

## アズキ上胚軸および上胚軸由来カルスからの植物体再分化

誌名	北海道立農業試験場集報
ISSN	04410807
巻/号	61
掲載ページ	p. 51-60
発行年月	1990年11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



# アズキ上胚軸および上胚軸由来カルスからの植物体再分化\*<sup>1</sup>

佐藤 毅\*<sup>2</sup> 安積 大治\*<sup>2</sup>

原田 竹雄\*<sup>3</sup> 松川 勲\*<sup>2</sup>

アズキの上胚軸を再分化培地で培養しカルスを経由せず直接植物体を再分化させることができた。この場合の BAP 濃度は 0.1 mg/l がよく、ベニダイナゴンの不定芽形成率は 92% であった。

さらに、上胚軸から誘導したカルスを再分化培地に移植して培養し、供試した全ての品種から不定芽が得られた。再分化培地の BAP 濃度は単独で用いる場合 1.0 mg/l が適当であり不定芽形成率はハツネショウズで 20% であった。また、0.05 mg/l NAA, 10.0 mg/l BAP の培地では不定芽形成率が高まり 36% であった。得られた不定芽は MS ホルモンフリー培地で生育させ、再分化植物体は温室で育成し採種した。ハツネショウズ再分化植物体由来の種子を再分化第 1 代として圃場で栽培したところ形態的な変異個体および百粒重が元品種よりも重い大粒個体が得られた。また、再分化第 2 代においてもある程度大粒性が維持された。

## 緒 言

アズキ (*Vigna angularis* OHWI & OHASHI) は北海道の主要畑作物の一つであり、1989 年の生産量は 82,300 t で全国の 77% を占めている。アズキの育種は北海道立十勝農業試験場を中心に行われており、1940 年頃までは、主として純系分離や品種比較により、1955 年以降は人工交配により、新品種が育成されてきた。今後は遺伝子工学を柱とする細胞工学育種法を積極的に利用し、育種の効率化を図ることが必要と考えられる。

近年、様々な作物で従来の交雑育種に加えて、細胞組織培養や遺伝子導入のバイオテクノロジーの手法が育種に利用されつつある<sup>4,10,16,19)</sup>。

アズキが属する *Vigna* 属 (主として *V. aconitifolia*) の組織培養はカルスからの植物体再分化 (Bhargava と Chandra<sup>3)</sup>, Godbole ら<sup>9)</sup>), 根

切片からの再分化 (Eapen と Gill<sup>5)</sup>), サスペンション細胞からの再分化 (Kumar ら<sup>14)</sup>) 等の報告例がある。また、プロトプラストの培養は植物体に再分化した報告 (Shekhawat ら<sup>23)</sup>, Krishnamurthy ら<sup>13)</sup>) や *V. unguiculata* 等のカルス形成 (Gill ら<sup>8)</sup>) の例がある。一方、アズキの組織培養は 1985 年、尾崎<sup>17)</sup> が初めて報告して以来、佐藤ら<sup>20)</sup>, 足立ら<sup>1)</sup>, の報告例がある程度で知見は少ない。また、プロトプラストからの植物体再分化は、Koulin Ge ら<sup>12)</sup>, および佐藤ら<sup>21)</sup> が報告しているがその効率はまだ低く培養系の改善が必要である。

本研究では、バイオテクノロジーを育種に利用するための基礎技術である細胞組織培養系を確立する目的で、効果的な培養条件を明らかにした。また、再分化植物体の後代の圃場における農業形質についても併せて検討した。

## 試験方法

### 1. 上胚軸からの直接植物体再分化

北海道の主要 15 品種 (表 1) を供試した。

上胚軸の調整は次のようにして行った。完熟種

1990 年 9 月 6 日受理

\*<sup>1</sup> 本報の一部は 1987 年度日本育種学会・作物学会北海道談話会で発表した。

\*<sup>2</sup> 北海道立中央農業試験場, 069-13 夕張郡長沼町。

\*<sup>3</sup> 同上 (現弘前大学農学部, 036 弘前市文京町)

子は70%エタノールに30秒浸漬し、アンチホルミン(有効塩素濃度1%)で15分間滅菌し、滅菌水で2度洗浄後発芽培地に置床した。発芽培地はMurashige and Skoog<sup>15)</sup>培地(以下MS培地と略す)に30 g/l シュクロース, 0.8%寒天を添加し、pH 5.8に調整したホルモンフリーを用いた。置床後7日目の約4~5 cmに伸長した上胚軸の中央部を長さ約10 mmに切り、上記培地に6-benzylamino-purine (BAP)を0.01, 0.1, 1.0, 10.0 mg/l添加した培地に置床した。また、カイネチンをBAPと同じ濃度添加した培地、および糖をシュクロース10, 20, 40, 80 g/l, グルコース20 g/l, に変えた培地(いずれもBAPは0.1 mg/l)で再分化の効率について検討した。再分化率(不定芽形成率, 不定根形成率, organogenic カルス形成率)の調査は上胚軸置床後1か月目に行った。

## 2. 上胚軸カルスからの植物体再分化

### 1) 材料とカルス誘導

6品種(表2)を供試した。前試験と同様に伸長させた上胚軸はMS培地に2 mg/l 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D)を添加したカルス誘導培地に置床した。形成されたカルスは上胚軸からそぎ取って同じ培地で1か月毎に継代した。

### 2) カルスからの再分化

継代6回目のカルスを材料とした。再分化培地はMS培地に、BAPを0.01, 0.1, 1.0, 10.0 mg/l添加した。ハツネシヨウズはBAPの濃度をさらに詳しく検討するため、0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0 mg/l添加した培地を用いた。継代は同じ培地で1か月毎に行いカルス置床後3か月で再分化率を調査した。ハツネシヨウズのカルスから形成した不定芽はホルモンフリー培地で生育、発根させた。植物体が7~8 cmに生育した時に1週間順化し、鉢上げして温室で生育させ採種した。

また、 $\alpha$ -naphthaleneacetic acid (NAA)とBAPを組み合わせた再分化培地(表4)についても検討した。

## 3. 再分化個体の圃場試験

1988年と1989年の2カ年実施した。

ハツネシヨウズの上胚軸カルス由来の再分化個体は、1988年は81個体、1989年は65個体得た。両年でそれぞれ262粒(このうち229粒供試)、216粒採種し、再分化第1代(R1)は中央農試圃場

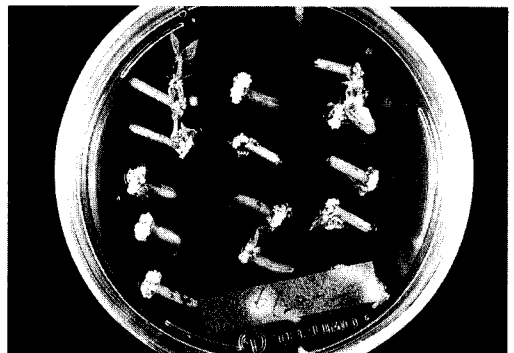
で栽培した。また、1989年は1988年のR1個体より採種した個体のうち百粒重の重い個体10個体を選抜しそれを再分化第2代(R2)系統として栽植した。

R1個体およびR2系統の栽植様式は畦幅60 cm, 株間10 cm, 1株1本立とした。その他は中央農試の耕種基準によった。R1は個体で調査し、R2は各系統内10個体任意に抽出し調査した。

## 結 果

### 1. 上胚軸からの直接植物体再分化

BAPを含む培地に直接置床した上胚軸は早い品種で培養2週間で不定芽形成がみられた(図版1)。カルスはBAP濃度が0.1, 1.0 mg/lの培地で切口付近に3~4 mm程度形成されたが低濃度(0.01 mg/l), 高濃度(10.0 mg/l)ではほとんど形成されなかった。供試品種中13品種においてBAP濃度0.1 mg/lの不定芽形成率が最も高かった(表1)。中でも、ベニダイナゴン、ハヤテシヨウズはそれぞれ92%, 80%で、他の品種の6~52%に比べて著しく高い値を示した。次いで不定芽形成率の高いBAP濃度は品種により異なるが0.01 mg/lまたは1.0 mg/lであった。BAP濃度が10.0 mg/lではほとんどの品種が不定芽を形成せず切片は褐変した。一切片あたり不定芽数は1.0~3.6個であるが品種およびBAP濃度による一定の傾向はみられなかった。不定根はいずれの品種もBAP低濃度(0.01 mg/l)で形成率が高かった。また、宝小豆、ハツネシヨウズなど一部の品種ではBAP高濃度(10.0 mg/l)でも不定根形成率が高かった。得られた不定芽はホルモンフリー培地に移植すると正常な植物体に生育した。



図版1 アズキ上胚軸からの直接植物体再分化

表1 上胚軸からの直接再分化における品種間差異

品種名	BAP濃度 (mg/l)	置床切片数 (個)	不定芽形成率 (%)	平均の不定芽数 (個)	不定根形成率 (%)
ベニダイナゴン	0.01	25	72	2.9	24
	0.1	25	92	3.2	0
	1.0	25	20	1.4	8
	10.0	25	0	0.0	0
ハヤテショウズ	0.01	50	62	2.2	24
	0.1	50	80	2.1	6
	1.0	50	22	1.8	0
	10.0	35	19	1.8	20
円葉1号	0.01	25	24	1.3	48
	0.1	25	52	2.4	0
	1.0	25	16	1.0	0
	10.0	25	0	0.0	0
宝小豆	0.01	25	8	1.0	40
	0.1	20	50	2.7	5
	1.0	20	20	1.3	0
	10.0	20	10	1.5	65
サホロショウズ	0.01	25	16	1.0	92
	0.1	25	48	1.8	4
	1.0	25	20	1.2	0
	10.0	25	0	0.0	4
栄小豆	0.01	25	4	1.0	100
	0.1	25	48	1.8	8
	1.0	25	32	1.3	0
	10.0	25	0	0.0	0
黄金大納言	0.01	25	36	1.2	4
	0.1	25	44	1.6	0
	1.0	25	36	1.6	0
	10.0	25	0	0.0	0
エリモショウズ	0.01	35	20	1.3	10
	0.1	50	44	2.6	4
	1.0	50	36	2.5	2
	10.0	50	2	3.6	20
カムイダイナゴン	0.01	25	12	1.3	72
	0.1	20	40	3.0	0
	1.0	25	44	1.4	0
	10.0	20	0	0.0	0
ハツネショウズ	0.01	35	46	1.3	45
	0.1	25	36	1.6	0
	1.0	50	14	1.2	0
	10.0	45	25	2.2	48
茶殻早生	0.01	25	8	1.0	76
	0.1	25	36	1.4	56
	1.0	25	36	1.7	4
	10.0	25	0	0.0	8
ホウカイシロショウズ	0.01	15	7	2.0	13
	0.1	15	33	1.0	7
	1.0	15	0	0.0	7
	10.0	15	0	0.0	0
早生大納言	0.01	25	4	1.0	40
	0.1	25	12	2.7	0
	1.0	25	0	0.0	0
	10.0	25	0	0.0	0
早生大粒1号	0.01	25	20	1.4	40
	0.1	25	24	1.8	0
	1.0	25	36	1.4	0
	10.0	25	0	0	0
アカネダイナゴン	0.01	20	6	1.3	40
	0.1	20	6	1.2	0
	1.0	20	0	0	0
	10.0	25	0	0	40

上胚軸置床後1か月で調査

BAPにかえてカイネチンを添加した培地(濃度はBAPと同じ)では不定芽はほとんど形成されず、2品種供試した実験でハツネショウズの1.0 mg/l, エリモショウズの10.0 mg/lでそれぞれ4%の形成率のみであった。不定根はカイネチン低濃度(0.01, 0.1 mg/l)で64~92%の形成率であり、高濃度では形成されなかった。

糖の濃度および種類が不定芽形成におよぼす影響をBAPを0.1 mg/l添加した培地で検討した。シュクロース20 g/lおよび40 g/lで不定芽形成率はハツネショウズがそれぞれ44%, 60%, エリモショウズがいずれも20%であり、両濃度間で大きな差は認められなかった。その他のシュクロース濃度では不定芽形成は著しく劣った。また、グルコースは両品種ともにシュクロースよりも不定芽形成率が劣った。

## 2. 上胚軸カルスからの植物体再分化

上胚軸の置床後2週間目頃から切口にカルスの形成が見られ、その後カルスは上胚軸全体を覆った。カルスの形状、大きさは品種間差異がほとんどなく白色の柔らかいカルスが形成された。

再分化培地に置床したカルスは2~3週間で褐変しはじめた。そのカルスの一部分にグリーンスポットが出現し、そこから不定芽が形成された(図版2)。また、カルスは1か月で直径が約2倍に成長した。再分化しないカルスはそのまま増殖するのみで、3か月後には全体が緑色あるいは白色を呈した。不定芽は供試した6品種全てにみられたが、その反応はBAP濃度で異なっていた(表2)。BAP濃度0.01 mg/lではいずれの品種も不定芽は形成されないが、1.0 mg/lで全品種に不定芽が形成された。BAP濃度1.0 mg/lのハツネショウズは形成率が20%で最も高く、次いでベニダイナ



図版2 アズキ上胚軸由来カルスからの植物体再分化

表2 小豆上胚軸カルスからの不定芽形成に及ぼすBAP濃度の影響

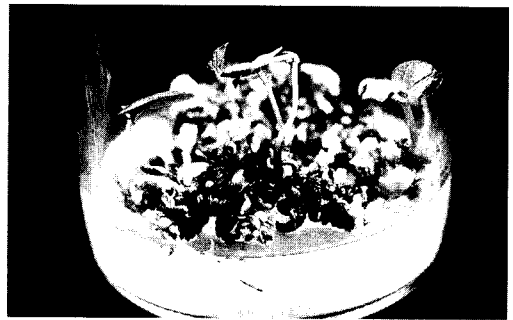
品種名	BAP濃度 (mg/l)	カルス数 (個)	不定芽 形成数 (個)	不定根 形成数 (個)	organogenic カルス数 (個)
エリモ ショウズ	0.01	20	0	8	0
	0.1	20	0	14	0
	1.0	20	1	11	1
	10.0	20	1	2	0
ハツネ ショウズ	0.01	20	0	3	0
	0.1	20	0	14	0
	1.0	20	4	13	0
	10.0	20	3	1	0
サホロ ショウズ	0.01	20	0	0	0
	0.1	20	1	3	1
	1.0	20	3	5	0
	10.0	20	2	6	2
ハヤテ ショウズ	0.01	15	0	12	0
	0.1	20	1	20	0
	1.0	25	2	23	2
	10.0	20	3	0	3
カムイ ダイナゴン	0.1	25	0	3	0
	1.0	20	2	3	4
	10.0	25	0	10	1
ベニダ イナゴン	0.1	20	0	9	4
	1.0	25	4	18	0
	10.0	25	0	8	0

培地置床数3か月で調査

ゴン, サホロショウズであった。

不定根形成はBAP低濃度(0.01 mg/l)および高濃度(10.0 mg/l)では劣り, 中間(0.1, 1.0 mg/l)で優る傾向にあるがサホロショウズ, カムイダイナゴンは高濃度でも不定根がやや多いなど一定の傾向は得られなかった。初めに不定根が形成されたカルスはその後不定芽は形成されず, またorganogenicカルスになることもなかった。

organogenicカルスは不定芽と同様にカルスの一部に形成され, その部分をかきとってホルモンフリー培地に移植するとそのままの形態で増殖が可能であった。増殖中に不定芽が形成されることがあり(図版3), 潜在的に再分化能を有する組織と考えられる。その形成率はBAP濃度が1.0, 10.0 mg/lで高い傾向にあり, 0.01 mg/lでは形成



図版3 Organogenicカルスからの植物体再分化

表3 ハツネショウズ上胚軸カルスからの再分化個体数および採種数

BAP濃度 (mg/l)	不定芽 形成数 (個) <sup>1)</sup>	再分化 植物体 (個) <sup>2)</sup>	再分化 植物体 (個) <sup>3)</sup>	収穫 個体数 (個)	種子数 (粒)
0.1	1	3	12	11	40
0.5	1	3	10	9	27
1.0	3	17	40	38	121
5.0	0	4	25	20	62
10.0	0	3	5	3	12
計	5	30	92	81	262

供試カルスは各濃度50個

1) 培地置床後2か月 2) 培地置床後4か月

3) 培地置床後10か月に鉢上げした個体数

されなかった。

ハツネショウズを材料に5段階のBAP濃度で再分化について検討したのが表3である。再分化培地に置床後2か月目の不定芽形成数は0.1, 0.5, 1.0 mg/lでそれぞれ1, 1, 3個と少ないが, 各培地で形成されるorganogenicカルスを継代することによって長期間にわたって再分化植物体を得ることができた。すなわち, 培養後4か月目にはBAP 0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0 mg/lのそれぞれから3, 3, 17, 4, 3個体, 計30個体, 同10か月目には92個体の再分化植物体を得られ, さらに, 継代を続けることによって再分化は可能であった。再分化培地のBAP濃度は本実験の範囲では1.0 mg/lが最も適していた。これらの再分化植物体は順化, 鉢上げし温室で栽培したところ鉢上げ後2~3か月で主茎長は15~20 cm, 主茎節数は6~7節で成熟期に達し, 個体当り莢数は1~2莢であった。枯死個体等を除いた81個体から262粒の種子を得た。

NAAとBAPを組み合わせた培地で上胚軸由

表4 上胚軸由来カルスからの不定芽形成に及ぼすホルモンバランスの影響

品種名	NAA (mg/l)	BAP (mg/l)	置床 カルス数 (個)	不定芽数 (個)	不定根数 (個)	organogenic カルス数 (個)
エリモ ショウズ	0.0	1.0	25	3	7	3
		10.0	20	4	0	0
	0.05	1.0	20	1	8	2
		10.0	25	7	1	7
ハツネ ショウズ	0.0	1.0	25	5	10	1
		10.0	25	3	0	0
	0.05	1.0	25	3	1	0
		10.0	25	9	0	1

培地置床後3か月で調査

来カルスからの不定芽形成率を比較したのが表4である。エリモショウズ、ハツネショウズの両品種とも0.5 mg/l NAA, 10.0 mg/l BAPを添加した培地で不定芽形成率が最も高く、それぞれ28%, 36%であった。また、同培地はorganogenicカルスの形成もよい傾向がみられた。

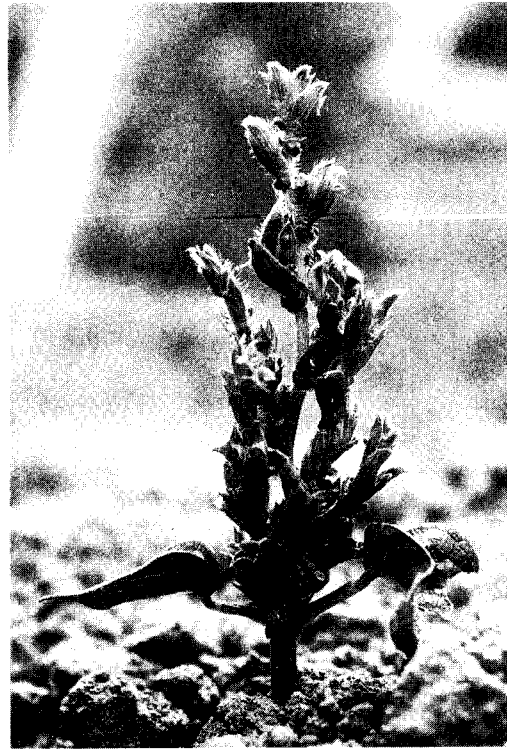
データは示していないがサイトカイニンとしてカイネチンを単独でBAPと同じ濃度で再分化を試みたが3か月後までには不定芽の形成はみられなかった。

再分化培地にカルスを置床してから不定芽形成までに3~4か月を要するのでその期間を短縮するため、アブシジン酸(ABA)を含む培地でカルスを前培養してから再分化培地に置床した。ABA濃度は0.1, 1.0 mg/lで前培養日数は1, 2, 4, 8, 10日とした。ABAで前培養した場合、しない区に比べ不定芽形成率が若干高くなり、また促進される傾向(0.1 mg/l ABA, 前培養1日)があったが、その程度は小さかった。

### 3. 再分化個体の圃場試験

#### 1) 1988年

R1個体の種子を圃場に播種したところ出芽率は著しく低く36.7%であった。この原因は種子の未熟、土壌の物理性不良、タネバエによる被害などが考えられる。出芽しても生育途中で枯死する個体も見られ、229粒播種したうち収穫できた個体は63個体であった。生育中の観察ではR1個体の生育量は比較品種のハツネショウズに比べ劣る傾向にあり、成熟期の主茎長は全体的にハツネショウズよりも短い、主茎節数は同程度であっ



図版4 再分化R1個体の形態的変異個体

た。R1個体の百粒重は、個体間で変異がみられ8.0gの小粒から17.7gの大粒個体まで得られた。なお、ハツネショウズの百粒重は9.3gであった。

また、形態的な変異個体が1個体得られた(図版4)。その特徴は主茎節間が1~2cmと短く、葉柄は0.5~1.0cm、本葉は退化して葉茸のみであり、開花はみられなかった。8月10日の主茎長は約10cm、この生育を促進するため圃場から温室に鉢上げしたが、主茎長は9月上旬で約15cm、それ以降の成長が望めなかったので主茎よりカルスを誘導した。そのカルスを再分化培地に置床したが、カルスからの不定芽形成は見られていない。

#### 2) 1989年

R1個体はペーパーポットで育苗したことにより出芽率は64.4%で、前年度に比べ向上したが未熟種子が混入していたことから出芽率は低かった。圃場に移植した139個体のうち活着したのは131個体で、稔実した個体は129個体であった。残りの2個体は他の個体より10日以上遅く開花はしたが不稔個体であった。収穫時の主茎長、主茎

節数、莢数の分布を図1, 2, 3に示した。主莖長は個体間で差がみられ、14 cmから37 cmまでに分布し、21~25 cm 個体が最も多く、全体の31.1%であった。主莖節数は10節から12節が全体の63.3%を占めた。莢数も個体間差がみられ、21~30 莢の個体が多く全体の37.2%であった。百粒重は11 g 前後の個体が多く、最も重い個体は16.2 gでハツネショウズより5 g程度重かった(図4)。

R 2系統の主な形質を表5に示した。出芽期、開花期はいずれもハツネショウズ並であった。成熟期は系統間で差がみられたが、ハツネショウズに比較してどの系統も遅かった。R 2系統の主莖長は系統間差異はあるがハツネショウズに比べ長く、主莖節数は多く、分枝数、莢数も多いなど、草姿が大型化し多収傾向を示した。百粒重はハツネショウズが11.3 gに比べR 2系統は11.4~13.6 gで

大粒傾向にあるが、前年R 1個体で大粒(17.7 g)であったH 2-2はその特性が維持されていなかった。

百粒重が最も重かったH 57-2とハツネショウズの粒度分布を図5に示した。分布の傾向は同じであるがH 57-2の方が大粒の割合が高かった。

### 考 察

組織培養は材料とする植物種、品種および部位によって再分化能および脱分化能が異なることが知られている。アズキの不定芽形成は上胚軸<sup>1,17,20)</sup>および初生葉<sup>16)</sup>からの報告がある。アズキはダイズやインゲンマメと異なり、下胚軸は伸長せず上胚軸のみが伸長する。この上胚軸は、種子を発芽培地に播種後5-7日で3-4 cm伸長するため培養材料の確保が容易でまた再分化能も高く培養する際の外植片として適当であった。

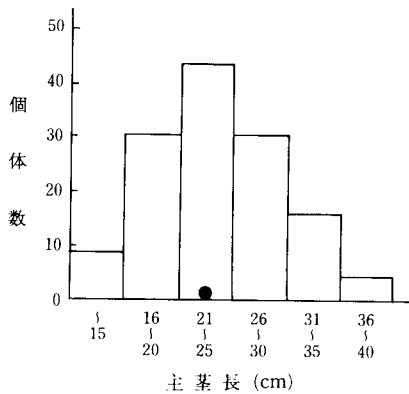


図1 再分化第1代の主莖長の分布(1989年) (n=131) ●ハツネショウズ

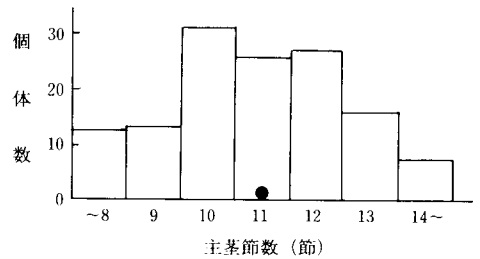


図2 再分化第1代の主莖節数の分布(1989年) (n=131)

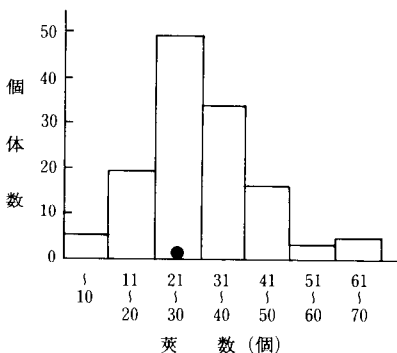


図3 再分化第1代の莢数の分布(1989年) (n=129)

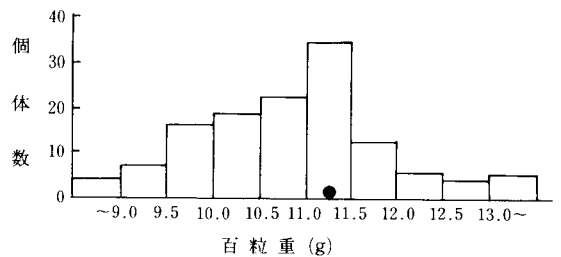


図4 再分化第1代の百粒重の分布(1989年) (n=129)

表5 再分化第2代の農業形質(1989年)

系統名	再分化第2代									再分化第1代
	出芽期 (月日)	開花期 (月日)	成熟期 (月日)	主茎長 (cm)	主茎節数 (節)	分枝数 (個)	莢数 (莢)	一莢内粒数 (個)	百粒重 (g)	百粒重 (g)
H2-2	6.11	7.26	10.5	25.3	11.0	1.6	24.6	5.2	12.7	17.7
H9-2	6.12	7.26	9.28	38.3	14.6	6.8	44.3	4.6	12.2	13.6
H9-3	6.11	7.26	9.30	34.7	13.6	5.1	27.8	4.6	13.0	13.6
H9-1	6.11	7.26	10.4	37.9	13.5	6.9	41.6	4.5	13.1	13.2
H20-1	6.12	7.25	10.5	36.2	13.5	5.0	25.7	5.9	... <sup>*1</sup>	13.0
H57-2	6.12	7.26	9.29	41.3	14.4	5.6	48.8	5.6	13.6	12.7
H2-4	6.13	7.26	9.28	36.7	13.6	3.7	29.9	5.5	11.4	12.7
H1	6.12	7.25	9.28	34.5	13.2	4.0	41.4	4.3	13.4	12.4
H29	6.12	7.25	9.27	31.9	12.0	1.6	32.5	5.6	11.9	12.4
H26	6.13	7.26	9.27	30.1	12.1	1.5	30.5	5.7	12.6	12.2
ハツネショウズ <sup>*2</sup>	6.12	7.26	9.26	30.5	12.0	0.6	22.8	6.1	11.3	9.3

\*1 事故により欠測

\*2 ハツネショウズは前年採種した種子を供試

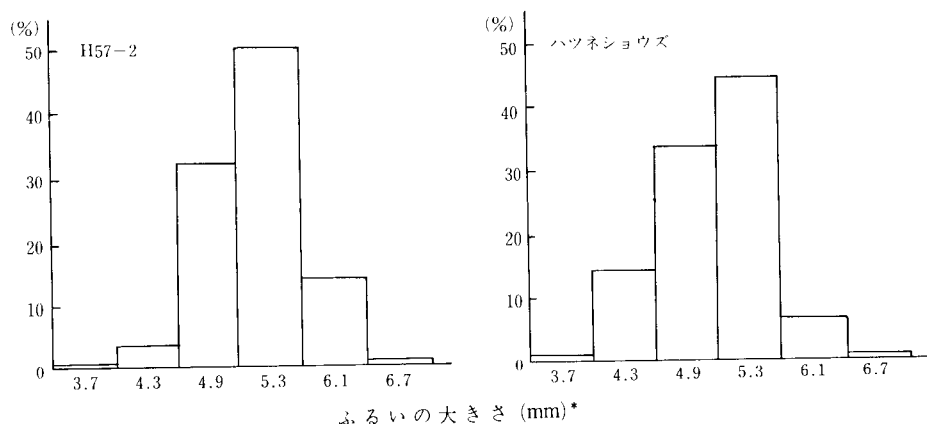


図5 再分化第2代とハツネショウズの粒度分布(1989年)

\* 数字の目の大きさに上についた粒の割合を示す。

今回の我々の実験ではアズキの上胚軸からいずれの品種もBAPを含む培地で1か月以内にカルスをほとんど形成することなしに直接再分化させることができた。そのときのBAP濃度は0.1 mg/lが最も適していた。足立<sup>17</sup>はエリモショウズを用いて上胚軸からの再分化を詳細に検討しBAP濃度は0.06 mg/lが最適であることを報告している。我々の実験結果もおおむねそれに一致するものである。尾崎<sup>17)</sup>の実験では品種によってBAPの最適濃度が異なり、茶殻早生では0.4mg/l、

暁大納言では0.2 mg/lであった。このことから、ある特定の品種を実験材料に用いる場合にはこのように再分化培地の組成など効率的な培養方法を詳細に検討する必要があるだろう。

上胚軸から再分化するとき、不定芽は切片の両側から形成されることなく、根側の切口からのみ形成され、極性が示された。

この系はカルスを経ることなしに直接植物体を再分化するため変異発生が少ないと考えられる。そのためF1の増殖やアグロバクテリウムを用い



る形質転換<sup>21)</sup>に利用し育種への応用が可能である。

我々は上胚軸から誘導したカルスを数回継代し、そのソフトなカルスから植物体を再分化させることができた。カルスからの植物体再分化はプロトプラスト培養系の確立およびストレスやトキシンを用いた細胞選抜の基礎技術として重要である。再分化培地の BAP の濃度としては上胚軸から直接再分化させる時とは異なり 1.0 mg/l が適当であった。一方、尾崎は 0.05 mg/l NAA+1.0 mg/l BAP, 0.1 mg/l NAA+2.0 mg/l BAP を含む培地等で形成された硬いコブ状のカルスを 0.2, 1.0 mg/l BAP を含む培地に移植したところ不定芽の形成が認められたことを報告している。我々の実験では NAA と BAP を組み合わせた再分化培地は BAP 単独に比べて不定芽形成率が高まる傾向が認められることから他のホルモン (インドール 3-酢酸, インドール 3-酪酸, ゼアチン等) の組み合わせについても再分化率を検討しなければならない。

さらに再分化するまでに 3~4 カ月を要するためこの点も併せて検討する必要がある。ABA による不定芽形成促進効果は多くの植物 (イネ, サツマイモ, パレイシヨ<sup>24)</sup>) で確認されているがアズキにおいては顕著な効果が見られなかった。また、カルスから不定芽を経由するのではなく、ダイズの未熟種子からの不定胚形成<sup>11)</sup>やエンドウのプロトプラストからの再分化<sup>6)</sup>の例のように不定胚から再分化が可能であれば再分化率が向上し、さらに再分化するまでの期間も短縮できるであろう。

organogenic なカルスはホルモンフリー培地で維持することができ、現在でも再分化能を有し継代する度に不定芽が再分化している。この組織はホルモンフリーの液体培地でも増殖することができ、その組織からも再分化した。このカルスからの再分化率を高め、期間を短期できるならば、非常に効果的な培養系となり得る。

1988 年の再分化個体後代の圃場試験において生育した 63 個体中、外観および子実調査で変異個体と考えられるのは 2 個体、変異発生率は 3.2% であった。Barwale ら<sup>2)</sup> はダイズ未熟子葉由来の再分化個体からのソマクローナル変異の生ずることを報告している。それによると、RO(再分化当

代)でアルビノの発生率が 1.14%, R1 では葉の形態異常や葉緑素欠損、不稔等の発生率がそれぞれ約 1% 程度であった。それらの特性は R2, R3 世代でも同様に発現し遺伝的に安定していた。また、江面<sup>7)</sup> はハクサイの種子に  $\gamma$  線を照射した後発芽種子の胚軸を培養して得られた個体の変異率が組織培養のみの変異率よりも高いことを報告している。アズキにおいてもカルス経路による培養系で変異個体の発生が認められることから、供試再分化個体数を増しその後代から選抜することによってより多く変異個体の獲得が期待できる。さらに、放射線などの変異原と前述の培養系を組み合わせた新しい技術を確立することが可能となる。

#### 引用文献

- 1) 足立大山, 喜久田嘉郎, 岡沢義三. "アズキ「エリモシヨウズ」の上胚軸カルスからの植物体再生". 北農. 57, 63-65 (1990).
- 2) Barwale, U.B.; Widholm, J.M. "Somaclonal variation in plants regenerated from cultures of soybean". Plant Cell Reports. 6, 365-368 (1987).
- 3) Bhargava, S.; Chandra, N. "In vitro differentiation in callus cultures of moth bean, *Vigna aconitifolia* (JACQ) Marechal". Plant Cell Reports. 2, 47-50 (1983).
- 4) De Buyser, J.; Henry, Y.; Lonnet, P.; Hertzog, R.; Hespel, A. "Florin: A doubled haploid wheat variety developed by the anther culture method". Plant Breed. 98, 53-56 (1987).
- 5) Eapen, S.; Gill, R. "Regeneration of plants from cultured root explants of mothbean (*Vigna aconitifolia* L.Jacq. Marechal)". Theor. Appl. Genet. 72, 384-387 (1986).
- 6) Lehming-Mertens, R.; Jacobsen, H.J. "Plant regeneration from pea protoplasts via somatic embryogenesis". Plant Cell Reports. 8, 379-382 (1989).
- 7) 江面 弘, 雨ヶ谷洋, 飯田修一. "ハクサイ培養前種子へのガンマ線照射の再分化個体に対する影響". 育種学雑誌. 40 (別冊 1), 32-33 (1990).
- 8) Gill, R.; Eapen, S.; Rao, P. S. "Callus induction from protoplasts of *V. unguiculata*, *V. sublobata* and *V. mungo*". Theor. Appl. Genet.

- 74,100-103(1987).
- 9) Godbole, D. A. ; Kunachgi, M. N. ; Potdar, U. A ; Krishnamurthy K. V. ; Mascarenhas A. F. "Studies on a drought resistant legume : The moth bean, *Vigna aconitifolia* (Jacq) Marechal, II. Morphogenetic studies". Plant Cell Reports. **3**,75-78(1984).
- 10) 伊藤隆二. "イネ新品種「初夢」の育成経過とその特性". BRAIN テクノニュース**14**,1-3 (1989).
- 11) Komatsuda, T. ; Ohyama, K. "Genotypes of high competence for somatic embryogenesis and plant regeneration in soybean (*Glycine max*)". Theor. Appl. Genet. **75**,695-700(1988).
- 12) Koulin Ge ; Wang, Y. ; Yuan, X. ; Huang, P. ; Yang, J. ; Nie, Z. ; Testa, D. ; Lee, N. "Plant regeneration from protoplasts isolated from mesophyll cells of Adzuki bean (*Phaseolous angularis*, Wight)". Plant Science. **63**,209-216(1989).
- 13) Krishnamurthy, K. V. ; Godbole, D. A. ; Mascarenhas, A. F. "Studies on a drought resistant legume ; The moth bean, *Vigna aconitifolia* (Jacq) marechal. I. Protoplast culture and organogenesis". Plant Cell Reports. **3**,30-32(1984).
- 14) Kumar, A. S. ; Gamborg, O. L. ; Nabors, M. W. "Plant regeneration from cell suspension cultures of *Vigna aconitifolia*". Plant Cell Reports. **7**,138-141(1988).
- 15) Murashige, T. ; Skoog, F. "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures". Physiol. Plant. **15**,473-497(1962).
- 16) Ohgawara, T. ; Kobayashi, S. ; Ohgawara, E. ; Uchimiya, H. ; Ishii, S. "Somatic hybrid plants obtained by protoplast fusion between *Citrus sinensis* and *Poncirus trifoliata*". Theor. Appl. Genet. **71**,1-4(1985).
- 17) 尾崎厚一. "アズキ上胚軸ならびに上胚軸カルスからの植物体の再生". 植物組織培養. **2**,59-62(1985).
- 18) Ozaki, K. "Plantlet formation from the calli of primary leaf of Azuki bean (*Vigna angularis*)". Japan. J. Breed. **36**,416-419(1986).
- 19) 佐々木一男, 新橋 登, 佐々木多喜雄, 相川宗蔵, 柳川忠男, 沼尾吉則. "水稲新品種「上育394号」の育成について" 北海道立農業試験場集報. **58**,13-23(1988).
- 20) 佐藤 毅, 安積大治, 松川 勲. "アズキ上胚軸カルスからの植物体再生". 育種作物学会北海道談話会. **28**,32(1988).
- 21) 佐藤 毅, 原田竹雄, 安積大治, 松川 勲. "アズキプロトプラストからの植物体再分化". 第11回植物組織培養学会大会. シンポジウム講演要旨集. 1989, p. 105.
- 22) 佐藤 毅, 松川 勲. "アグロバクテリウムによるトランスジェニック小豆の作出". 第2回植物組織培養コロキウム. 1990, 9. p. 124-125.
- 23) Shekhawat, N. S. ; Galston, A. W. "Isolation, culture, and regeneration of moth bean *Vigna aconitifolia* leaf protoplasts". Plant Science Letters. **32**,43-51(1983).
- 24) Shepard, J. F. "Abscisic acid-enhanced shoot initiation in protoplast-derived calli of potato". Plant Science Letters. **18**,327-333(1980).

# Plant Regeneration from Adzuki Bean Epicotyl and Callus Derived from Epicotyl

Takashi SATO\*<sup>1</sup>, Daiji ASAKA\*<sup>1</sup>,  
Takeo HARADA\*<sup>2</sup> and Isao MATSUKAWA\*<sup>1</sup>

## Summary

Regenerated plants were obtained directly from Adzuki bean epicotyl in a regeneration Murashige and Skoog's (MS) medium. The optimum concentration of BAP was 0.1 mg/l and high regeneration frequency (92%) was observed in cultivar, Bein-dainagon.

Adventitious shoots and regenerated plants were also obtained from callus which were derived from epicotyl of all cultures of Adzuki bean tested. When only BAP was used as cytokinin in the regeneration medium, the optimum concentration of BAP was 1.0 mg/l. Moreover, the regeneration frequency was increased by cultured containing 0.05 mg/l NAA and 10.0 mg/l BAP and 36% of frequency was obtained in Hatsune-shozu. The regenerated shoots were transferred to hormone free MS medium and roots from the shoots usually developed within one week. The regenerated plants were transferred into clay-pots containing soil and grown in a greenhouse. Two to three month later, the plants were mature and flowered and visibly normal seeds were harvested in Hatsune-shozu. When seeds obtained from Hatsune-shozu were cultivated in the field, a few of the plants showed morphological abnormality and many of plants were normal and harvested larger grain than the original cultivar. When these larger seeds selected were again cultivated as second generation, most of seeds obtained were maintained the character of larger grain of bean.

\*<sup>1</sup> Hokkaido Central Agricultural Experiment Station, Naganuma, Hokkaido, 069-13 Japan.

\*<sup>2</sup> Hirosaki University, Hirosaki, Aomori, 036 Japan.