

## トウガラシ本葉からの不定芽形成に及ぼす培養条件の影響

加藤 鎌司・松本 満夫<sup>a)</sup>・下田 裕子<sup>b)</sup>・山崎 茂久<sup>b)</sup>  
島村 文男<sup>b)</sup>

(作物機能調節学講座)

Effect of Culture Conditions on *in vitro* Induction of Adventitious Buds from Leaf Explant in Pepper (*Capsicum annuum* L.)Kenji Kato, Mitsuo Matsumoto<sup>a)</sup>, Yuko Shimoda<sup>b)</sup>,  
Shigehisa Yamasaki<sup>b)</sup> and Fumio Shimamura<sup>b)</sup>

(Department of Eco-physiology for Crop Production)

Effect of culture conditions on *in vitro* induction of adventitious buds from leaf explant was studied in pepper cv. 'Shosuke' (*Capsicum annuum* L.), to establish mass propagation method of genic male sterile line, 'ms-Shosuke', which is in practice used for hybrid seed production. Leaf explant was trimmed from aseptically grown seedling, and a proximal quarter part of the leaf along with a small portion of petiole was placed on MS agar medium with the proximal cut end embedded in the medium. The cultures were kept at 27°C, and illuminated for 16 hours per day (3000 lux).

Leaf explants trimmed from 30 days old seedlings were inoculated on MS media supplemented with different concentrations of zeatin and casein hydrolysate (Table 1), and of BAP and IBA (Table 2). Adventitious buds were induced at high frequency on all of the culture media. Among them the following media were recommended: one to be supplemented with 3mg/l zeatin and 100mg/l casein hydrolysate, and the other with 3~5mg/l BAP and 0.2mg/l IBA. Physiological age of leaf explant, which was expressed as seedling age, proved to be a crucial factor to determine differentiation ability. Average number of adventitious buds induced from an explant was more than 12, when the explant was trimmed from 25 days old seedling (Table 3). It was therefore concluded that just unfolded young leaf should be used as explant.

To promote the development of shoots from adventitious buds, the cultures were transferred to MS medium supplemented with 1mg/l zeatin. Then well developed shoots were dipped in 1mg/l IAA solution for three days and aseptically grown on vermiculite, resulting in the establishment of plantlets with roots. Although rooting occurred in all shoots, the efficiency of shoot development from adventitious buds was only 21% in the best case (Table 4). Therefore the culture method must be further improved to increase efficiency.

Key words : tissue culture, adventitious bud, pepper, *Capsicum annuum* L.

## 緒 言

トウガラシ属のピーマンでは栽培品種のすべてが F<sub>1</sub> 品種であるが、花器が小さいことなどの理由によ

---

Received October 4, 1995

a) 高知県農業技術センター  
(Kochi Agricultural Research Center)

b) 高知大学農学部  
(Faculty of Agriculture, Kochi University)

り除雄・交配操作に多大な労力を必要とする。このために、遺伝的雄性不稔を利用したF<sub>1</sub>採種法の開発が求められている。ピーマンにおいては、細胞質と核内遺伝子の相互作用による雄性不稔<sup>6)</sup>と単一劣性の核内遺伝子による雄性不稔<sup>6,13)</sup>が知られており、わが国のF<sub>1</sub>育種においては後者が利用され始めている。しかしながら、この系では雄性不稔系統の維持が困難であり、維持系統と交雑しても雄性不稔個体の出現頻度は最大で $\frac{1}{2}$ である。従って、第1花開花時に花器形態を観察して正常個体を除去する必要がある。

雄性不稔系統の維持・増殖法としては、上述のような人工交雑による方法の他に組織培養法を利用したクローン増殖も考えられる。トウガラシにおいては、子葉の培養によって葉柄基部から多数の不定芽が形成されることが知られている<sup>2-5,7,10,12,15)</sup>。しかもカルスを経由せずに個体が再生するので、ソマクローナル変異も生じないと考えられる。従って、組織培養法を利用した雄性不稔系統の大量増殖が可能と考えられるが、子葉は外植体として不適当である。というのは、雄性不稔個体の同定は第1花開花時に初めて可能となるが、その時には子葉は枯死しているからである。一方、本葉からの不定芽形成も可能であり<sup>1)</sup>、子葉に代わる外植体として注目されるが、この培養系での不定芽形成率は40%にすぎず、雄性不稔個体の大量増殖法として実用化するためには更なる改良が必要である。

そこで本研究では、高知県で育成されたF<sub>1</sub>品種‘トサヒメ’の母親として利用されている雄性不稔系統の原品種‘昌介’を供試して、本葉からの不定芽形成効率に及ぼす植物生長調節物質および本葉の発育ステージの影響について検討した。

### 材料と方法

実験材料としてトウガラシの大果群<sup>9)</sup>に属する品種‘昌介’を供試した。種子を70%エタノールに10秒間、3%次亜塩素酸ナトリウムに20分間浸漬・撈はんした後、滅菌水で3回洗浄して滅菌した。これを播種培地に播種し、27°C、16時間照明(3000 lux)のインキュベーター内で無菌的に生育させた。播種培地はショ糖無添加の $\frac{1}{2}$ MS培地<sup>9)</sup>であり、pH5.8に調節した後寒天7.5 g/lを添加し、オートクレーブで121°C、15分間加圧滅菌した。

本葉の基部側から $\frac{1}{4}$ を葉柄の一部も加えて切り出

したものを外植体として用い、葉柄の基部が培地中に入るように外植体の表側を上にして不定芽誘導培地に置床した。不定芽誘導培地にはショ糖30 g/l、寒天9 g/l、後述の植物生長調節物質及びカゼイン加水分解物を添加したMS培地を用いた。

本葉からの不定芽形成に最適な培地組成を知るための実験の第1として、ゼアチン1, 2, 3 mg/lとカゼイン加水分解物(以下、CHと略す)0, 50, 100 mg/lを組み合わせて添加した合計9種類の培地を用い、発芽後30日苗の初生葉切片をそれぞれ20切片ずつ培養した。また実験2では、BAP(ベンジルアミノプリン)3, 5, 7 mg/lとIBA(インドール酪酸)0, 0.2, 0.5 mg/lを組み合わせて添加した合計9種類の培地を用い、発芽後30日苗の初生葉切片をそれぞれ30切片ずつ培養した。実験3では、初生葉を採取する苗の齢を検討するために、実験2で最適と考えられた培地組成、即ちBAP 5 mg/lとIBA 0.2 mg/lを添加した培地を用い、発芽後25, 32, 39, 46, 53及び60日苗の初生葉切片をそれぞれ30切片ずつ培養した。

切片置床後、前述のインキュベーター内で21日間培養し、不定芽を形成した切片数と不定芽数とを調査した。この結果より、不定芽形成率(不定芽形成切片数 $\times$ 100/置床切片数)と形成不定芽数(不定芽数/不定芽形成切片数)を求め、最終的には、両者を乗じて置床切片当り不定芽数(以下、形成効率と略す)とし不定芽形成能の評価基準とした。

調査終了後、外植体から切り取った不定芽形成部をシュート形成培地に置床し、約3週間毎に新鮮培地へ移植した。シュート形成培地にはショ糖30 g/l、寒天9 g/l及びゼアチン1 mg/lを添加したMS培地<sup>9)</sup>を用いた。2~3 cmの長さに生長したシュートを切り取り、切口をIAA(インドール酪酸)1 mg/lの溶液に3日間浸漬することによって発根を促し、その後水で湿らせたパーミキュライトに挿して植物体にまで生育させた。

### 結 果

**実験1**：ゼアチンとCHを組み合わせてトウガラシ本葉を培養した結果、培地と接触している葉柄基部の切断面において多数の不定芽が観察された(Fig. 1-a, b)。得られた結果はTable 1に示した通りであり、いずれの処理区においても高頻度で不定芽が形

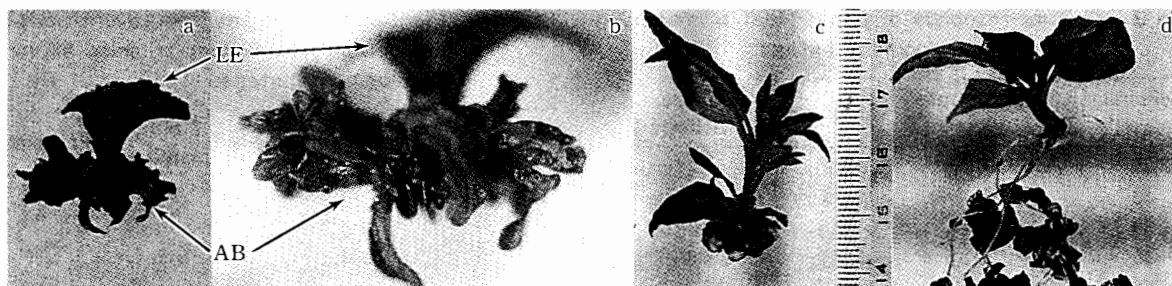


Fig. 1 Plant regeneration from leaf explant in pepper.  
 a,b) Multiple adventitious buds (AB) differentiated at the proximal cut end of leaf explant (LE)  
 c) Shoot developed from adventitious bud  
 d) Regenerated plantlet

Table 1 Culture response of pepper leaf, trimmed from 30 days old seedling, at different concentrations of zeatin and casein hydrolysate

Zeatin	Casein hydrolysate (mg/l)											
	0	50	100	mean	0	50	100	mean	0	50	100	mean
	Induction rate <sup>1)</sup> (%)				No. of buds <sup>2)</sup>				Culture efficiency <sup>3)</sup>			
1 mg/l	80	85	80	82	4.6	5.7	5.8	5.3	3.7	4.9	4.6	4.4
2	95	85	84	88	5.9	6.9	5.9	6.3	5.6	5.9	5.0	5.5
3	79	90	95	88	7.7	7.7	9.8	8.4	6.1	6.9	9.3	7.4
Mean	84	87	86	86	6.1	6.8	7.1	6.7	5.1	5.9	6.3	5.8

- 1) Percent of explants induced adventitious bud
- 2) Average number of buds per explant induced adventitious bud
- 3) Average number of buds per inoculated explant

Table 2 Culture response of pepper leaf, trimmed from 30 days old seedling, at different concentrations of benzylaminopurine and indolebutyric acid

Benzyl-aminopurine	Indolebutyric acid (mg/l)											
	0	0.2	0.5	mean	0	0.2	0.5	mean	0	0.2	0.5	mean
	Induction rate (%)				No. of buds				Culture efficiency			
3 mg/l	97	87	100	94	5.4	7.2	6.9	6.5	5.2	6.3	6.9	6.1
5	87	87	83	86	4.8	7.3	4.8	5.5	4.2	6.3	4.0	4.8
7	70	77	40	62	5.1	6.3	4.9	5.3	3.6	4.8	2.0	3.5
Mean	84	83	74	81	5.1	6.7	5.5	5.8	4.3	5.8	4.3	4.8

成されることが明らかとなった。不定芽形成率はどの処理区でも79%以上と高い値を示し、ゼアチン及びCHの濃度による違いは統計的に有意ではなかった。これに対して、形成不定芽数はゼアチン濃度によって異なり、1~2 mg/l区では6.9以下であったのに対し、3 mg/l区では7.7以上の高い値を示し、その結果形成効率も増加した。また、統計的に有意ではないが、CHの添加により形成不定芽数が増加する傾向が認められた。そして、最も成績が良かった処理区、ゼアチン3 mg/lとCH 100mg/lを組み合わせ

た処理区では、1枚の本葉を置床することによって9.3個の不定芽が形成されることが示された。

実験2：BAPとIBAを組み合わせの場合にも、すべての処理区において培地と接触している葉柄基部の切断面において多数の不定芽が形成された (Table 2)。不定芽形成率はIBA濃度の影響を受けなかったが、BAP濃度の影響は大きく、7 mg/l区では77%以下であったのに対し、3 mg/l区では平均94.4%と高い値を示した。これに対して、形成不定芽数に対するBAP及びIBA濃度の効果は統計

Table 3 Culture response of pepper leaf trimmed at various developmental stages

Seedling age (days)	Induction rate (%)	No. of buds	Culture efficiency
25	100	12.7	12.7
32	95	7.1	6.7
39	20	1.5	0.3
46	37	2.1	0.8
53	10	1.7	0.2
60	5	4.0	0.2
F-value	48.0**	14.0**	22.4**

Culture medium is supplemented with 5mg/l BAP and 0.2mg/l IBA

\*\* : Significant at 1%

的に有意ではなかったが、IBAを0.2mg/l添加することにより増加する傾向が認められた。以上の結果より、BAP 3~5 mg/lとIBA 0.2mg/lの添加が最も効果的であり、1枚の本葉から6個以上の不定芽が形成されることが示された。

**実験3**：発芽後日数の異なる苗の本葉を培養した結果はTable 3に示した通りである。不定芽形成率は32日齢以下の苗では95%以上と高い値を示したのに対し、39日以上では激減し平均で20%であった。これに対して、形成不定芽数は25日苗で12.7と最も高く、32日苗では7.1と半減し、39日以上ではわずかに形成される程度であった。その結果、形成効率は25日苗の12.7が最高であり、32日苗では半減し、39日以上では1以下であった。これらのことから、本葉の不定芽形成能は発芽後25日から39日にかけて急激に低下し、39日以降はほとんど失われることが明らかとなった。

実験3において形成された不定芽をシュート形成培地に移植したところ、558個の不定芽のうち91個がシュートにまで発育した (Table 4, Fig. 1-c)。シュート形成率も苗齢によって大きく異なり、25日苗で2.7と高い値を示したのに対し、32日齢以上の苗では0.08と極端に低い値を示した。このことは、不定芽の誘導だけでなく、その後の発育も外植体の発育段階に影響されることを示している。ただし、25日苗においても形成された不定芽がシュートにまで発育する割合は21%と低かったため、今後の改良が望まれる。

発根処理後の発根率は100%であり、すべてのシュートが正常に発根して小植物体に生長した (Fig. 1-d)。

Table 4 Plantlet development from adventitious buds induced on leaf explant trimmed at various developmental stages

Seedling age (days)	No. of buds	No. of plantlets	Efficiency <sup>1)</sup>
25	382	81	2.7
32	135	2	0.1
39	9	0	0
46	23	7	0.2
53	5	1	0
60	4	0	0
total	558	91	0.6

1) Efficiency=(No. of plantlets)/(No. of explants)

## 考 察

トウガラシにおいてはF<sub>1</sub>種子の採種効率を高める上で、雄性不稔系統の維持・増殖法の開発が求められており、その1つとして組織培養による大量増殖法が考えられる。そこで本研究において、無菌苗の本葉を外植体として培養したところ、子葉培養と同様の培地において効率よく不定芽が形成されることが判明した。従って、雄性不稔個体の本葉を培養することによって雄性不稔系統を大量に増殖できることが明らかである。単一劣性の核内遺伝子による雄性不稔の場合には、まずヘテロ個体の自殖次代を無菌的に育苗して、第1花開花時に雄性不稔の分離個体を同定する。その本葉を培養すれば多数の雄性不稔個体が形成され、しかも再生個体の本葉を次の培養のための外植体として利用できる。従って、このサイクルを繰り返すことによって雄性不稔系統を大量増殖できると考えられる。

培地に添加する植物生長調節物質について検討した結果、'昌介'はBAPとIBAの培地よりもゼアチンとCHの培地の方が適していることが明らかとなった (Tables 1, 2)。ただし、品種によって最適培地が異なることがあり<sup>7,11)</sup>、トウガラシの子葉培養においても'昌介'はゼアチン培地が最適であったが、BAP添加培地を最適とする品種も多かった<sup>7)</sup>。また実用化を考えた場合、BAPとIBAの培地は低コストというメリットがあるので、本研究ではこの培地を用いて苗齢の影響を調べた。その結果、発芽後25日経過した苗の展開直後の本葉であれば、すべての外植体において平均12.7個の不定芽が形成されることが明らかとなった (Table 3)。従来の研究では、

約4割の外植体において5~8個の不定芽が形成されたに過ぎないので<sup>1)</sup>、培養効率が約5倍に向上したといえる。この原因としては、培養に用いた外植体の相違、及びBAPとIBAの濃度を下げたことなどが考えられる。子葉培養においては不定芽形成能に及ぼす外植体の影響が詳細に調べられており<sup>5,14,15)</sup>、発芽後日数の増加にともなって低下すること、子葉の部位別では基部ほど優れていること、そして葉柄部を取り除くと大幅に低下することが知られている。これらのことから推察すると、本研究においては、展開直後の若い本葉を葉柄の一部を付けて培養したために、高頻度での不定芽形成が可能になったと考えられる。

形成された不定芽が発育して植物体になるためには、まず不定芽が発育してシュートとなり、その後発根する必要がある(Fig. 1)。このうちシュートからの発根率は100%であったのに対して、不定芽からのシュート形成率は最高でも21%に過ぎなかった。この点に関連して、BAPもしくはカイネチンを含む不定芽誘導培地にアンチオーキシンのTIBA(2,3,5-triiodobenzoic acid)を添加すると、子葉切片当たりのシュート形成数が2倍以上に増加することが知られている<sup>2)</sup>。この現象については、TIBAにより子葉中の内生オーキシンの移動が阻害され、その結果として、不定芽形成部において頂芽優性が働かないためと考えられている。このことからすると、本研究において不定芽からのシュート形成率が低かったのは、不定芽形成部における頂芽優性に起因するものと考えられる。従って、本葉培養においても不定芽誘導培地もしくはシュート形成培地にTIBAを添加することによって、シュート形成率が飛躍的に向上することが期待されるので、今後の更なる検討が必要と考えられる。

## 要 約

組織培養法を利用した雄性不稔系統の大量増殖法を開発するために、トウガラシ本葉からの不定芽形成に最適の培養条件について検討した。実験にはトウガラシ品種‘昌介’を供試し、初生葉の基部側1/4を葉柄の一部を付けて切り出した切片を外植体として以下の実験を行った。

1. 発芽後30日苗の本葉切片を用いて不定芽誘導培地の組成について検討した。その結果、ゼアチン

3 mg/ℓ + カゼイン加水分解物100mg/ℓ、もしくはBAP 3~5 mg/ℓ + IBA 0.2mg/ℓを添加した培地が適していることが明らかとなった。

2. 上の実験で明らかになった好適培地(BAP 5 mg/ℓ + IBA 0.2mg/ℓ)を用いて、発芽後25~60日苗の初生葉を培養した。その結果、25日苗では外植体あたり12.7個の不定芽が形成されたが、苗齢とともに不定芽形成能が低下することが明らかとなった。

3. 以上の結果より、展開直後の若い本葉を上記2種類の培地に置床すれば、多数の不定芽が形成されることが明らかとなった。ただし、不定芽のうち植物体にまで生長したのは約2割と低頻度であったので、培養法の更なる改良が必要と考えられる。

## 謝 辞

本研究計画の立案にあたり有益な助言を賜った高知大学農学部元教授の(故)林喜三郎博士に厚く御礼申し上げる。また、研究費の一部は農林水産省「地域バイオテクノロジー研究開発促進事業」による。記して謝意を表す。

## 文 献

- 1) Agrawal, S., N. Chandra and S.L. Kothari: Plant regeneration in tissue cultures of pepper (*Capsicum annum* L. cv. mathania). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **16**, 47-55 (1989)
- 2) Christopher, T. and M.V. Rajam: *In vitro* clonal propagation of *Capsicum* spp. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **38**, 25-29 (1994)
- 3) 葛 麟・笹隈哲夫・田中正武: トウガラシ属の組織培養の研究. I. 育種, **36** (別冊1), 16-17 (1986)
- 4) Gunay, A.L. and P.S. Rao: *In vitro* plant regeneration from hypocotyl and cotyledon explants of red pepper (*Capsicum*). *Plant Sci. Lett.*, **11**, 365-372 (1978)
- 5) 林喜三郎・楊 志慶・加藤謙司: トウガラシの不定芽形成に及ぼす子葉外植体及び培養条件の影響. 高知大学学術研究報告, **37**, 153-159 (1988)
- 6) 広瀬忠彦・藤日幸広: ビーマンの新雄性不ねん系利用によるF<sub>1</sub>採種(第1報)新雄性不ねん系の形態及び遺伝様式. 園学雑, **48**, 453-458 (1980)
- 7) 加藤謙司・鈴木陽子・野村知之・林喜三郎: トウガラシ子葉からの不定芽形成能に及ぼす品種・培地間相互作用の影響. 高知大学学術研究報告, **40**, 19-32 (1991)
- 8) 熊沢三郎・小原 起・二井内清之: 本邦におけるとうが

- らしの品種分化. 園学雑, **23**, 152-158 (1954)
- 9) Murashige, T. and F. Skoog : A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.*, **15**, 473-497 (1962)
- 10) 長尾照義 : ピーマンの細胞質雄性不稔系統の増殖. クローン植物大量生産の実際技術(田中隆荘監修), pp.33-37, CMC, 東京 (1985)
- 11) Ochoa-Alejo, N. and L. Ireta-Moreno : Cultivar differences in shoot-forming capacity of hypocotyl tissues of chilli pepper (*Capsicum annuum* L.) cultured *in vitro*. *Sci. Hort.*, **42**, 21-28 (1990)
- 12) Phillips, G.C. and J.F. Hubstenberger : Organogenesis in pepper tissue cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **4**, 261-269 (1985)
- 13) 齊藤誠市 : ピーマン品種 '昌介' の新雄性不稔系統の育成について. 高知県園試研報, **3**, 1-6 (1986)
- 14) Sharma, K.K., S.S. Bhojwani and T.A. Thorpe : The role of cotyledonary tissue in the differentiation of shoots and roots from cotyledon explants of *Brassica juncea* (L.) Czern. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **24**, 55-59 (1991)
- 15) Sripichitt, P., E. Nawata and S. Shigenaga : *In vitro* shoot-forming capacity of cotyledon explants in red pepper (*Capsicum annuum* L. cv. Yatsufusa). *Japan. J. Breed.*, **37**, 133-142 (1987)