

## 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	柳野, 利哉 庭田, 英子
巻/号	46巻9号
掲載ページ	p. 431-434
発行年月	1991年9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

—組織培養によるニンニク、ナガイモの育種—

柳野利哉 庭田英子

青森県におけるニンニク、ナガイモの栽培は、昭和40年代後半から急増し、平成元年度の作付面積はニンニクが1,810ha、ナガイモが2,810ha(園芸作物統計)と、ともに全国一の産地を形成しており、計画出荷のできる高収益作物として、県産野菜の主力品目となっている。

ニンニクはりん片、ナガイモはイモ(担根体)やムカゴで繁殖される栄養繁殖性作物であり、どちらも栽培されているほとんどの系統は、通常の場合、種子が不稔である。このため、交雑によって積極的に育種を行うことができず、在来の系統がそのまま品種となっている。また、ウイルス病が問題となり、種苗の増殖率が低いこと等、両作物は分類学的には遠縁であるが、農学的な性格は似ている点が多い。

青森県畑作園芸試験場では、昭和51年度から茎頂培養によるニンニク、ナガイモのウイルスフリー株の作出に着手し、昭和58年度からは各農協に相当量を配布している。このようなウイルスフリー株の作出と配布が事業として軌道に乗ったため、さらに進んで、組織培養による新品種育成に取り組むこととなった。幸い、昭和61年度から平成2年度までの5年間、農林水産省の「地域バイオテクノロジー研究開発促進事業」に参画させていただき、培養系による変異拡大と選抜技術の開発について試験を行うことができた。ここでは、その中で得られた若干の成果について報告し、さらにこの手法をニンニク、ナガイモに適用した場合の利点と問題点について考察してみたい。

## 1. 培養系によるニンニクの変異拡大と選抜

青森県におけるニンニクの栽培品種のほとんどは、本県福地村の在来品種「福地ホワイト」であり、既存の品種の中ではりん片が白色で大きく、優れた特性を有しているが、今後の産地の維持、発展のためにはより良質、多収で耐病性を具備した品種の育成が望まれ

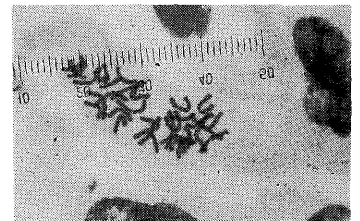
ている。組織培養により有用な変異の作出と選抜を行い、新品種を育成することを目指して試験を実施した。

### (1) 培養茎頂のコルヒチン処理による人為4倍体の育成

ニンニクの染色体数は $2n=16$ の2倍体であり、これまでのところ自然4倍体の存在は知られていない。人為4倍体の特性に興味を持たれるが、ニンニクの生長点は厚い貯蔵葉の内部に位置しており、植物体のままではコルヒチン処理を効率的に行うのは困難である。そこで組織培養を用いて、摘出した茎頂に直接コルヒチン処理を行った後、植物体を還元する方法により、「福地ホワイト」の人為4倍体の育成を試みた。

摘出した茎頂をコルヒチンを添加したLS培地で一定期間培養した後、コルヒチンを除いた培地に移植した。生長した個体を順化、鉢上げした後、根端を採取して染色体数を調査した。

茎頂を3~5日間LS培地で培養した後、0.1%のコルヒチンを添加した培地に移植して6日間処理を行った場合に染色体変異発生率が最も高く、70%の個体の根端で4倍性細胞が観察された(第1図)。しかしながら、処理当代では染色体変異個体のほとんどは、2倍性細胞と4倍性細胞が混在するキメラ個体であった。これらのキメラ個体に生じたりん片



第1図 ニンニク4倍体の染色体  
( $2n=4X=32$ )

(処理次代)の根端の染色体数を調査したところ、多くの個体は2倍体であり、4倍性細胞が競合により排除される傾向がうかがえたが、完全な4倍体も得られた。

4倍体の特性を調査したところ、2倍体に比べて生育が緩慢であり、収穫物ではりん片数の減少が著しかった。「福地ホワイト」の人為4倍体は実用性に欠けるものと思われるが、今後、他の品種の4倍体も育成してみる予定である。

Toshiya YANAGINO and Eiko NIWATA: Development of *in vitro* Techniques for Testing and Selecting Specific Character Using Cultured Plantlets. —Breeding by Tissue Culture in Garlic and Chinese Yam. 農業技術 46(9), 1991.

## (2) カルス培養による変異の拡大

カルスから再生した植物体には、しばしば遺伝的な変異が生じることが知られており、近年、こうした変異を育種に応用する試みが盛んである。カルス培養によってニンニクの優良な変異体を作成して新品種とすることを旨として、培養条件や変異発生について検討した。

「福地ホワイト」の茎頂を外植体として、LSまたはAZを基本として植物ホルモンを種々の濃度で添加した培地に置床し、カルスを誘導した。誘導されたカルスは直ちに、または一定期間の継代培養を経た後、オーキシン濃度を下げた再分化培地に移植した。再分化した茎葉はホルモンフリーの培地に移植して生長、発根を促し、鉢上げした。

0.2~2 mg/l の 2,4-D を添加した培地を用いることにより、高率に白色ないし黄白色のコンパクトなカルスが形成され、カルス誘導は容易であった。これらのカルスを 0~0.02 mg/l の NAA と 0.5~2 mg/l の BA を添加した培地に移植することにより、茎葉を再分化させることが可能であった。カルスの継代培養期間が長くなるにしたがって再分化率は低下したが、49週間継代培養を続けたカルスでも10~20%が再分化能力を保持していた。

鉢上げした再分化個体の染色体数を調査したところ、4倍体やキメラが存在したが、これらの染色体数変異個体の出現率とカルスの培養期間との間には明確な関係は認められなかった。変異個体においては、茎頂へのコルヒチン処理の場合とは異なり、再分化当代でも完全な4倍体と思われる個体が多く、キメラとみなされた個体もごく一部の細胞が2倍性だったに過ぎなかった。

可視的な変異体として、葉緑素突然変異と考えられる斑入りの個体が出現した。斑入り個体の出現率は培養期間が長くなるに従って顕著に増加し、49週間継代培養したカルスからの再分化個体では2割近くにも及んだ。量的形質の変異については、未だ通常のニンニクの大きさになっていない個体も多く、植え付けりん片重を揃えた栽培試験に至っていないので統計処理に足るデータが得られていないが、草姿から明らかに変異が認められる個体も散見されている。

このように、ニンニクについてもカルスから再生した植物体に変異が生じることが確認され、育種に応用できる可能性が示された。今後、現在までに作出した約450個体の再分化個体を育種素材として有用変異の

確認と選抜を行っていくつもりである。

## (3) 試験管内球形成における低温要求の品種間差

ニンニクは一定期間低温に遭遇した後、高温、長日条件下におかれると球肥大を開始する性質があるが、暖地系品種は低温要求量が小さく、寒地系品種は低温要求量が大きいことが知られている。低温要求性の変異体を選抜することにより、「福地ホワイト」の早生又は晩生系統を作成できれば、新しい作型の開発が可能になる。一方、培養個体の順化を容易にするために、培養中のニンニクに試験管内で球形成させる技術が提案されている<sup>1)</sup>。そこで、この試験管内球形成を利用して低温要求性の選抜を行う可能性について検討した。

低温要求量の大きい「福地ホワイト」、中程度の「加州早生」、小さい「沓州早生」「沖縄早生」の4品種の茎頂をLS培地に置床して生長させた後、5℃8Lで一定期間低温処理を行った。処理後は20℃12Lで15週間培養して球形成を調査した。

「沓州早生」「沖縄早生」は無処理区においてもほとんどの個体が試験管内で球形成し、「加州早生」は15週間、「福地ホワイト」は25週間低温処理することにより全個体が球形成した。すなわち、各品種の低温要求量の大小は試験管内球形成についても同様であることが示された。カルスからの再分化個体について、この方法により大ざっぱにでも選抜を加えることができれば、育種の効率化につながると考えられるが、植物ホルモンの影響等についてさらに検討が必要である。

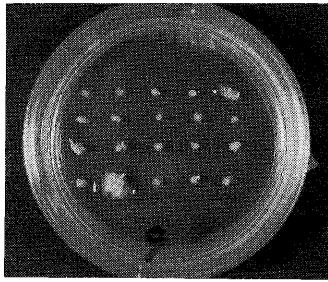
## (4) 紅色根腐病抵抗性の細胞選抜の試み

紅色根腐病は糸状菌 *Pyrenochaeta terrestris* による土壌病害で、ニンニクの根を紅変腐敗させ、青森県でも問題となっている。本病原菌からは Pyrenocine 及び Pyrenochaetic acid と呼ばれる毒素が単離されており<sup>2)</sup>、発病に深く関わっていると考えられている。このように発病に毒素が関わっている場合、細胞レベルでの選抜ができる可能性があるため、紅色根腐病抵抗性のカルスでの選抜について検討した。

紅色根腐病菌をトウモロコシ煎汁培地で培養した培養液を0~80%の濃度で添加した培地でニンニク「福地ホワイト」及びネギ「元蔵」のカルス小片を培養し、重量を測定した。植物体レベルで紅色根腐病に抵抗性を有するネギのカルスはニンニクのカルスに比べて生育阻害の程度が幾分か小さく、抵抗性がカルスレベルでも判定できる可能性が考えられた。

ろ液を95%含む培地に「福地ホワイト」のカルス小

片3,200個を置床して培養し、生育を示すものを選抜した(第2図)。選抜カルスを細片化して再び選抜を繰り返した後、再分化培地に移植し、茎葉を再分化させた。今後、再分化個体の抵抗性を汚染土壌により検定する予定である。



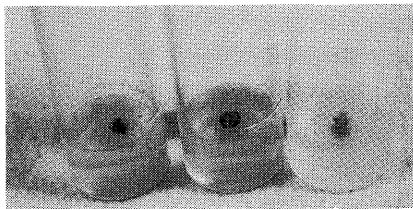
第2図 紅色根腐病菌培養ろ液添加培地によるニンニクカルスの選抜

## 2. 培養系によるナガイモの変異拡大と選抜

青森県で栽培されているナガイモの大部分は「がくくみじか」と呼ばれる県南地方の在来系統であるが、栽培が増加するに従って、連作に起因する土壤病害が被害を及ぼしてきている。種イモ及び土壌の消毒や輪作の励行が重要と考えられるが、栽培技術による対応には限界がある。そこで、組織培養により、土壤病害に抵抗性で、収量や品質の優れた新品種を育成することを目指して試験を行った。

### (1) 茎頂培養における変異誘発剤処理

ナガイモの茎頂培養では、置床された茎頂が一旦カルス状に肥大した後、茎葉が分化する(第3図)。この



第3図 ナガイモ肥大茎頂組織への化学変異源処理

肥大した茎頂組織に化学変異源を処理した後、植物体を復元することによって、変異体を作成すること

を試みた。

摘出した茎頂を0.2mg/lのNAAと2mg/lのBAを含むLS培地で2カ月間培養して径3~5mmに肥大した組織を供試し、化学変異源EMS及びMNNGの水溶液により処理を行った。処理後は同組成の新しい培地に置床して茎葉を分化させた。

EMS, MNNGのどちらも処理濃度や浸漬時間が増大するにつれて、培養物の退色が著しく、茎葉の分化率が低下した。茎葉の分化率から考えて、EMSの場合0.3~0.5%・時間、MNNGでは0.2~0.3%・時間

が適切な処理と考えられた。

再生した茎葉はホルモンフリーのLS培地に移植して発根させ、順化、鉢上げした。地上部及びイモの形状については環境による変動も大きいので、処理間の差は明確にはできなかったが、明らかに他と異なるものも出現している。今後、後代の特性を調査する予定である。

### (2) 根腐病抵抗性の選抜の試み

根腐病は糸状菌 *Rhizoctonia solani* による土壤病害で、ナガイモの褐変腐敗や奇形を招き、現在では被害面積500haを越える栽培上最大の問題となっている<sup>3)</sup>。本病害は、連作により病原菌密度が高まると発病が多くなることが知られており、クロロピクリン等による土壤消毒が有効であるが、栽培技術による対応には限界がある。根腐病抵抗性の検定方法を確立して、抵抗性を具備した変異体を選抜することを試みた。

根腐病の病徴発現に毒素が関わっているという報告はなく、本病害の抵抗性を細胞レベルで選抜できるという保証はない。実際、ナガイモの茎カルスを根腐病菌の培養ろ液を添加した培地や培養菌そう上で培養してみたが、抵抗性検定の可能性を示す結果は得られなかった。

植物体レベルでの抵抗性検定として、培養幼植物体やポット栽培したイモを根腐病菌の培養菌そう上にのせて接種する方法を検討した。培養菌叢の感染源ポテンシャルについて試験を行ったところ、1/256に希釈したPSA培地で根腐病菌を4~5日間培養した菌そう上に、培養幼植物体やポット栽培で得られたイモ(担根体)の切片を置いて25℃で1日放置した後、剝離して別のシャーレに取り、2~10日後に腐敗の程度を調査する方法が適当と考えられた。

さらに、ほ場レベルに近い検定方法として、汚染土壌を用いたポット栽培による方法を検討した。むかごを植え付ける場合、根腐病菌をふすま培地で25℃で2週間培養したもの5gを殺菌土100gに混和して、さらに2週間放置した後、殺菌土で64倍に希釈して用いるのが適当と判断された。

化学変異源処理した個体について、上記の方法により根腐病抵抗性の調査を行った。培養菌そうを用いた方法で培養当代148個体のイモ切片について調査したところ、組織のごく一部が褐変しただけで、軟化腐敗しないものが4個体認められた。現在、ポット栽培による方法や汚染ほ場での栽培により、遺伝的な変異か否かを検討中である。

### 3. ニンニク、ナガイモにおける培養系による変異拡大、選抜技術の利点と問題点

#### (1) 培養系による変異拡大

植物体に変異源処理を行う場合、生長点の始原細胞に作用させる必要があるが、組織培養を用いると、植物体の構造上薬剤の浸透が困難な作物でも、これを容易に行い得る。ニンニクのカルヒチン処理やナガイモのEMS, MNNG 処理においてはこうした利点が生かされたと言える。

栄養繁殖性作物では変異体がキメラとなる場合が多く、形質の固定上問題となるが、組織培養により突然変異セクターを拡大して、キメラの解消を図ることができる。ニンニクのカルス培養では染色体変異や葉緑素突然変異の出現において、キメラ性の軽減が示唆された。また、ナガイモの化学変異原処理においても、カルス状に肥大した組織を用いていることから、同様の効果が期待される。なお、ニンニクやナガイモの場合、既存の品種が既に周縁キメラとなっている可能性もあり、培養によってその構成が変化して変異が出現することもありうる。

栄養繁殖性作物の育種では、系統の選抜や増殖に先立ってウイルスを除くことが重要である。培養系を用いると茎頂培養ではもちろんのこと、他の部位を外植体とした場合でも、カルス培養によって変異拡大と同時にウイルスが除去されることが期待できる。在来系統の場合、ニンニクはGMV, GLV, ナガイモはCYN MVに感染していることが多いが、培養系を経たものでは病徴が認められなかった。

突然変異育種が成功するか否かは、選抜に供した個体数の多少にかかっていることが多いが、組織培養を変異拡大だけに用いるとすれば、無菌操作や順化作業の煩わしさは、この点、無視できない大きな問題点である。ニンニクのカルス培養では約450個体、ナガイモの化学変異原処理では約200個体を作成したが、これは通常の突然変異育種の規模からすれば、極めて少ない数と言わねばならない。今後、培養方法を改善して、より多くの個体を作成していくことが必要である。

#### (2) 培養系による選抜

培養系による選抜の利点が、良く制御された環境の

もとで、多数の細胞や個体を取り扱うことができることであることは言うまでもない。ニンニクの低温要求性、紅色根腐病抵抗性に関して、その可能性を示唆する結果が得られた。また、ナガイモについても、培養幼植物体に根腐病菌そう上で接種することにより、試験管内で選抜を行う方法を開発した。



第4図 根腐病菌そうによるナガイモへの接種

土壌病害に対する抵抗性検定をほ場レベルで行う場合、広い面積の汚染ほ場を必要とし、均一な発病状態の維持やほ場への伝染の防止に多くの労力を必要とする。こうした観点から、ニンニク紅色根腐病やナガイモ根腐病について、試験管内で大ざっぱにでも選抜を加えることができれば、その意義は大きい。

しかしながら、多くの指摘があるように、培養系とほ場レベルとの特性に高い相関があるということはむしろまれで、選抜が本当に有効かどうか疑わしい場合も少なくない。このことは細胞やカルスレベルでの選抜の場合、特に注意すべきことと思われる。ニンニク、ナガイモで得られた個体についても、今後、ほ場レベルでの詳細な試験を行い、選抜の有効性を検証していかなばならない。

5カ年の試験ではニンニク、ナガイモとも、育種素材の作出や手法の検討に終始し、品種育成には至らなかった。今後は残された問題点の解決を図り、実際の育種としての取り組みを進める必要がある。なお、ここで得られた知見は、細胞融合や遺伝子組換え等より進んだ技術をニンニク、ナガイモに適用する場合の基礎となり得ると考えている。

(青森県畑作園芸試験場畑作部)

#### 引用文献

- 1) 長久保有之, 長沢秋都, 村中俊哉, 大川秀郎: 1987 第10回 植物組織培養シンポジウム講演要旨集: 95
- 2) Sato, H., K. Konoma and S. Sakamura 1979 Agric. Biol. Chem. : 43(11), 2409~4211
- 3) 杉山 悟 1990 農業研究 : 37(2)24~28