そのような条件下で分化した不定芽が軟腐病に対して抵抗性を有することが予想される。現在、このようにして選抜した個体の圃場における軟腐病抵抗性の検定を行っている。

#### (5) 幼植物段階での選抜

軟腐病に感受性の系統(野崎2号)と、抵抗性の系統(C-5)を交配して得た雑種胚及び雑種植物を軟腐病菌培養ろ液を添加したMS培地に置床したところ、本葉が2枚以上展開した生育の良好なグループ(供試個体数の3~6%)と本葉展開の不良なグループ(供試個体数の80~90%)に類別することができた<sup>7)</sup>。このグループを軟腐病発病圃場に展開したところ、前者の発病指数は後者のそれに比べて小さかった。この結果から、幼植物体段階で培養ろ液により軟腐病に対して圃場抵抗性を示す個体群の選抜が可能であると考えられた。今回検討した培養ろ液による幼植物体の選抜法は、交配により育成した個体の10分の1以下の個体を圃場に展開すればよいことになり、圃場での選抜集団の規模を縮小するうえで効果的な方法であるといえる。

#### (6) 成体での選抜

ハクサイ(野崎2号)の不定芽培養系によって再生した植物体(R<sub>0</sub>)の次代(R<sub>1</sub>)を圃場に展開したところ、軟腐病発病の少ない系統(GB-2)が発見された<sup>8)</sup>。この

圃場抵抗性系統の抵抗性形質の安定性と次代への遺伝を調べるために、同系統の自殖後代、野崎2号との雑種第1代の採種を行い、それらを圃場に展開した。系統GB-2の自殖後代及び雑種第1代の軟腐病発病指数は13及び20で、野崎2号の発病指数42に対して低い値を示した。このことにより圃場抵抗性形質が後代に遺伝することが示された。従って、成体で選抜を行えば後代において安定した抵抗性を示す個体の選抜が行えるものと考えられる。

#### 4. 問題点と今後の課題

(1) 他の作物においては、病原菌培養ろ液を用いた選抜で得られた抵抗性植物を圃場に展開した場合、対象病害に対して抵抗性を示さない場合がある。今回の研究では、ハクサイの軟腐病菌培養ろ液に対して抵抗性を示す雑種個体を幼植物段階で選抜し、それらの選抜個体が圃場においても抵抗性を示したことにより、本選抜法の有効性が明らかとなった。しかし、培養系を用いた有用変異個体の選抜では、病害抵抗性のみが変異した系統を選抜することが一つの目的である。そのため不定芽からの再生植物体で同様の検討を今後行う必要がある。

(2) 選抜をより効率的に行うには、培養の更に早い段階すなわち、不定芽形成段階以前における有効な選抜法を検討することも必要である。なお、不定芽形成段階で選抜した系統については、現在圃場において軟腐病に対する抵抗性の検定を進めており、この段階での選抜の有効性は最終的にはこの検定結果を待つことになる。

(3) 幼植物段階の選抜で得られた安定した軟腐病圃場抵抗性の系統は、抵抗性の他に自殖を行った場合の稔性が低く、全体に葉がちぢれるという特徴がある。軟腐病圃場抵抗性形質がこのような形態的变化に付随して起きた変異なのか、軟腐病菌の生育を生理的に抑制するものか、選抜方法をさらに改良する上からも抵抗性機構について解明を図る必要がある。

(4) ハクサイは *Brassica* 属の中でカルスからの再生が困難な種の代表である<sup>6)</sup>。本研究で用いた不定芽培養系も選抜処理を行わない場合でさえ、不定芽を分化する胚軸カルスは数%であった。従って、不定芽誘導

段階で選抜をかける際には、極めて多くの胚軸を供試する必要があり、当初の目的の一つであった労力的に効率的な選抜法の開発という点では不十分な結果に終わった。

最近、ハクサイの子葉を用いた効率的な不定芽誘導法が報告されており<sup>9)</sup>、この培養系を用いた選抜についても検討を加える必要がある。

また、すでに述べたとおりハクサイのカルスは継代によって再分化能力を速やかに失うため、カルス・細胞レベルでの選抜が困難であった。空間的な効率性を考えた場合、培養のより早い段階での選抜が必要であり、そのためには再分化能のあるカルス・細胞を長期間維持する方法の開発も必要となる。

(5) 培養ろ液選抜法の他の病害への応用として考えられるものに、ハクサイに対して大きな被害を与えている土壌病害の黄化病がある。黄化病は、*Verticillium* 菌によって引き起こされる病害である。他の作物では、培養ろ液を用いてこの *Verticillium* 菌による病害抵抗性個体が選抜されたという報告があり<sup>10)</sup>、ハクサイの黄化病についても本研究で得られた成果を応用してみたいと考えている。

#### 5. おわりに

本研究は、茨城県園芸試験場資源開発部の諸氏の協力と農業生物資源研究所細胞育種部並びに同所放射線育種場の各位の貴重な助言のもとに行われたものである。ここに深謝の意を表す。この中で得られた成果が、ハクサイの育種に携わる他の関係諸氏の参考となれば幸いである。  
(茨城県園芸試験場資源開発部)

#### 参考文献

- 1) 西ら. 1992. 園試報告. A1: 111-156.
- 2) Larkin, P.J. et al. 1981. Theor. Appl. Genet. 60: 197-214.
- 3) Chaleff, R.S. 1983. Science 219: 676-682.
- 4) 江面ら. 1990. 育種 40(別1): 32-33.
- 5) Behnke, M. 1980. Z. Pflanzenzuchtg. 85: 254-258.
- 6) Murata, M. et al. 1987. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 11: 11-123.
- 7) 霞ら. 1991. 園学雑 60(別1): 190-191.
- 8) 江面ら. 1991. 育種 41(別1): 106-107.
- 9) Hachey, J.E. et al. 1991. Plant Cell Rep. 9: 549-554.
- 10) Latwde-Dada, A.O. 1983. Plant Sci. Lett. 32: 205.