エンドウの *in vitro* における世代促進のための培養法

藤岡唯志¹*・藤田政良²・宮本芳城¹

¹ 和歌山県農林水産総合技術センター暖地園芸センター 644-0024 御坊市塩屋町

² 和歌山県農林水産総合技術センター 640-0423 和歌山県那賀郡貴志川町

In Vitro Culture Method for Accelerating Generation Turn-over in Pea

Tadashi Fujioka¹*, Masayoshi Fujita² and Yoshiki Miyamoto¹

¹ Horticultural Experiment Center, Wakayama Research Center of Agriculture, Forestry and Fisheries,

Sioya-cho, Gobo, Wakayama 644-0024

² Wakayama Research Center of Agriculture, Forestry and Fisheries, Kishigawa-cho, Naga, Wakayama 640-0423

Summary

The growth of the pod and the number of seed on *in vitro* cultured pea (*Pisum sativum* L. var. Kinusaya) were examined. When the pod or immature seed born *in vitro* was cultured, the effect of the developmental stage of the explants on the period for alternation of generation was investigated. Combining the data, a way of accelerating generation turn-over *in vitro* and the use in practical breeding were considered. The results obtained are;

1. Pea cultivars produced 2.0-2.4 seeds per plant *in vitro*.
2. The enlargement and ripening of seed *in vitro* were advanced at 25 °C than were those at 20 °C.
3. When 25-day old pods or 30-day old seeds after anthesis were picked and re-cultured *in vitro*, the alternation of generation of the pea was completed in 82 days.
4. The plants set many pods *in vitro*, when the previous pod was removed at an early developmental stage.
5. The seed ripened *in vitro* could be sowed in the field without acclimation.

These results indicate that by accelerating the generation turn-over by *in vitro* pod culture, the breeding period of the pea can be shortened.

Key Words: *Pisum sativum*, *in vitro*, pod culture, accelerating generation turn-over, breeding.

緒 言

著者らは、エンドウ種子を無菌播種して培養すると、試験管内で開花、結莢すること、その率は早生で節間の短い絹さや品種では100%となることを報告した(藤岡ら, 1999)。また、温室で生育中のエンドウから子房あるいは莢を採取し、培養することにより、子房(莢)内の胚珠が種子に生長し、発根、発芽して、完全な植物体となることを明らかにした(藤岡ら, 1987)。

本報告では、これら試験管内開花、結莢技術と子房(莢)培養技術を組み合わせ、絹さや品種における、試験管内

世代促進技術の開発をすすめた。すなわち、試験管内で培養した植物における莢の生長と結実数を調査し、さらに、試験管内で結莢した莢または未熟種子を培養して、次代を開花、結莢させ、一世代に要する期間を把握した。これらの結果をもとに、絹さやエンドウの試験管内における世代交代のための最適な培養法を検討した。

材料および方法

エンドウ種子は、あらかじめ、有効塩素濃度1%の次亜塩素酸ナトリウム液に15分間浸漬し、その後滅菌水で洗浄し、無菌播種した。基本培地はMS(Murashige・Skoog, 1962)とし、ショ糖を3%添加した寒天培地を用いた。培養容器は試験管(φ30×200mm)を用い、綿栓をした。培養温度を20℃(実験2は25℃区もある)一定に保った培養室(6.4m²)で行い、植物用蛍光灯(National FL40S・PG)の照明により3,000lx、16時間日長とした。

1997年11月10日 受付. 1998年4月20日 受理.

エンドウの試験管内世代促進に関する研究 第3報

本報告の一部は1986年および1987年の園芸学会秋季大会において発表した。

*現在: 和歌山県農林水産総合技術センター農業試験場

品種は実験1を除き‘美笹’を供試した。各実験における1区の供試個体数は約20本とした。

実験1. 試験管内の結莢と莢の生長、結実の品種間差異

絹さや品種の‘美笹’、‘白星’と‘鈴成砂糖’を供試した。3品種の種子を無菌播種し、試験管の中で発芽、生育、開花させた。そして開花後の莢(子房)の長さおよび厚さ(種子の肥大程度を示す)の増加と結実数を調査した。

実験2. 培養温度と試験管内の結莢および莢の生長、結実の関係

培養温度は20℃と25℃を設定した。試験管内のMS培地にエンドウ種子を無菌播種し、各温度の培養室で発芽、生育、さらに開花させた。開花後の莢の生長、結実数を実験1と同様に調査した。

実験3. 試験管内で結莢した莢および未熟種子の生育ステージと培養後の発芽、生育、開花、結実の関係

供試材料は種子を無菌播種し、試験管の中で開花させて準備した。外植体の生育ステージは、開花後10日、15日、20日、25日、30日、40日目の6段階とした。実験区は、これら異なる生育ステージの莢と莢から取り出した未熟種子の区を設けた。培養後、発芽、生育、開花、結実を調査した。また、莢培養では莢内の未熟種子について、発芽、生育、開花、結実を調査した。なお、未熟な莢の培養は、一般的に子房培養と呼ばれているが、本実験では開花後日数を経過し、形態的に莢と呼ぶ方が適当と考えられる外植体も供試している。このため、本報告では、以下一括して莢培養と呼ぶこととする。

実験4. 試験管内で結莢した莢の摘除時期と再結実の関係

試験管内で1個体当たりの結実数を増やすために、1度結実した莢を除去して培養を続け、再結実させた場合について調査した。供試個体は実験3において莢を除去した個体を用いた。実験区は開花後10日、15日、20日、25日、30日、40日目にすべての開花している花および莢を除去した区と無摘除区を設けた。摘除後もそのまま培養を続け、開花、結実を調査した。

実験5. 試験管内登熟種子のほ場栽培における発芽とその後の生育、開花、莢の特性

試験管内での世代促進が終了した後、試験管内で登熟した種子を直接ほ場に播種して、ほ場での選抜へ移行できることを確認するため、本実験を行った。エンドウ種子を試験管内に無菌播種して培養し、開花後登熟、乾燥させた種子(*in vitro*採種種子)を用意した。対照区として露地ほ場で栽培して採種した乾燥種子(慣行種子)を供試した。これらの種子を1995年9月13日に、和歌山県暖地園芸センターガラス温室内の土壌に播種し、発芽率、生育、開花、莢の形質を比較した。

結果

1. 試験管内の結莢と莢の生長、結実の品種間差異

試験管内における各品種の莢長は、‘美笹’と‘鈴成砂糖’が開花後10日目位まで、‘白星’が13日目位まで急激に増加し、その長さが3cmを越えた(第1図)。種子の肥大を示す莢の厚さは、3品種とも開花後16日目まで増加して7mmに達し、その後増加が緩慢となった。莢の緑色が白く変化し始める(白化)時期は、‘鈴成砂糖’が開花後24日、‘美笹’が28日、‘白星’が30日目であり、莢の枯れ上りは、‘美笹’と‘鈴成砂糖’が開花後36日目、‘白星’が40日目であった(第1表)。3品種ともすべての供試個体は1粒以上の種子を結実した。結実数は‘美笹’が1.8、‘白星’が1.6であり、‘鈴成砂糖’の1.1より多かったが、逆に1莢当たり粒数は、‘鈴成砂糖’が1.8、‘白星’が1.5、‘美笹’が1.1の順であった。従って1個体当たりの結実数は、‘白星’が2.4粒、‘美笹’が2.0粒、‘鈴成砂糖’が1.9粒であった。

2. 培養温度と試験管内の結莢および莢の生長、結実の関係

莢の長さは20℃区が開花後22日まで増加し、3.7cmとなり、25℃区が開花後13日まで増加し、3.4cmとなった(第2図)。莢の厚さは全期間、25℃区が20℃区を上回った。莢の白化は25℃区が20℃区よりも5日早く、莢の枯れ上りは25℃区が9日早かった(第2表)。結実数

Fig. 1. Growth curves of pea pods from three cultivars cultured *in vitro*. For cultural condition: See Table 1.

Table 1. Differences in seed set and growth of pods among pea cultivars cultured *in vitro*.^z

Cultivar	No. of pod setting (A)	No. of seeds / pod (B)	No. of seeds / plant (A × B)	Days to pod whitening ^y	Days to pod drying-off ^y
Shiroboshi	1.6b ^x	1.5ab	2.4a	30b	40a
Misasa	1.8b	1.1a	2.0a	28ab	36a
Suzunarisatou	1.1a	1.8b	1.9a	24a	36a

^z Culture bottle and stopper: ϕ 30 × 200mm test tube & cotton.Culture temperature: 20 °C. Light duration and intensity: 16hr · day⁻¹ and 3,000 lx.^y Days after flowering.^x Mean separation within columns by Duncan's multiple range test, 1% level.**Table 2.** Effect of temperature on seed set and growth of pods of pea cultured *in vitro*.^z

Temperature	No. of pod setting (A)	No. of seeds / pod (B)	No. of seeds / plant (A × B)	Days to pod whitening ^y	Days to pod drying-off ^y
20 °C	1.8	1.1	2.0	28	36
25 °C	1.4	1.1	1.5	23	27
	** ^x	NS	NS	**	**

^z Cultivar: 'Misasa'. Culture bottle and stopper: ϕ 30 × 200mm test tube & cotton.Light duration and intensity: 16hr · day⁻¹ and 3,000 lx.^y Days after flowering.^x t-test **: P<0.01, *: 0.01<P<0.05, NS; not significant. **Fig. 2.** Growth curves of pea pods cultured *in vitro* at 20 °C and 25 °C. For cultural condition and Cultivar: See Table 2.

は、20 °C区が1.8、25 °C区が1.4であり、1 莢当たり粒数はともに1.1であった。従って1 個体当りの結実数は20 °C区が2.0、25 °C区が1.5であった。以上の結果、種子の肥大生長、登熟は、25 °C区が20 °C区より早くなることがわかった。

3. 試験管内で結実した莢および未熟種子の生育ステージと培養後の発芽、生育、開花、結実の関係

発芽率は10日未熟種子区が40.0 %、15日未熟種子区が66.7 %と低かったが、それ以外の生育ステージの莢区および未熟種子区は87.5~100 %と高かった(第3表)。発芽までの日数は、生育ステージの進んだ25日以降の莢区および未熟種子区では15日以下と短かったが、20日以前の若い生育ステージの莢区および未熟種子区では29日以上と長期間を要した。15日未熟種子区では発芽したシュートは、生育が極めて遅かった。発芽したシュートの開花率は10日未熟種子区が40 %と低かったが、それ以外の生育ステージの莢区および未熟種子区は80~100 %であった。開花まで日数は生育ステージの進んだ25日以降の莢区および未熟種子区では65日以下と短かったが、20日以前の莢区および未熟種子区では87日以上要した。置床から開花までの日数に莢の生育ステージの日数を加えた日数、つまり、開花日から開花日までの1世代に要した日数は、25日莢区が81.8日、30日未熟種子区が82.0日で最も短かった。結実率は30日莢区および未熟種子区、25日莢区、15日莢区が100 %であった。

4. 試験管内で結実した莢の摘除時期と再結実の関係

莢の摘除後、次に開花するまでの日数は、40日摘除区が3.0日で最も早く、それ以外の区では10.0~14.1日であった(第4表)。再結実までの日数も40日摘除区が13.3日で最も短かった。摘除した莢数と合わせた1 個体当たりの総結実数は、早期に摘除した10日区、15日区、20日区、25日区が2.5~2.9と多く、30日区、40日区、無摘除区

Table 3. Effect of developmental stage of pod and immature seed on germination, growth, flowering and pod setting of pea cultured *in vitro*.^z

Days after flowering	Explant	% of germination ^y	Days to germination ^x	No. of node	% of flowering ^y	Days to flowering ^x	Node-order of flowering	% of pod setting ^y	No. of pod setting	No. of seeds/pod
40	pod	87.5	5.3a ^w	18.5ab	80.0	57.7a (97.7) ^y	17.0a	80.0	1.0	1.0
	seed	100	4.0a	20.6ab	100	56.7a (96.7)	17.1a	88.9	1.0	1.0
30	pod	100	7.5a	22.3c	100	55.6a (85.6)	16.5a	100	1.0	1.0
	seed	100	5.2a	18.0bc	100	52.0a (82.0)	15.4a	100	1.1	1.1
25	pod	100	8.2a	17.6bc	100	56.8a (81.8)	15.7a	100	1.0	1.0
	seed	100	14.6a	17.4bc	100	65.0a (90.0)	15.7a	83.3	1.2	1.0
20	pod	100	30.7c	17.2ab	85.7	87.6b (107.6)	16.8a	71.4	1.0	1.0
	seed	100	29.4bc	15.0ab	100	104.0c (124.0)	15.0a	0	-	-
15	pod	100	44.0de	18.5ab	100	104.0bc (119.0)	15.3a	100	1.0	1.0
	seed	66.7	55.5e	-	-	-	-	-	-	-
10	pod	100	50.0de	15.3ab	80.0	102.7b (112.7)	12.9a	60.0	1.2	1.0
	seed	40.0	43.0d	14.0a	40.0	107.0bc (117.0)	13.5a	40.0	1.0	1.0

^z Cultivar: 'Misasa'. Culture medium: MS+3% sucrose. Culture bottle: ϕ 30 × 200mm test tube. Stopper: changed to cotton from aluminum foil after germination of seed. Culture temperature: 20 °C. Light duration and intensity: 16hr · day⁻¹ and 3,000 lx. Data was examined at 95 days after germination of seed. Pod setting: Length of pod is more than 2.5cm.

^y No. of pod including germinated seeds or flowering or pod setting shoots per no. of cultured pod.

^x Days after planting explants.

^w Mean separation within columns by Duncan's multiple range test, 5% level.

^v Days to flowering from last time flowering (Days to flowering + Days of developmental stage of explant).

Table 4. Effect of the time of removal of pod on the subsequent flowering and pod setting of pea cultured *in vitro*.^z

Days from flowering to remove the pod	Days to flowering ^y	Days to pod setting ^y	Total no. of pods ^x	No. of seeds/pod
10	14.1b ^w	24.5ab	2.8c	1.0
15	12.8b	27.8b	2.8c	1.0
20	12.6b	21.8ab	2.9c	1.0
25	10.7b	19.9ab	2.5bc	1.2
30	10.0b	23.0ab	2.0a	1.0
40	3.0a	13.3a	2.1ab	1.0
Non - remove			2.0a	1.2

^z Cultivar: 'Misasa'. Culture medium: MS+3% sucrose. Culture bottle and stopper: ϕ 30 × 200 mm test tube & cotton. Culture temperature: 20 °C. Light duration and intensity: 16hr · day⁻¹ and 3,000 lx.

Pod setting: Length of pod is more than 2.5 cm.

^y Days from remove.

^x Total no. of pods: No. of pod setting + No. of removed pod.

^w Mean separation within columns by Duncan's multiple range test, 1% level.

が2.0~2.1と少なかった。再結莢した莢当たりの結実数は、各処理区1.0~1.2粒であった。

5. 試験管内登熟種子のほ場栽培における発芽とその後の生育、開花、莢の特性

試験管内で培養し、結莢後登熟した種子(*in vitro*採種種子)をガラス温室には種すると、100%発芽した(第5

表)。 *in vitro*採種種子は、慣行種子と比べ、その後の草丈、節数、分枝数について大差がなかった。しかし、開花日が若干遅くなり、開花節位が高くなった。また、莢の長さ、幅、厚さ、重さ、色、形状については、両区の違いが認められなかった。

Table 5. Germination, growth, flowering and characteristic of pod of ripening seed *in vitro* cultured pea.^z

Cultured condition	% of germination	Plant height (cm)	No. of node	No. of branching	Flowering period	Node-order of flowering	Pod					
							Length (cm)	Width (cm)	Thickness (mm)	Weight (g)	Color	Shape
<i>in vitro</i>	100	156.5	31.8	0.8	October 27	15.4	6.7	1.4	3.2	1.6	Green	Flat
<i>in vivo</i> (control)	100	150.0	31.3	0.8	October 20	12.3	6.8	1.4	3.0	1.6	Green	Flat
		NS ^y	NS	NS	**	**	NS	NS	NS			

^z Seeding: 1995. Sept. 13, Greenhouse. Cultivar: 'Misasa'.

^y t-test **: $P < 0.01$, *: $0.01 < P < 0.05$, NS; not significant.

考 察

実験 1 において、試験管内で、開花後、莢の長さは 10~13 日まで急激に増加し、種子は 16 日まで急激に肥大し、莢の枯れ上りは 36~40 日後であった。これはほ場栽培における莢および種子の発育パターンとよく似ていた。1 個体当たりの結実数は、供試した 3 品種とも 2.0~2.4 粒と少なかった。これは、試験管内で結莢し、種子の肥大が始まると、主枝の伸長が衰え、次の開花がほとんどみられなくなるためである。培養条件という特殊な環境の下、小さな培養植物体にとって、種子の生産は大きな負担であると思われる。このことは、実験 4 において、結莢した莢を除去すると、次の開花と再結莢が認められたことから推察できる。なお、実験 4 の 40 日摘除区の開花と再結莢が早かったのは、40 日までに種子の生長と登熟が終了し、負担が軽減されたためと思われる。

実験 2 の結果は、種子の肥大生長および登熟は 25℃区が 20℃区よりも早くなることを示している。著者らはまた、'美笹' の種子を無菌播種し、25℃の温度条件で培養した場合、20℃よりも結莢（莢長が約 2.5 cm となった時）までの日数が 4.4 日早くなることを認めている（藤岡ら、1999）。さらに、子房培養において子房内胚珠の発芽は、25℃で培養した場合、20℃よりも早くなることも報告している（藤岡ら、1986）。これらの結果とあわせて考えると、25℃区は 20℃区よりも 1 世代に要する期間を短縮できることになる。

'美笹' を供試した実験 3 において、開花後 10 日目および 15 日目の莢は 100% 発芽したが、未熟種子では発芽率が低く、若い生育ステージでは未熟種子よりも莢を培養する方が次代植物の再生率が高かった。この結果は、Srivastava ら (1980) の報告と一致する。生育ステージの若い開花後 20 日以前の莢および未熟種子では、開花までに多くの日数を要したのは、開花節位が上がったためではなく、発芽までに時間がかかったためと考えられる。置床から開花までの日数に莢の生育ステージの日数を加えた日数、つまり、開花日から開花日までの 1 世代に要した日数が最も短くなったのは、開花後 25 日目莢の 81.8 日または開花後 30 日目未熟種子の 82.0 日であった。両区は発芽率、開花率、結莢率がともに 100% であったことから試

Fig. 3. *In vitro* pea pod culture for hastening the alternation of generation.

I Plant pod, II Germination of seed, III Growth and flowering, IV Pod setting, V Extraction of pod, VI Repeat

験管内で世代促進を行う場合、置床する外植体として最も適していると考えられる。すなわち、'美笹' のような早生で節間の短い絹さや品種では、開花後 25 日目の莢または 30 日目の未熟種子を採取し、再び培養することにより、一世代約 82 日のサイクルで試験管の中でエンドウの世代を進められることがわかった。培養によるこの一世代の期間は、ほ場での世代促進と比較して短い。

莢を培養する方が未熟種子を培養するより省力的であることから、著者らは莢培養を利用した試験管内世代促進法を考え、その手順を第 3 図に示した。すなわち、エンドウの莢を試験管内の培地に置床して培養する。莢内の種子から発芽させて、さらに植物体を生育させ、試験管内で開花、結莢させる。生育が進み、白化してきた莢を摘出し、再び培養を繰り返すことにより、次代植物を育て、世代を進めるという方法である。一世代に要する期間は、培養温度を 25℃とすることにより、また別の実験結果から、照度を 10,000 lx、照明時間を 24 時間とすることにより（藤岡ら、1999）、さらに短縮されると思われ、早生で節間の短い絹さや品種では、1 年に 4~5 世代を進められることになる。軽部ら (1986) は、絹さやエンドウの育種において、ほ場で年間 3 回の世代促進を行っているが、試験管内世代促進法を用いれば、さらに、育種期間を短縮できると考えられる。

Fig. 4. Scheme for accelerating generation turn-over by *in vitro* culture of peas.

エンドウなど自殖性作物の育種法の1つである集団育種法は、交雑後F₂世代からF₆世代位まで選抜を行わないで採種を繰り返し、世代を重ねて遺伝的な固定を進める方法である(松尾, 1978)。この方法ではF₂世代からF₅世代を短期間で進め、育種年数を短縮することができる。著者らは、集団育種法のこの過程に莢培養を利用した試験管内世代促進法を利用することができると考えた(第4図)。まず、交配後のF₂種子をほ場で採種し、滅菌して試験管内には種する。ここで生育した植物に結実した莢を再び培養し、試験管内で世代を促進する。選抜のためのほ場栽培への移行は、馴化の過程を必要とせず、試験管内登熟種子をほ場に直接は種することにより可能である(実験5)。

試験管内世代促進法では、実験1の結果からもわかるように、1個体の結実数や結実数は、多くの場合1~2と少ないので、培養中、雑菌汚染や事故などで個体数を減らさない注意が必要である。実験4の結果は、結実した莢を摘除して更に植物体の培養を続けることにより、貴重な種子を予備として採種できることを示している。試験管内世代促進法は育種期間の短縮以外に、1個体に要するスペースが試験管1本分であるため、ほ場での世代促進に比べて、少ない面積で育種を行える利点がある。また、開花期の早晩性、節間長(藤岡ら, 1990)、茎えそ病抵抗性(藤岡, 1992)などの形質は、試験管内においても選抜できることを著者らは別の研究により確かめており、これらの手法と組み合わせることにより、有効な育種法となると考えられる。

摘 要

早生で節間の短い絹さやエンドウ品種を供試して、試験管内における莢の生長と結実数を調査し、さらに、試験管内で結実した莢または未熟種子を培養して、次代を開花、結実させ、一世代に要する期間を把握し、世代交代のための最適な培養法を検討した。また、試験管内世代促進技術の実際育種における利用法を考察した。

1. 試験管内における1個体当たりの結実数は品種によって若干の差があるものの、2.0~2.4粒であった。
2. 25℃で培養した場合、20℃に比べて種子の肥大生長および登熟は早くなった。
3. 試験管内において開花後25日目の莢または30日目の未熟種子を採取し、再び培養することにより、一世代約82日のサイクルでエンドウの世代を進められることがわかった。
4. 試験管内で結実した莢を摘除し、培養を続けると、再び開花、結実した。摘除時期が早いほど、個体当たりの総結実数が増加した。
5. 試験管内で結実し、登熟した種子は、馴化の必要がなく、直接ほ場には種できた。
6. 試験管内における世代促進は、エンドウの莢を培地に置床し、莢内の種子(胚珠)から発芽させて、植物体を生育させ、開花後結実した莢を摘出し、再び培養を繰り返すことにより可能と考えられた。この莢培養を利用した試験管内世代促進法を集団育種法の一過程に利用することにより、育種期間を短縮できると考えられた。

引用文献

- 藤岡唯志. 1992. 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 エンドウの茎えそ病抵抗性個体の選抜. 農業技術. 47: 88-91.
- 藤岡唯志・藤田政良・宮本芳城. 1986. エンドウの育種における組織培養利用による世代促進法の開発第1報 培養器内における開花, 着莢と子房培養. 園学要旨昭61秋. 216-217.
- 藤岡唯志・藤田政良・宮本芳城. 1987. エンドウの育種における組織培養利用による世代促進法の開発 第2報 子房培養による試験管内世代促進法. 園学要旨昭62秋. 242-243.
- 藤岡唯志・宮本芳城・岩本和也・藤田政良. 1990. 培養植物におけるエンドウの節間伸長性検定法. 園学雑. 59別1. 230-231.
- 藤岡唯志・藤田政良・宮本芳城. 1999. 無菌発芽したエンドウの *in vitro* での開花, 結莢. 園学雑. 68: 117-123.
- 軽部 稔・市 和人・宝満正治・岩下友記. 1986. キヌサヤエンドウ新品種「初姫」「春姫」の育成. 鹿児島農試研報. 14: 1-5.
- 松尾孝嶺. 1978. 育種学. p.179-184. 養賢堂. 東京.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Srivastava P. S., A. Varga and J. Bruinsma. 1980. Growth *in vitro* of fertilized ovules of pea, *Pisum Sativum* L., with and without pods. *Z. Pflanzenphysiol.* 98. S: 347-354.