

ヒロシマナの薬培養による不定胚形成及び植物体再生

長久 逸・平尾 晃・井本征史

キーワード：ヒロシマナ，薬培養，不定胚，半数体，植物体再生，*Brassica campestris*

ヒロシマナ (*Brassica campestris* ssp. *pekinensis* cv. 'Hiroshimana') は不結球ハクサイ類に分類される広島県特産のツケナである。主要な産地では、在来系統の自家採種による栽培が行われており、生育及び品質が揃っていない。また、連作等から根こぶ病が多発しており、生育及び品質が均一な F₁ 品種及び根こぶ病抵抗性品種の育成が望まれている。

薬培養や小孢子（未成熟花粉）培養による半数体植物を利用した半数体育種手法は、遺伝的にホモの個体を直接得ることができるため、F₁ 品種の交配親及び固定品種を育成するために必要な形質の固定の期間が短縮できる。

筆者らは、ヒロシマナの小孢子培養により、小孢子が直接的に不定胚形成し、不定胚から植物体に再生したことを報告した²⁾。しかし、小孢子からの不定胚形成の効率が低く、また、不定胚からの植物体再生に長期間を要した。

ヒロシマナが属する *B. campestris* の薬培養による不定胚形成については、Keller ら^{6,7)}、Yang ら¹⁸⁾、松本¹²⁾、Sato ら¹⁵⁾、鈴木ら¹⁶⁾等の報告があるが、*B. napus*（西洋ナタネ）や *B. oleracea*（キャベツの仲間）に比較して、研究報告は少なく、効率的な不定胚形成の研究が進んでいない。また、ツケナの薬培養による不定胚形成は、Sato ら¹⁵⁾のカモスグキナ、鈴木ら¹⁶⁾のオニコウベナについての報告があるが、不定胚形成効率が低い。

本研究では、ヒロシマナの半数体育種手法の確立を目的に、ヒロシマナの薬培養により、不定胚誘導及び不定胚からの植物体再生に成功し、効率的な植物体の作出を明らかにしたので報告する。

材料及び方法

1. 不定胚誘導

材料のヒロシマナは、井谷種苗の‘1号広島菜’、‘2号広島菜’、‘広島菜（川内産）’の3品種及び広島県立農業技術センターで保存している木原系、倉本系、田平系及び根石系の4系統を用いた。栽培は、本葉が1～2枚展開した苗を、4℃で4週間春化处理を行い、12cmポリポットに定植後、無加温のガラス室内で管理した。

花蕾の採取は、11月下旬から3月下旬に抽苔し始めた開花前の株の、主に主茎の花蕾を用いた。花蕾は、70%エタノールに数秒間浸漬後、次亜塩素酸ナトリウム溶液（塩素濃度1%，Tween 20 数滴添加）に15分間浸漬して表面殺菌を行い、滅菌水で3回洗浄した。

不定胚誘導の培地は、Gamborg らの培地³⁾（B5 培地）の $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ を750mg/ℓ，ショ糖濃度を10%に修正し，800mg/ℓグルタミン，100mg/ℓセリンを添加した修正 B5 培地⁷⁾に，0.8%アガロース（シグマ社製，タイプ I）を添加して用いた。植物ホルモンとして，0.1mg/ℓ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)，0.1mg/ℓ naphthaleneacetic acid (NAA) または1.0mg/ℓ 2,4-D，1.0mg/ℓ NAA を添加した。

薬の培養は、直径6cmのプラスチックシャーレに6～7mlの培地を分注した培地に、花卉長と薬長の比（P/A）が1/3～3/4の時期の、花糸を取り除いた10～15個の薬を置床した。培養条件は、33℃の1，2日間または35℃の1，2日間の暗黒下で前培養を行った後，25℃，暗黒下で培養した。不定胚形成については，培養1か月後に形成された不定胚数を調査した。

不定胚誘導の効率化を検討するため，‘1号広島菜’，‘2号広島菜’を用いて，培地に0.2mg/ℓ アスコルビン酸，1.0mg/ℓ 硝酸銀，1.0mg/ℓ aminoethoxyvinylglycine (AVG) を添加して，その効果を調べた。

2. 不定胚からの植物体再生

不定胚からの植物体再生は、'1号広島菜'、'2号広島菜'で誘導された魚雷型、ステック型、子葉期の不定胚

を、培養4週間後に再生培地に移植し、25°C、2,000lux、10時間照明下で培養して行った。再生培地は、直径9cmのプラスチックシャーレに、植物ホルモン無添加で、

Table 1 Effects of genotypes, preculture treatments and growth regulators on embryogenesis in anther culture of *Brassica campestris* ssp. *pekinensis* cv. 'Hiroshimana'.

Genotypes	Preculture treatments ^a		Growth regulators		No. of anthers cultured	Frequency of anthers producing embryo (%)	Expected no. of embryos from 1000 anthers
	Tem. ^b (°C)	Duration (Days)	2,4-D (mg/ℓ)	NAA (mg/ℓ)			
'Ichigou-Hiroshimana'	33	1	0.1	0.1	70	0	0
		1	1.0	1.0	70	0	0
		2	0.1	0.1	80	0	0
		2	1.0	1.0	80	0	0
	35	1	0.1	0.1	80	3.8	75
		1	1.0	1.0	80	3.8	75
		2	0.1	0.1	80	0	0
		2	1.0	1.0	80	0	0
'Hiroshimana from Kawauchi'	33	1	0.1	0.1	80	0	0
		1	1.0	1.0	110	0	0
		2	0.1	0.1	110	0	0
		2	1.0	1.0	100	0	0
	35	1	0.1	0.1	80	1.3	13
		1	1.0	1.0	80	2.5	25
		2	0.1	0.1	80	0	0
		2	1.0	1.0	80	0	0
Kihara	35	1	0.1	0.1	80	0	0
		1	1.0	1.0	80	0	0
		2	0.1	0.1	80	0	0
		2	1.0	1.0	80	0	0
Kuramoto	35	1	0.1	0.1	80	0	0
		1	1.0	1.0	80	0	0
		2	0.1	0.1	80	0	0
		2	1.0	1.0	80	0	0
Denbira	33	1	0.1	0.1	70	0	0
		1	1.0	1.0	70	0	0
		2	0.1	0.1	70	0	0
		2	1.0	1.0	70	0	0
	35	1	0.1	0.1	80	1.3	13
		1	1.0	1.0	80	0	0
		2	0.1	0.1	80	0	0
		2	1.0	1.0	80	0	0
Neishi	35	1	0.1	0.1	60	0	0
		1	1.0	1.0	40	5.0	75
		2	0.1	0.1	80	0	0
		2	1.0	1.0	50	0	0

a : Anthers were cultured at 33 or 35°C for one or two days prior to maintenance at 25°C.

b : Preculture temperature

Anthers were harvested from late February to early March.

0.8%寒天を添加した B5 寒天培地を25ml分注した培地を用いた。移植約40日後に不定胚からの植物体再生を調査した。

幼植物体は、パーミキュライト：パーライト＝1：1の人工培土に移植して順化後、12cmポリポットに鉢上げして栽培した。

3. 細胞学的観察

葯内の小胞子の発育ステージは、葯を押しつぶした後、酢酸オルセイン染色または 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 染色を行って判定した。

再生植物体の倍数性は、根端分裂細胞または花粉母細胞の染色体の観察により判定した。

根端分裂細胞の染色体の観察は、西林ら¹³⁾の方法に従って行った。順化後、鉢上げ栽培した再生植物体の根端は、2mM 8-hydroxyquinoline に浸漬し、4℃で5時間前処理後、4℃のエタノール・酢酸溶液（エタノール：酢酸＝3：1）で1日間以上固定した。プレパラートの作製は、根端を4%セルラーゼ オノズカ RS、1%ペクトリアーゼ Y-23、7.5mM KCl、7.5mM EDTA、pH4.0の酵素液で、37℃、45分間処理して解離し、1%酢酸オルセインで染色して行った。

花粉母細胞の染色体の観察は、抽苔した株の花蕾から葯を取り出し、1%酢酸オルセインで染色して押しつぶし法によりプレパラートに作製し、花粉母細胞の第1分裂中期または第1分裂後期で行った。

実 験 結 果

1. 不定胚誘導

1) 品種・系統、前培養、植物ホルモンの影響

2 品種及び 4 系統について、2 月下旬から 3 月上旬に

抽苔した主茎の花蕾から、花卉長と葯長の比 (P/A) が 1/3～3/4の葯を取り出して培養した。品種・系統、前培養の温度と日数及び培地に添加する植物ホルモンが、不定胚形成に及ぼす影響を調べた。その結果を Table 1 に示した。

品種・系統の影響については、'1号広島菜'、'広島菜(川内産)'、田平系及び根石系の 2 品種・2 系統で不定胚が形成され、木原系及び倉本系では、不定胚が形成されず、不定胚形成に品種・系統間差が認められた。不定胚形成率は1.3～5.0%で、1000葯当りの不定胚形成数は13～75個で、不定胚形成は不良であった。

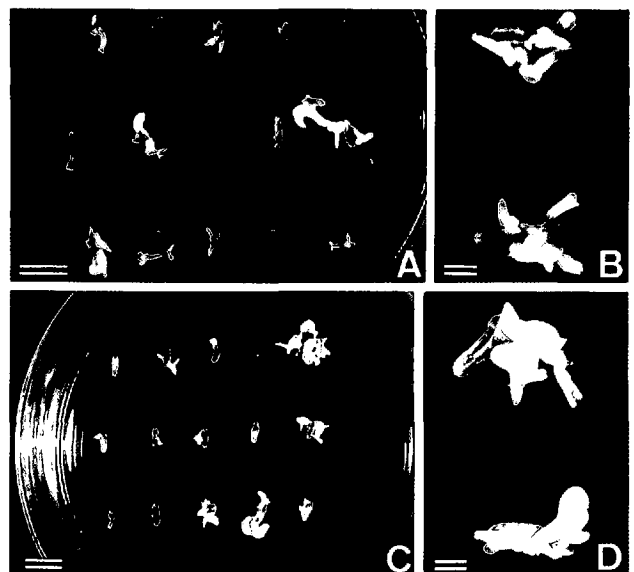


Fig. 1 Emergence of embryos from cultured anthers after one month of culture in *Brassica campestris* ssp. *pekinensis* cv. 'Hiroshimana'. A, B: 'Ichigou-Hiroshimana'. C, D: 'Nigou-Hiroshimana'. Bars indicate 5mm (A, C), 1mm (B, D), respectively.

Table 2 Embryogenesis in anther culture of two genotypes.

Genotypes	No. of anthers cultured ^a	Frequency of anthers producing embryo (%)	No. of embryos produced			No. of embryos per anther producing embryo	Expected no. of embryos from 1000 anthers
			Globular-Heart	Torpedo-Cotyledonary	Total		
'Ichigou-Hiroshimana'							
Experiment 1	199	19.1	36(41.4) ^b	51(58.6)	87(100)	2.3	437
Experiment 2	571	21.4	176(46.7)	201(58.3)	377(100)	3.1	660
'Nigou-Hiroshimana'							
	574	18.3	116(45.3)	140(54.7)	256(100)	2.4	446

a: Anthers were cultured at 35℃ for one day prior to maintenance at 25℃.

b: Values in parentheses are the percentage of embryos in each types.

Anthers were harvested from late November to late December.

培養初期の培養温度を高くした前培養は、35℃の1日間処理においてのみ不定胚が形成され、35℃の2日間処理及び33℃の1、2日間処理では不定胚が形成されず、35℃の1日間処理が適していた。

培地に添加する植物ホルモンに関して、試験した0.1mg/ℓ 2,4-D、0.1mg/ℓ NAA 区および1.0mg/ℓ 2,4-D、1.0mg/ℓ NAA 区の2区では、不定胚形成に明らかな差異は認められなかった。1.0mg/ℓ 2,4-D、1.0mg/ℓ NAA 区では、不定胚及び取り除けなかった花糸組織の一部がカルス化する傾向を認めた。

以後の試験については、0.1mg/ℓ 2,4-D、0.1mg/ℓ NAA を添加した修正 B5 培地を用い、35℃の1日間前培養を行って薬培養した。

2) 不定胚形成の状況

‘1号広島菜’、‘2号広島菜’について、11月下旬から12月上旬に抽苔した花蕾の、花卉長と葯長の比 (P/A) が1/3~3/4の葯を用いて薬培養し、不定胚形成の状況を調べた (Table 2, Fig.1)。

2品種とも、培養2週間後から乳白色の不定胚が出現し、カルスを経由せずに、直接的に不定胚が形成された (Fig.1)。培養4週間後における‘1号広島菜’、‘2号広島菜’の不定胚形成率は、それぞれ、19.1~21.4%、18.3%、1000葯当りの不定胚形成数は、それぞれ、437~

660個、446個であった。不定胚を形成した葯当りの不定胚形成率は、1.4~3.3個であり、一部では1個の葯から10個以上の不定胚が形成された。

不定胚には、球状型から子葉期までの様々な発育ステージのものが認められた (Fig.2)。形成された不定胚に対する球状型~心臓型の不定胚の割合は41.4~46.7%、魚雷型~子葉期の不定胚の割合は、53.3~58.6%であった。不定胚には、子葉の癒着や肥厚、胚軸の未発達等の奇形が認められた。培養3~4週間後の不定胚は、そのまま培養しても、それぞれの発育ステージで発達を停止した。また、小孢子が直接的にカルス化したものは殆ど認められず、一部に、球状型~魚雷型初期と考えられる不定胚が、カルス化しているのが観察された。

3) 葯の採取時期の影響

‘1号広島菜’を約1か月毎に播種して無加温のガラス室で栽培し、11月下旬~3月下旬に、主茎の花蕾を採取して薬培養を行い、葯の採取時期が不定胚形成に及ぼす影響を調べた。その結果を Table 3 に示した。葯の採取時期の違いにより、不定胚形成に顕著な差が認められた。すなわち、12月14日~21日採取では、不定胚形成率は46.0%で、1000葯当りの不定胚形成数は1513個と最も良く、3月22日~25日採取では、不定胚形成率は4.3%、1000葯当りの不定胚形成数は61個と最も悪かった。

4) 小孢子的発育ステージの影響

‘2号広島菜’の、1月下旬~3月下旬にかけて順次発達してきた側枝の花蕾を用いて、葯内の小孢子的発育ステージが不定胚形成に及ぼす影響を調査した。その結果を Table 4 に示した。1月31日、2月3日では、P/A が1/3の葯を用いた場合、不定胚形成率、1000葯当りの不定胚形成数は、それぞれ、27.4%、777個及び32.3%、1293個と最も高かった。P/A が1/2以上の葯を用いた場合、不定胚形成率、1000葯当りの不定胚形成数は、1/3に比べて非常に低いか、または不定胚形成が認められなかった。2月22日、3月4日では、P/A が1/2の葯を用いた場合、不定胚の形成率、1000葯当りの不定胚形成数は、それぞれ、25.2%、424個及び15.0%、208個と最も

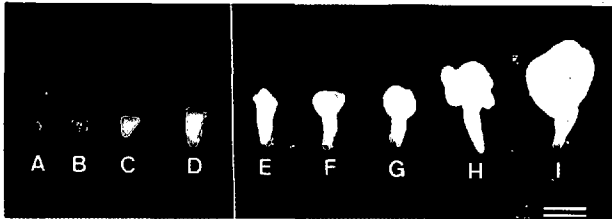


Fig.2 A range of embryo developmental stages after one month culture in anther culture of ‘Ichigou-Hiroshimana’.

A, B: Globular embryo. C: Heart embryo.
D, E: Torpedo embryo. F, G: Stick shaped embryo.
H, I: Cotyledonary embryo. Bar indicates 1mm.

Table 3 Effect of the time of anther harvest on embryogenesis in anther culture of ‘Ichigou-Hiroshimana’.

Anther harvest	No. of anthers cultured	Frequency of anthers producing embryo (%)	No. of embryos per anther producing embryo	Expected no. of embryos from 1000 anthers
29 Nov.- 2 Dec.	421	12.5	2.8	356
14 Dec.-21 Dev.	150	46.0	3.3	1513
24 Jan.-25 Jan.	255	5.5	1.9	102
22 Mar.-25 Mar.	607	4.3	1.4	61

Table 4 Effect of the bud developmental stage on embryogenesis in anther culture of 'Nigou-Hiroshimana'.

Anther harvest	Bud stage	No. of anthers cultured	Frequency of anthers producing embryo (%)	No. of embryos per anther producing embryo	Expected no. of embryos from 1000 anthers
31 Jan.	1/3 ^a	175	27.4	2.8	777
	1/2	199	0	0	0
	2/3	186	0	0	0
	4/5	98	0	0	0
3 Feb.	1/3	133	32.3	4.0	1293
	1/2	117	2.6	1.0	26
	2/3	100	0	0	0
	4/5	103	0	0	0
22 Feb.	1/4	210	0	0	0
	1/3	240	4.2	1.9	79
	1/2	210	25.2	1.7	424
	2/3	150	1.3	1.5	20
4 Mar.	1/4	135	0	0	0
	1/3	135	0.7	3.0	22
	1/2	120	15.0	1.4	208
	2/3	120	0	0	0

a : Petal length/anther length ratio

高かった。P/A が1/3, 2/3の葯を用いた場合、不定胚形成率、1000葯当りの不定胚形成数は、1/2に比較して非常に低かった。不定胚形成に適した花蕾のP/Aの範囲は非常に限定され、また、花蕾の採取時期により、適したP/Aは異なった。

‘2号広島菜’について、側枝の花蕾における小胞子の発育段階を調べた結果をTable 5に示した。2月2日では、P/Aが1/3の時、小胞子の発育ステージが1核期前期に相当し、3月4日では、P/Aが1/2の時、1核期

Table 5 The relation between bud developmental stage and microspore developmental stage in 'Nigou-Hiroshimana'.

Anther harvest	Bud stage	Anther length (mm)	Microspore stage
2 Feb.	1/4 ^a	1.0	Tetrad
	1/3	1.3	Early uninucleate
	1/2	1.7	Late uninucleate
	2/3	2.0	Late uninucleate
4 Mar.	1/4	1.0	Prophase
	1/3	1.2	Tetrad
	1/2	1.7	Early uninucleate
	2/3	2.2	Late uninucleate

a : Petal length/anther length ratio

前期に相当した。同じP/A値の花蕾でも、採取時期により葯内の小胞子の発育ステージが異なった。

以上のことから、P/Aが1/3～1/2で、小胞子の発育ステージが1核期前期の葯を培養した場合、不定胚形成が良好であった。

5) 培地に添加するアスコルビン酸、硝酸銀、AVGの影響

‘1号広島菜’、‘2号広島菜’の2品種を用いて、アスコルビン酸、硝酸銀、AVGの培地への添加が不定胚形成に及ぼす影響を調査した(Table 6)。2品種とも、1.0mg/ℓ硝酸銀、1.0mg/ℓAVG添加区では、不定胚形成率、1000葯当りの不定胚形成数が増加した。0.2mg/ℓアスコルビン酸の添加が、不定胚形成に及ぼす影響は明らかではなかった。

2. 植物体再生

魚雷型～子葉期の不定胚を再分化培地に移植して、不定胚の発育ステージと植物体再生の関係を調べた結果をTable 7に示した。不定胚は再分化培地に移植1～2日後には緑色を帯び、本葉を分化すると同時に発根して、植物体に再生した(Fig.3)。ステック型、子葉期の不定胚からの植物体再生率は90%以上であったが、魚雷型(0.5～1.0mm)や顕著な奇形を有する子葉期の不定胚からの植物体再生率は、それぞれ、82.1%、78.3%とやや

Table 6 Effects of ascorbic acid, silver nitrate and AVG on embryogenesis in anther culture of two genotypes.

Treatments	No. of anthers cultured	Frequency of anthers aroducing embryo (%)	No. of embryos per anther producing embryo	Expected no. of embryos from 1000 anthers
'Ichigou-Hiroshimana'				
Control	199	19.1	2.3	437
0.2mg/ℓ Ascorbic acid	187	11.2	1.3	150
1.0mg/ℓ Silver nitrate	161	24.2	3.2	764
1.0mg/ℓ AVG	174	31.6	2.8	891
'Nigou-Hiroshimana'				
Control	260	10.8	1.4	146
0.2mg/ℓ Ascorbic acid	260	18.1	1.8	323
1.0mg/ℓ Silver nitrate	260	14.2	2.1	296
1.0mg/ℓ AVG	244	17.6	1.7	295

AVG : aminoethoxyvinylglycine

Table 7 Effect of embryo developmental stage on plantlet regeneration.

Embryo stage	No. of embryos cultured ^a	No. of embryos developing plantlet	Frequency of embryos developing plantlets (%)
Torpedo (0.5-1.0mm)	28	23	82.1
Stick	105	95	90.5
Cotyledonary (normal)	99	91	91.9
Cotyledonary (abnormal)	23	18	78.3

a : Anther-derived embryo were transferred into B5 agar medium without growth regulators.

低かった。一部の不定胚からは複数の苗条をもつ植物体が再生した。また、胚軸の先端が褐変化している不定胚は、再分化培地に移植しても発達が認められず、植物体に再生しなかった。再生した植物体の大部分は順化後、鉢上げ栽培して開花させることができた (Fig.4)。

不定胚由来の植物体を鉢上げ栽培して、染色体数を調べた結果、根端分裂細胞及び花粉母細胞共に 2n=10 の半数体 (Fig.5A,5B)、根端分裂細胞及び花粉母細胞共に 2n=20 の2倍体が認められた (Fig.5C,5D)。半数体は、小型で不稔の花器を有し、2倍体は正常な花器を有していた (Fig.4C)。一部の2倍体については、自家受粉により種子が得られた。

考 察

1. 不定胚誘導

1) 不定胚形成率

ヒロシマナの薬培養の不定胚形成に関して、最良の条件において、'1号広島菜'では、不定胚形成率46.0%、1000薬当りの不定胚形成数1513個、'2号広島菜'では、不定胚形成率32.3%、1000薬当りの不定胚形成数1293個



Fig. 3 Plantlet development from anther-derived embryos in 'Nigou-Hiroshimana'.
A : Germimination of embryos on B5 agar medium without growth regulator after 7 days of subculture.
B : Plantlet developement after 25 days of subculture.
Bars indicate 1cm.

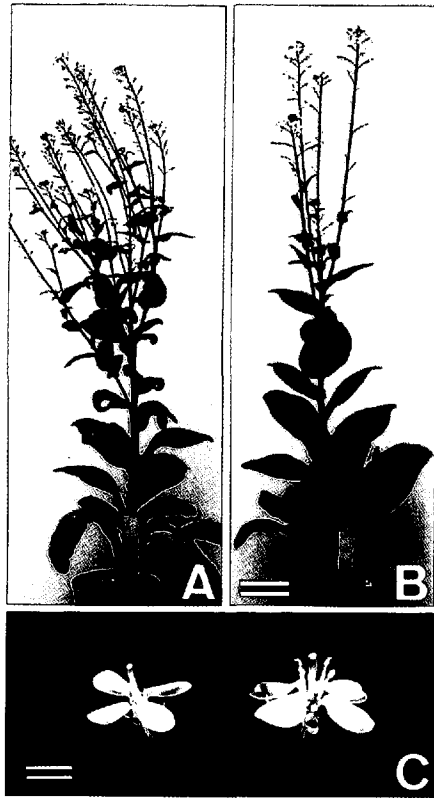


Fig.4 Regenerated plants with flowering in anther culture of 'Ichigou-Hiroshimana'.
A : Haploid . B : Diploid. C : Flowers showing sterile haploid (left) and fertile diploid (right). Bars indicate 5cm (B), 5mm (C), respectively.

であった。また、'1号広島菜'での不定胚形成率の平均は約20%，1000葯当りの不定胚形成数の平均は500個以上であった。ヒロシマナが属する *B. campestris* のツケナ類の葯培養については、カモスグキナでは不定胚形成率4.7%，1000葯当りの不定胚形成数93個¹⁵⁾，オニコウベナでは不定胚形成率5.1%，1000葯当りの不定胚形成数59.3個¹⁶⁾の報告がある。ヒロシマナの不定胚形成率は、これらの報告に比較して非常に高かった。

著者らは、ヒロシマナの小孢子培養では、培養3週間後に子葉期の不定胚が認められることを報告した²⁾。これに対して、本研究の葯培養では、培養2～3週間後からステック型不定胚が形成された。葯培養における不定胚形成に要する日数は、小孢子培養での小孢子からの直接的な不定胚形成の日数とほぼ同様であった。

2) 前培養の高温処理の影響

B. campestris では、培養初期に培養温度を高くした前培養 (35℃, 1, 3日間) により、不定胚形成が著し

く向上することが報告されている^{4,7)}。ヒロシマナの葯培養では、35℃の1日間処理においてのみ不定胚が形成され、35℃の2日間及び33℃の1, 2日間処理では、不定胚が形成されず、35℃の1日間処理が適していた。ヒロシマナの小孢子培養では、33℃の1, 2日間処理により不定胚が形成され²⁾、葯培養の結果とは異なった。これは、葯をそのまま培養する場合と葯から小孢子を単離して培養する場合の、小孢子的生理的環境の違いによると推察された。

3) 品種・系統の影響

3品種及び4系統について葯培養を行った結果、3品種及び2系統で不定胚が形成され、他の2系統では不定胚形成が認められず、品種・系統による遺伝子型の違いが、不定胚形成に影響していると考えられた。不定胚が形成されなかった2系統については、小孢子培養においても不定胚形成が悪く²⁾、不定胚形成能に関して、小孢子培養と同様な傾向が認められた。釘貫ら¹⁰⁾は、ハクサイの小孢子培養において、不定胚形成能は優性に遺伝すると推測される結果を報告している。今後、ヒロシマナにおいても不定胚形成能の遺伝性等について明らかにする必要がある。遺伝性を確認し、不定胚形成能の高い系統を探索または育成することにより、不定胚形成の効率化が可能になる。

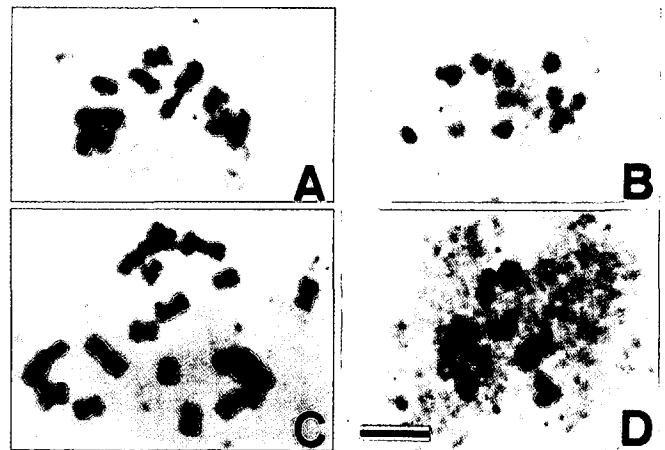


Fig.5 Chromosomes of haploid and diploid derived from anther culture of 'Nigou-Hiroshimana'.

A : chorosomes of root tip cell in haploid ($2n=10$).

B : chorosomes of pollen mother cell at metaphase I in haploid ($2n=10$ I=10).

C : chorosomes of root tip cell in diploid ($2n=20$).

D : chorosomes of pollen mother cell at metaphase I in diploid ($2n=10$ II=20).

Bar indicates 5 μ m.

4) 小胞子の発育ステージの影響

Brassica 属の小胞子からの不定胚形成に関して、最も適した小胞子の発育ステージは1核期とされている⁸⁾。ハクサイの薬培養では、Matumoto ら¹²⁾は、不定胚形成に適した小胞子の発育ステージは1核期前期と報告している。ヒロシマナでは、薬培養に適した小胞子のステージは1核期前期であり、ハクサイと同じ結果であった。

薬内の小胞子の発育ステージを推定する指標として、花卉長と葯長の比 (P/A) が用いられている⁸⁾。ヒロシマナでは、P/A が1/3~1/2の時、小胞子の発育ステージは1核期前期に相当した。この基準は、供試する植物材料の品種・系統、栽培条件及び花房の発達段階等により影響を受けて一定ではない¹¹⁾。ヒロシマナにおいても、'2号広島菜'の側枝の花蕾で、P/A と小胞子の発育ステージの関係を調べたところ、同じP/A でも花蕾の採取時期により小胞子の発育ステージが異なっていた。したがって、品種や栽培条件等が異なる花蕾を用いる場合は、P/A と小胞子の発育ステージの関係を、新たに調べる必要があると考えられた。

5) 葯の採取時期の影響

Brassica 属では、供試する植物体の栽培条件が、薬培養での不定胚形成に顕著な影響を与えることが明らかになっている^{8,9)}。

ヒロシマナの薬培養では、無加温のガラス室で栽培し、11月下旬~3月下旬に抽苔した花蕾を採取して培養した結果、11月下旬~12月中旬に採取した葯では不定胚形成が良好で、3月中旬に採取した葯では不定胚形成が不良であった。また、2月下旬~3月上旬に採取した葯を用いて、不定胚形成の品種・系統間差を調査した試験においても、不定胚形成が不良であり、葯の採取時期の違いにより、不定胚形成に顕著な差が認められた。このことから、材料植物の栽培温度が、薬培養による不定胚形成に影響を与え、材料植物は比較的低い温度条件で栽培、抽苔させるのが良いと推察された。

6) 培地に添加する物質の影響

B. oleracea var. *gemmifera* (コモチカンラン) の薬培養では、エチレンの作用を阻害する硝酸銀¹⁹⁾やエチレンの生合成を阻害するAVG¹⁹⁾を、培地に添加すると、いくつかの品種では、不定胚形成が飛躍的に向上すると報告されている^{1,14)}。ヒロシマナの薬培養でも、不定胚形成培地に、1.0mg/ℓ 硝酸銀や1.0mg/ℓ AVGを添加すると、不定胚形成率及び1000葯当りの不定胚形成数が増加した。

硝酸銀の培地への添加による不定胚形成の向上には、品種間差があることが報告されている¹⁴⁾。硝酸銀、

AVGの添加によるヒロシマナ薬培養の不定胚形成の効率化については、今後、添加する濃度及び品種間差等を検討する必要がある。

ジャガイモの薬培養では、抗酸化物質で、培養物の褐変を抑制するアスコルビン酸の培地への添加により、不定胚形成に効果が認められている¹⁷⁾。ヒロシマナの薬培養では、アスコルビン酸の培地への添加が、不定胚形成に及ぼす影響は明らかではなかった。

2. 不定胚からの植物体再生

魚雷型後期~子葉期の不定胚を、培養1か月後に再生培地に移植すると、約80%以上が本葉形成と同時に発根して、直接植物体に発達した。ヒロシマナが属する *B. campestris* では、ハクサイの薬培養において、Matumoto ら¹²⁾は、20~30%の不定胚が直接植物体に再生し、Hamaoka⁵⁾らは、約80%の不定胚が正常な苗条を再生したと報告している。また、ツケナ類のオニコウベナでは、30%の不定胚が植物体に再生し¹⁶⁾、カブでは、10~15%の不定胚が直接植物体に再生した⁷⁾と報告している。ヒロシマナの薬培養における、不定胚の直接的な植物体再生率は、ハクサイでのHamaoka ら⁵⁾の報告とほぼ同じで、他の報告に比較して非常に高かった。

また、ヒロシマナの小胞子培養では、形成された不定胚の大部分は植物体に発達せず、60%の不定胚が2次に苗条を再生し、植物体の再生には3~4か月を要した²⁾。ヒロシマナの小胞子由来の不定胚からの植物体再生では、薬培養の場合が小胞子培養の場合より効率的であった。

ヒロシマナの薬培養における不定胚形成に関しては、再生植物体に半数体が認められ、カルスを経由せずに不定胚が形成されたこと及び不定胚形成に要する日数が小胞子培養とほぼ同じであったことから、薬内の小胞子が直接的に不定胚を形成したと考えられた。また、2倍体の再生植物体は、小胞子由来の半数性細胞の染色体が、培養過程で倍加したものと推察された。

2倍体再生植物を半数体育種に利用するには、2倍体植物が確かにホモ接合体であるかどうかの確認が必要であり、自殖後代について形質が固定しているかどうかを検討する必要がある。また、再生植物における半数体、2倍体の割合を調査して、半数体の出現頻度が高い場合には、半数体の染色体をコルヒチン等で倍加させて2倍体を作出することが必要である。

本研究において、ヒロシマナの薬培養により、薬内の小胞子からの直接的な不定胚形成及び不定胚からの直接的な植物体再生が、効率的にできることを明らかにした。

今後、薬培養による半数体育種法を実用化するには、半数体の染色体を倍加させた2倍体植物を効率的に育成する必要がある。

摘 要

1. ヒロシマナの薬培養による不定胚形成及び不定胚からの植物体再生に及ぼす培養条件について検討した。

2. P/A が1/3～3/4の薬を、0.1mg/ℓ 2,4-D, 0.1mg/ℓ NAA を添加した修正 B5 培地(Keller and Armstrong 1979) に置床し、35℃で1日間の前培養後、25℃の暗黒下で培養すると、薬内の小孢子から不定胚が直接的に形成された。

3. 不定胚形成は、小孢子の発育ステージ、薬の採取時期により大きく影響された。P/A が1/3～1/2で、1核期前期の小孢子を含む薬を用いると、効率的に不定胚が形成された。

4. 供試した3品種・4系統において、不定胚形成に品種間差が認められた。不定胚形成能の高い品種である‘1号広島菜’での不定胚形成率は約20%、1000薬当りの不定胚形成数は500個以上であった。

5. 不定胚形成培地に、エチレンを阻害する1.0mg/ℓ 硝酸銀、1.0mg/ℓ AVG を添加すると、不定胚形成率が向上した。

6. 不定胚からの植物体再生は、魚雷型～子葉期の不定胚を、植物ホルモン無添加の B5 寒天培地に移植すると、80%以上が直接的に植物体に再生した。

7. 再生植物体の倍数性については、根端細胞及び花粉母細胞ともに $2n=10$ の半数体及び $2n=20$ の2倍体が認められた。2倍体は自殖により後代が得られた。

謝 辞

本研究を実施するにあたり、中国農業試験場の大川安信室長及び野菜・茶業試験場の釘貫靖久主任研究官から有益な指導と助言を頂いた。ここに感謝の意を表する。

引 用 文 献

1) BIDDINGTON, N.L. and H.L.ROBINSON : 1991. Ethylene production during anther culture of Brussels sprouts (*Brassica oleracea* var. *gemmifera*) and its relationship with factors that affect embryo production. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 25 : 169-177.

2) 長久 逸, 井本征史 : 1994. ヒロシマナの小孢子

培養による植物体再生. 広島農技セ研報60 : 47-54.

3) 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.

4) HAMAOKA, Y., Y. FUJITA and S. IWAI : 1991. Effects of temperature on mode of pollen development in anther culture of *Brassica campestris*. *Physiol. Plant.* 82 : 67-72.

5) HAMAOKA, Y., Y. FUJITA and S. IWAI : 1991. Number of chloroplasts in haploids and diploids produced via anther culture in *Brassica campestris*. *Plant Tissue Cult. Lett.* 8 : 67-72.

6) KELLER, W. A., T. RAJHATHY and J. LACAPRA : 1975. In vitro production of plants from pollen in *Brassica campestris*. *Can. J. Genet. Cytol.* 17 : 655-666.

7) KELLER, W.A. and K.C.ARMSTRONG : 1979. Stimulation of embryogenesis and haploid production in *Brassica campestris* anther culture by elevated temperature treatments. *Theor. Appl. Genet.* 55 : 65-67.

8) KELLER, W.A., K.C.ARMSTRONG and A.I.DE LA ROCHE : 1983. The production and utilization of microspore-derived haploid in *Brassica* crops. *Plant cell culture in crop improvement.* (ed by Sen, S.K. and K.L.Giles) Plenum Publishing Corporation, New York : 169-183.

9) KELLER, W.A. : 1984. Anther culture of *Brassica*. *Cell culture and somatic cell genetics of plants vol.1.* (ed by Vasil, I.) Academic Press : 302-310.

10) 釘貫靖久, 中村幸司, 吉川宏昭 : 1990. ハクサイの小孢子培養(第2報) 胚様体形成能の遺伝及び植物体再生能の品種間差異. 園学雑. 60 (別2) : 212-213.

11) 釘貫靖久 : 1992. アブラナ科花菜類の半数体育種. 花菜類の栽培・育種をめぐる諸問題. 平成4年度野菜・茶業試験場課題別研究会資料 : 43-51.

12) MATSUMOTO, E., M. FUJIMORI and F. OTANI : 1989. Production of haploid plants via microspore embryogenesis in Chinese cabbage anther culture. *Bull. Nagano Veg. and Ornam. Crops Exp. Sta.* 5 : 9-14.

13) 西林双龍 : 1990. 培養細胞と再生植物の染色体観察法. 植物組織培養 7 : 127-129.

14) OCKENDON, D.J. and M.ROSEMARY : 1993. Effect of silver nitrate and 2,4-D on anther culture of Brussels sprouts (*Brassica oleracea* var. *gemmifera*) *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 32 : 41-46.

15) SATO, T., T.NISHIO and M.HIRAI : 1989. Varietal

differences in embryogenic ability in anther culture of Chinese cabbage (*Brassica campestris* ssp. *pekinensis*). Japan.J.Breed. 39 : 149-157.

16) 鈴木誠一・庄子孝一 : 1993. 葯培養によるオニコウベナ (*Brassica campestris* cv. Onikoubena), カラシナ (*B. juncea*) の半数体作出. 宮城農セ報 59 : 6-12.

17) TIAINEN, T : 1992. The role of ethylene and reducing agents on anther culture response of te-

toraploid potato (*Solanum tuberosum* L.). Plant Cell Reports 10 : 604-607.

18) YANG, C., N. PAN and C. LIU : 1979. Plantlet formation in *Brassica pekinensis* Rupr. on the anther culture. Acta Botanica Sinica 21 : 378-380.

19) YANG, S.F. : 1985. Biosynthesis and action of ethylene. HortScience 20 : 41-45.

Embryogenesis and Plant Regeneration in Anther Culture of *Brassica campestris* ssp. *pekinensis* cv. 'Hiroshimana'

Suguru CHOKYU, Akira HIRAO and Masashi IMOTO

Summary

Embryogenesis and plant regeneration in anther culture of *Brassica campestris* ssp. *pekinensis* cv. 'Hiroshimana' were investigated. Anther-derived embryos were obtained, when anthers were cultured on modified B5 medium (Keller and Armstrong 1979) with 0.1mg/ℓ 2, 4-D and 0.1mg/ℓ NAA at 35°C for one day and then maintained at 25°C in the dark.

The efficiency of embryo formation was affected by the bud developmental stage and the time of anther harvest. The optimal bud stage expressed as the petal/anther length ratio, was between 1/3 and 1/2, which corresponded to the early uninucleate stage of microspore.

Embryogenic ability from anther was different among 3 cultivars and 4 lines. The frequency of anthers producing embryo was 20% and the expected yield of embryos from 1000 anthers was over 500 in 'Ichigou-Hiroshimana'.

Addition of the ethylene inhibitors of 1.0mg/ℓ silver nitrate and 1.0mg/ℓ AVG to the culture medium improved embryogenesis from anthers.

More than 80% of embryos with torpedo-cotyledonary stage developed directly into plantlets, when they were transferred into B5 agar medium without growth regulators. Cytological analysis of root tip cells and pollen mother cells in regenerated plants showed haploid ($2n=10$) and diploid ($2n=20$). Some of diploids set seed after selfing.

Key words : *Brassica campestris*, anther culture, embryo, haploid, plant regeneration, Hiroshimana