

# プロトプラスト培養及び薬培養による「はなっこりー」の 植物体再生と再分化個体後代系統の形質

誌名	山口県農業試験場研究報告 = Bulletin of the Yamaguchi Agricultural Experiment Station
ISSN	03889327
著者名	山本,雄慈 金子,和彦 岡藤,由美子
発行元	山口県農業試験場
巻/号	53号
掲載ページ	p. 35-40
発行年月	2002年3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



## プロトプラスト培養及び葯培養による「はなっこりー」の 植物体再生と再分化個体後代系統の形質

山本雄慈・金子和彦・岡藤由美子

Plant Regeneration from *in vitro* Cultured Plotoplasts and Anthers  
of 'Hanaccoli' (*Brassica rapa* L. × *B. oleracea* L.) and Characters  
in the Progeny Lines Derived from Regenerated Plants.

Yuji YAMAMOTO, Kazuhiko KANEKO and Yumiko OKAFUJI

**Abstract.** Plant regeneration from *in vitro* cultured plotoplasts and anthers of 'Hanaccoli' (*Brassica rapa* L. × *B. oleracea* L.) and characters in the progeny lines derived from regenerated plants were investigated.

The plotoplasts isolated from flower stem were cultured in agarose beeze. Small colonies were transferred onto callus formation medium, and then transferred onto regeneration medium. Adventitious bud differentiated on the callus grafted on a hypocotyl of bloccori seedling developed into shoot, which can be easily transplanted into soil.

Anthers from the bud as the petal/anther length ratio was 1/2 were cultured on B5 modified medium supplied with 0.1 mg/ℓ 2,4-D, 0.1mg/ℓ NAA formed embryo. Regeneration of embryo was induced by transferring embryo to MS medium supplied with 0.2mg/ℓ BA.

Although each P1 lines plants showed same type of morphological variations as primitive line, the level of variation was lower. Waxless plant was not observed in A1 lines plants but observed A2 line plants.

The yield of P2 and A2 lines exceeded that of primitive line. Lower frequency of morphological variation was also observed P2 and A2 lines compared to primitive line.

Higher yield lines were obtained by using plotoplast culture and anther culture.

### 緒 言

「はなっこりー」は食味の良さから消費者の支持を得て、山口県のオリジナル野菜として県内だけでなく、東京、大阪、広島、北九州等の県外市場へも出荷されるようになり、県内各地の産地も年々拡大している。

「はなっこりー」は種間雑種であるが、複2倍体化して固定されているはずである。しかし、現実には採種を続け、世代を重ねると個体間の変異が拡大して来るようであり、変異株の発生が問題となってきた。そこで、培養系を利用して「はなっこりー」の優良個体を選抜するため、プロトプラスト培養法及び葯培養法を検討した。また、再分化個体から選抜した系統およびその後代について変異株の発生状況並びに生産性を調査した。

### 材料及び方法

#### 1. プロトプラスト培養

材料として温室で栽培中の開花初期の花茎上層部の表皮組織を用いた。前処理はビタミンを1/4に減じたNN(1967)

培地<sup>10)</sup>に0.4Mシヨ糖、0.5mg/ℓ 2,4-D、0.5mg/ℓ NAA、1 mg/ℓ BAを加えた前処理液で12~16時間行った。プロトプラスト分離のため、前処理液に加える酵素の種類と濃度、処理時間等を変え、分離条件を検討した。プロトプラストの培養は初期培養ではB5培地に0.5mg/ℓ 2,4-D、0.5 mg/ℓ BA、0.4Mマニトール、1%シヨ糖、0.4%アガロースを添加し、アーガロースビーズ法で培養した。培養条件は培養開始後10日間25℃、暗黒、その後、光量子束密度 $7.5 \mu \text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 、11時間照明とした。カルス形成培地はMS無機塩にNNビタミン、0.1mg/ℓ 2,4-D、1 mg/ℓ BA、0.2Mマニトール、1%シヨ糖、0.25%アガロースを添加した培地を用いた。培養条件は25℃、光量子束密度 $15 \mu \text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 、11時間照明とした。再分化培地はMS無機塩にNNビタミン、2.0mg/ℓ BA、0.1mg/ℓ IAA、0.2Mマニトール、1%シヨ糖、0.75%アガロースを添加した培地を用いた。培養条件は25℃、光量子束密度 $15 \mu \text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 、16時間照明とした。発根培地はMS培地に0.2mg/ℓ NAA、0.2%ゲルライトを添加した

培地を用いた。培養条件は再分化培地と同様とした。また、カルスから分化した不定芽(生長点+葉原基1~2枚)を無菌播種したブロッコリーの胚軸を用いてマイクログラフトイングを行い、3%シュウクロース、0.2%ゲルライトを添加したMS培地で培養した。培養条件は再分化培地と同様とした。

## 2. 薬培養

開花前の花蕾から生育ステージの異なる薬を採取し、培養した。培地はB5培地<sup>4)</sup>のCaCl<sub>2</sub>を750mg/l、ショ糖濃度を10%に修正し、800mg/l グルタミン、100mg/l セリン、1mg/l 硝酸銀を添加した培地に0.8%アーガロースを添加した。ホルモンとして0.1mg/l 2,4-D、0.1mg/l NAAを添加した。直径5cmプラスチックシャーレに培地6mlを分注して用いた。

植物体の再生には、3%ショ糖、0.2%ゲルライトを添加したB5培地及び0.2mg/l BA、3%ショ糖、0.2%ゲルライトを添加したMS培地を用いた。発根培地には3%ショ糖、0.2%ゲルライトを添加した培地を用いた。培養条件は薬置床後2日間が35℃暗黒下、以後25℃、光量子束密度15  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 、16時間照明とした。

## 3. 培養系統の特性(1999年)

1998年に花茎のプロトプラストから再生した個体(P0)を順化後、ハウス内で栽培し、形質の優良な個体を選抜して自殖により種を得て系統(P1系統)とした。薬培養では1998年に得られた不定胚由来の半数体を順化し、腋芽をTween20を添加した0.1%コルヒチン水溶液に浸した綿球で3日間処理して染色体を倍加した(A0)。個体別に自殖種子を得て系統(A1系統)とした。採種はいずれも網付の温室内で個体ごとに袋かけして行った。

これらの系統を栽培して特性を評価した。1999年8月23日に136穴プラグトレイに播種し育苗後、9月14日に圃場に定植した。栽植密度は513株/a(畦幅130cm株間30cm2条植え)とし、元肥としてN 3.0、P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 3.0、K<sub>2</sub>O 3.0 (kg/a)を施用した。花茎を収穫し、収穫花茎数及び花茎重(いずれも長さ15cm以上の花茎)、形質の揃い、低温伸長性、食味等を調査した。収量は収穫始めから12月24日までの花茎長15cm以上の花茎を計測した。食味は花茎を2日間沸騰水で茹で、パネラーにより調査した。

## 4. 選抜系統の特性(2000年)

1999年に栽培した系統から変異株率、収量、食味等の形質を考慮し、プロトプラスト培養系統は1系統(No.4)を選

抜後、変異個体を除いて採種し、P2系統とした。薬培養系統は2系統(No.15, No.32)を選抜し温室に移植後、ミツバチを用いて自由に交配させ種子を得てA2系統とした。採種は系統毎に異なる網付温室を用いて行った。2000年にP2系統及びA2系統を栽培して変異株の発生状況を調査した。播種期、定植期、育苗方法、施肥、栽植密度等は1999年と同様とした。

## 結果及び考察

「はなっこりー」と同様なゲノム構成を有するハ克蘭は変異幅が広く、不揃いであることが報告されているが、高田ら<sup>12)</sup>はハ克蘭の改良を試み、結球、高稔性系統から「岐阜グリーン」を育成している。培養系を利用して「はなっこりー」の優良個体の選抜を行うため、まず、プロトプラスト培養法及び薬培養法を検討した。

プロトプラストの分離条件は前処理液に1%マセロザイムR-10、2%セルラーゼオノズカを加えた酵素液で28℃、暗黒、30rpmで5時間の振盪処理が収量、生存率ともに高かった(第1表)。「はなっこりー」花茎からのプロトプラストの収量は高くても $5.2 \times 10^5$ 個/gであり、広島菜( $7 \times 10^6$ 個/g)やナタネ( $2 \sim 2.8 \times 10^6$ 個/g)<sup>11)</sup>に比べ低かった。Hagaziら<sup>5)</sup>はアブラナ科植物の各種について子葉からのプロトプラスト分離と培養を検討しているがプロトプラストの収量は $1.04 \sim 2.65 \times 10^6$ 個/gにある。「はなっこりー」でも花茎に比べ、子葉を利用した方が収量が高く、再分化率も高いと考えられるが、子葉の展開時では、形質を知ることができない。このため変異の拡大を目的とする場合は子葉の利用も良いが、優良な形質の選抜の場合は花茎を利用せざるを得ない。

Table 1 Effect of enzyme combination on protoplast isolation.

Treatment <sup>z</sup> condition	Protoplast yield per fresh weight	Percent of survived protoplast
A	$5.2 \times 10^5$	80.1
B	$5.2 \times 10^5$	21.7
C	$4.0 \times 10^5$	88.1

<sup>z</sup>Incubation medium (Modified NN medium vitamins reduced to 1/4 amount, containing 0.4M Sucrose, 0.5mg/l 2,4-D, NAA 0.5mg/l and 1mg/l BA) plus A: Mycerozyme R10 (1%) and Cellulase Onozuka R-10 (2%), B: Mycerozyme R10 (1%) and Cellulase Onozuka RS (2%), C: Mycerozyme R10 (1%) and Cellulase Onozuka RS (2%).

The solution was shaken at the rate of 30 rpm at 28°C for 5 hr in the dark.

形成されたコロニーをカルス形成培地、次いで再分化培地に移すと不定芽が分化し、シュートとして生育した。しかし、発根培地でのシュートからの発根個体は少なく、水浸状となる個体も多かった(第2表)。このため、分化不定芽を用いてブロッコリー胚軸へのマイクログラフティングを行った。台木部分として用いる胚軸は播種後3~5日のものが不定芽の活着が優れ順化可能な苗条が効率良く得られた(第3表)。また、これらは発根培地で発根させた苗条に比べ順化時の活着も優れた(第2表)。このように正常に生育しない不定芽は播種後3~5日のブロッコリー胚軸上へのマイクログラフティングにより、効率的に順化可能な苗条とすることができると明らかになった。

薬培養では5月25日と10月7日置床の薬で不定胚が得られた(第1図)が、不定胚の形成率は4.5~2.3%と低かった(第4表、第5表)。これはヒロシマナの20~30%<sup>2)</sup>に比べると極めて低い値である。アブラナ科では薬培養に適した花粉の生育ステージは1核期前後とされる<sup>8)</sup>。「はなっこりー」の花粉の生育ステージは花弁長/葯長が1/4で花粉4分子期、1/2で1核期以降となり、1/3では4分子期と1核期のものが混在した(データ不掲載)。「はなっこりー」の場合、葯の生長と生育ステージから見て、1核期以前の小孢子からは不定胚は形成されないようである。

分化した不定胚をB5培地で培養すると異常な形に肥大し、次いで多くの2次胚が形成されたが、植物体は再生できなかった。他のアブラナ科で報告されているようにこれらの2次胚を0.2mg/l BAを含むMS培地で継代を繰り返すと植物体が再生された。次に得られたシュートを切り離しMSホルモンフリー培地に移すと発根が認められた。発根

Table 2 Effect of culture method on adventitious bud development and survival rate of plantlet after transplanting into soil.

Culture method	No. of adventitious shoots cultured	No. of shoots developed plantlets	No. of survived plantlets after transplanting into soil
Root-induced medium	107	25	25 (23.4%)
Micrografting	31	24	24 (77.4%)

Table 3 Effect of stock age on shoot development from grafted adventitious buds.

Stock age <sup>z</sup>	No. of shoot - tips grafted	No. of shoot - tips development into shoots	
3~5	31	24	Adventitious buds were formed on the cut distal end of stocks
9	12	3	
14	12	3	

<sup>z</sup>Days after seeding of buroccoli used as a stock.



Fig. 1 Anther-derived embryo.

した苗条を順化し形態を調査したところ、ほとんどの個体が雄ずいがない不完全で花粉の無い花を着け、半数体と推定された。これらの個体の頂芽及び腋芽をコルヒチン処理することにより、正常な花を着け2倍体と推定される分枝が得られた。

Table 4 Effect of anther development stage on embryo formation<sup>z</sup>.

Development stage (petal/anther length ratio)	No. of anthers inoculated	No. of anthers formed callus	No. of anthers formed embryo	No. of embryo formed
1/2	220	73 (33.2%)	10 (4.5%)	22
1/3	396	155 (39.1%)	0	0
1/4	189	110 (58.2%)	0	0

<sup>z</sup>Innoculated 25th May.

「はなっこりー」は種間雑種であり、AACCゲノムを有する複2倍体で分類学上、既存の*B.napus L*に相当する。複2倍体として固定されているはずであるが、現実には採種を続け、世代を重ねると個体間の変異が拡大して来るようである。選抜系統の特性についてプロトプラスト培養系統は既存系統と同様の形態の変異が見られたが、変異株の発生率では既存系統に比べかなり低い系統が認められた(第6表)。このことはプロトプラスト培養によっても優良系統が育成される可能性を示している。

薬培養由来の染色体倍加個体は個体により稔実に差があった。第6表に示すように薬培養系統では系統により花蕾色が薄い系統と濃い系統が見られた。また、系統により花茎に苦みがある系統が見られたが、既存系統、プロトプラスト培養系統に比べ、変異株の発生が少なくなった。しかし、染色体倍加によって固定されているはずの薬培養系統においてもすでにA1世代においてワックスレス(葉にワックスの無い個体)を除く変異が認められた。この変異株率は0~11.1%まで系統により差があった。薬培養系統のワックスレスについてはA1系統までは認められないが、次の世代であるA2系統になると観察されるようになった。ワックスレスは劣性遺伝であるとされ<sup>6)</sup>、生食用のなばな(*B.napus L*)でも認められる。これらを分離して「はるの輝き」、「みえ緑水2号」などのワックスレス品種が育成されている。第7表に示すように既存系統では花蕾が集合せず、商品性のない花茎を形成する個体が多いが最終的に選抜した系統では、特に薬培養系統においてこのような個体が少なくなった。

Table 5 Effect of anther development stage on embryo formation<sup>z</sup>

Development stage (petal/anther length ratio)	No. of anthers inoculated	No. of anthers formed embryo	No. of embryo formed
1/2	216	5 (2.3%)	6
1/3	209	0	0
1/4	79	0	0

<sup>z</sup> Inoculated 7 th October.

Table 6 Productivity and morphological variation of P1 and A1 lines.

Line <sup>z</sup>	Beginning dates of harvest	Axillary shoot yield per plant		Bud <sup>y</sup> color	Abnormal Plant (%)	Bitterness <sup>x</sup>
		Number	Weight (g)			
1	10.29	5.0	84.4	+	7.5	-
2	11.2	6.8	96.2	+	5.0	-
3	11.2	6.5	104.5	+	5.4	-
4	10.29	7.0	100.7	+	23.0	-
5	11.2	4.2	74.2	+	17.5	-
6	10.29	11.3	153.7	+	0	+
7	10.28	9.4	69.3	-	0	±
8	10.25	13.3	106.5	-	5.4	
9	10.28	12.2	99.4	-	0	
10	10.25	13.6	109.2	-	3.2	
11	11.6	8.8	92.0		0	
12	10.25	11.8	97.0	-	0	+
13	10.25	11.7	98.6		0	-
14	10.28	11.3	101.8		0	-
15	10.28	10.3	106.4	+	7.7	-
16	10.29	9.2	100.8		11.1	+
17	11.6	6.2	83.8		0	
18	10.28	10.7	112.8	+	10.7	±
19	10.29	13.0	130.1	+	5.0	+
20	10.29	10.4	73.2	-	0	
21	10.28	11.2	83.9	-	5.3	
22	10.28	10.4	86.5	-	0	
23	11.1	13.3	113.3	-	0	
24	11.9	10.3	63.7		0	
25	10.25	10.2	85.4	-	0	
26	10.25	14.3	112.1	-	0	-
27	10.25	10.4	82.2	-	0	
28	10.29	10.6	105.8	+	0	±
29	10.28	12.0	123.2	+	2.9	+
30	11.6	14.0	157.3		0	
31	11.2	10.9	144.2	+	0	+
32	10.29	9.8	101.6	+	0	-
cont.	10.29	8.0	91.2	+	28.0	-

<sup>z</sup> No.1~5 : P1 lines, No.6~32 : A1 lines.

<sup>y</sup> + : Dark green, - : Light green.

<sup>x</sup> + : Bitter, ± : Slightly bitter, - : Not bitter.

P2系統及びA2系統の変異株率は既存系統>プロトプラスト培養系統>薬培養系統の順に低くなった。合成ナスでは減数分裂時における同祖染色体の異親対合の結果、染色体が脱落したり添加された受精能力のある異数的配偶子が形成され、後代植物で多くの異数体の出現が観察されている<sup>12)</sup>。「はなっこりー」の形態的な変異の原因が染色体数の変異によるのか遺伝子の変異によるものか今後明らかにしていく必要がある。種間雑種の形質の安定と改良を進めるためには雑種後代における染色体の行動や構成を明らかにする等の染色体レベルの研究が必要である。最近、

可視化技術の進歩により、異なる染色体あるいは異なるゲノムに属する染色体を塗り分けることが可能となった<sup>3)</sup>。GISH法により、シャロットの染色体を添加したネギの monosomic line の添加染色体の同定<sup>9)</sup>や、ナス科の体細胞雑種における染色体構成の分析<sup>7)</sup>が行われている。「はなっこりー」の染色体の挙動や構成をとらえるため、この技術が利用できると考えられる。

収量については第8表に示すようにプロトプラスト培養、薬培養から選抜した系統は既存系統より高い結果が得られた。

以上のように形質の揃い及び収量について培養系統の選抜により改善が認められ、系統の栽培の結果から、薬培養系統、プロトプラスト培養系統各1系統を選抜することができた。選抜系統は現在のところ、既存系統に比べて変異株の発生が少ない。しかし、過去に優良株からの系統で逆に変異が大きくなる場合もあり、また、自家不和性の問題も考慮する必要があることから当面、変異株を除きながら集団として維持していく方法を考えている。

### 摘 要

培養系を利用して「はなっこりー」の改良を進めるため、プロトプラスト培養法及び薬培養法を確立した。また、再分化個体から選抜した系統およびその後代について変異株の発生状況並びに生産性を調査した。

1. 開花初期の花茎上層部の表皮組織を用い、アーガロースビーズ法で培養し得られたコロニーをカルス形成培地、次いで再分化培地に移し、分化した不定芽をプロッコリーの胚軸上にマイクログロフティングすることにより順化可能な苗条が得られた。

Table 7 Morphological variation of A2 and P2 lines.

Lines	Normal plant (%)	Abnormal plant (%)		
		Wax less	Abnormal bud	Others
Primitive line	70.2	8.3	13.5	8.0
Developed A2 line	93.3	2.0	1.7	3.0
Developed P2 line	87.8	4.5	6.2	1.5

Table 8 Axillary shoot yield of P2 and A2 lines.

Harvested month	A2 line		P2 line		Primitive line	
	Number	Weight (g)	Number	Weight (g)	Number	Weight (g)
October	0.9	12.5	1.0	14.7	0.7	9.5
November	11.1	107.5	10.3	119.4	8.0	103.4
December	7.6	48.4	6.7	52.6	5.2	46.9
Total	19.6	168.4	17.9	186.7	13.9	159.8

2. 花卉長/薬長が1/2の時期の薬を生長調節物質を添加した修正B5培地で培養することにより不定胚が得られた。不定胚から再生した苗条を順化し、コルヒチン処理することにより染色体を倍加した。
3. プロトプラスト培養系統は種子繁殖の既存系統と同様の形態的変異が認められたが発生率は低かった。
4. 薬培養系統は既存系統、プロトプラスト培養系統に比べ変異個体が少なく揃いが良かった。ワックスレス個体は培養後、A1系統までは見られなかったがA2系統には認められるようになった。
5. 系統の特性から、花蕾色、花茎の伸長、変異株率、食味、収量等を考慮してプロトプラスト培養系統及び薬培養系統からそれぞれ1系統を最終的に選抜した。選抜系統の栽培試験の結果、収量、品質ともに既存系統より優れることを確認した。

### 引用文献

- 1) 長久 逸・井本征史. 1993. ヒロシマナ花茎プロトプラストからの植物体再生. 広島農技セ研報. 57:45-54.
- 2) 長久 逸・平尾 晃・井本征史. 1995. ヒロシマナの薬培養における不定胚形成及び植物体再生. 広島農技セ研報. 62:67-76.
- 3) 福井希一. 2000. 可視化技術の最近の動向. 化学と生物38(3):182-188.
- 4) Gamborg, O.L., R.A. Miller and K. Ojima. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell. Res. 50:151-158.
- 5) Hagazi, H., Hegazi and Sachiko Matsubara. 1992.

- Callus Formation and Plant Regeneration from Protoplast Derived from Cotyledons and Hypocotyls of Radish (*Raphanus sativus L.*) and Other Cruciferous Plants. J.Japan.Soc.Hort.Sic.61 : 63-68.
- 6) 石田正彦・千葉一美・奥山善直・高畑義人・海妻矩彦・松田智明. 1996. ナバナ品種「はるの輝き」(*Brassica napus L.*)におけるワックスレス形質の遺伝様式とその形態観察. 育雑46. 別冊2 : 219.
- 7) 岩本 嗣. 1999. *Solanum integrifolium*と*S.sanitwongsei*の6倍体細胞雑種の染色体数構成と形態特性について. 育種学研究1(別1) : 221.
- 8) 釘貫靖久. アブラナ科花菜類の品種と育種. 平成4年度野菜課題別研究会資料 : 43-51.
- 9) Masayoshi Shigyo, Kenzi Imamura, Mitsuyasu Iino, Kenichiro Yamashita and Yosuke Tashiro. 1998. Identification of chromosomes in a series of *Allium fistulosum-A.cepa* monosomic addition lines by means of genomic *in situ* hybridization. 1998. Genes Genet. Syst.73 : 311-315.
- 10) Nitsch, C. and J.P.Nitsch. 1967. The induction of flowering *in vitro* stem segment of *Plamhago indica L.* I .The production of vegetative buds. Planta 72: 355-370.
- 11) 皿嶋正雄. 1973. 飼料用創成ナブスの育成に関する研究. 宇都宮大学農学部学術報告特輯. 第29号.
- 12) 高田宗男・丸山靖志・国枝春巳. 1987. 人為複2倍体結球性新野菜ハクランの一代雑種品種育成と栽培技術確立の研究. 岐阜県農業総合研究センター研究報告1 : 1-185.