

## イネ科牧草未熟胚からのカルス誘導

吉澤 晃(天北農試)・杉信 賢一・高溝 正(草地試)  
筒井佐喜雄・中村 克己・大槌 勝彦(天北農試)

### 緒 言

牧草の品種改良を進める上で、優良形質を備えた育種材料の選抜や作出に、植物組織培養を利用し、培養条件の制御によって特定の変異体を得る方法が考えられている。このような培養細胞からの選抜に際しては、脱分化によるカルス誘導から植物体の再分化までの細胞培養系の確立が重要である。イネ科牧草では、イタリアンライグラスで未熟胚由来カルスが、比較的植物体再分化能の高いことが知られている<sup>3)</sup>。本報では、細胞培養系の確立に役立てるため、イネ科牧草5草種を材料として、未熟胚からのカルスの誘導と生育に及ぼす基本培地と2, 4-D濃度の影響を検討した。

### 材料および方法

表1に示した草種、品種を材料として、これらの乳熟後期の穂を採取し、外穎と内穎を除去した穎果を水洗後70%エタノールに30秒間、さらに1%次亜塩素酸ナトリウム水溶液に20分間浸漬して滅菌した。その後、滅菌水で3回洗浄し、未熟胚を摘出して培養した。

カルス誘導は、基本培地をMS培地<sup>2)</sup>とN6培地<sup>1)</sup>の2水準、2, 4-D濃度を2mg/lと10mg/lの2水準を組み合わせた4処理、3反復で行った。全処理共通に、ショ糖3%、寒天1%、pH6.0として、直径90mm、深さ15mmのシャーレに培地を20ccずつ入れた。シャーレ当り未熟胚を6個置床し、25℃暗黒条件下で培養した。

### 結 果

#### (1) カルス誘導率

未熟胚を培地へ置床後7日目にカルス誘導率を調査した。草種間についてみると、カルス誘導率に品種間差が認められたのは、図1に示したイタリアンライグラスだけであった。同草種はワセアオバのN6培地、2, 4-D 2mg/lだけが低く、ほかは高い値であった。カルスの誘導と同時に胚からの発芽を伴うものもあり(図中斜線部)、サクラワセよりワセアオバが多かった。

品種間差の認められなかったペレニアルライグラス、

表1 供試材料

草 種 名	品 種 名
イタリアンライグラス	サクラワセ・ワセアオバ
ペレニアルライグラス	キヨサト・Grimalda
トールフェスク	ヤマナミ・Manade
オーチャードグラス	アキミドリ・キタミドリ
チモシー	クンプウ

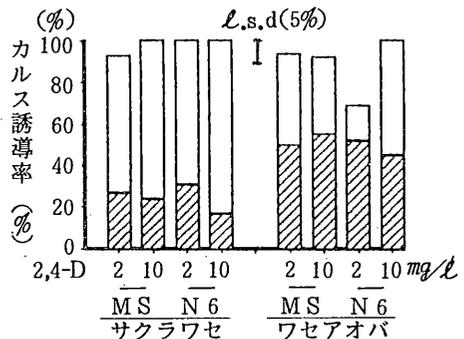


図1 基本培地と2, 4-D濃度がイタリアンライグラスのカルス誘導率に及ぼす影響(斜線部は、カルス誘導に発芽を伴った割合)

トールフェスク及びオーチャードグラスの3草種は2品種の平均値で、それにチモシーを加えて図2に示した。その中で、ペレニアルライグラスの基本培地間だけに有意差が認められ、MS培地よりN6培地の誘導率が低かった。他草種は、いずれも明らかな差が認められなかった。発芽を伴ったカルスの割合(図中斜線部)は、4草種ともN6培地よりMS培地が多く、オーチャードグラスを除いて2, 4-D 10mg/lより2 mg/lで多い傾向がうかがえた。

(2) カルスの生育の推移

カルス誘導後の生育を引き続き同一培地で調査した。生育のめやすとして、カルスの長径と短径から面積を算出し、カルスの大きさとして表した。この値が大きいほどカルスの生育が良好であることを示す。置床後14日目から35日目まで7日間隔で調査し、その推移を図3に示した。まず、品種間差が有意であった草種はオーチャードグラスとイタリアンライグラスで、前者ではアキミドリが大きかった。後者は交互作用も有意だったので後述する。次に、基本培地間では、すべての草種で有意となったが、交互作用も

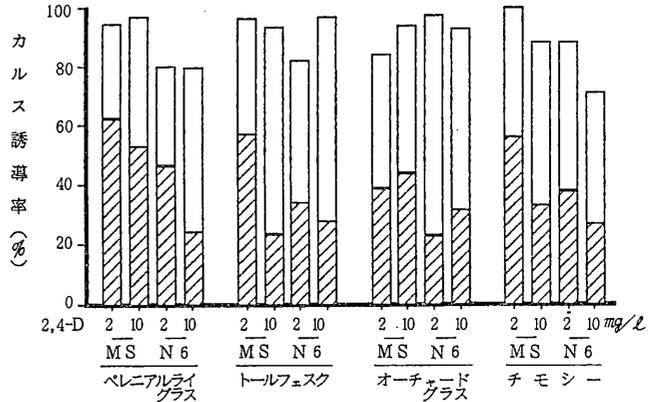


図2 基本培地及び2, 4-D濃度によるカルス誘導率の草種間比較 (斜線部は、カルス誘導に発芽を伴った割合)

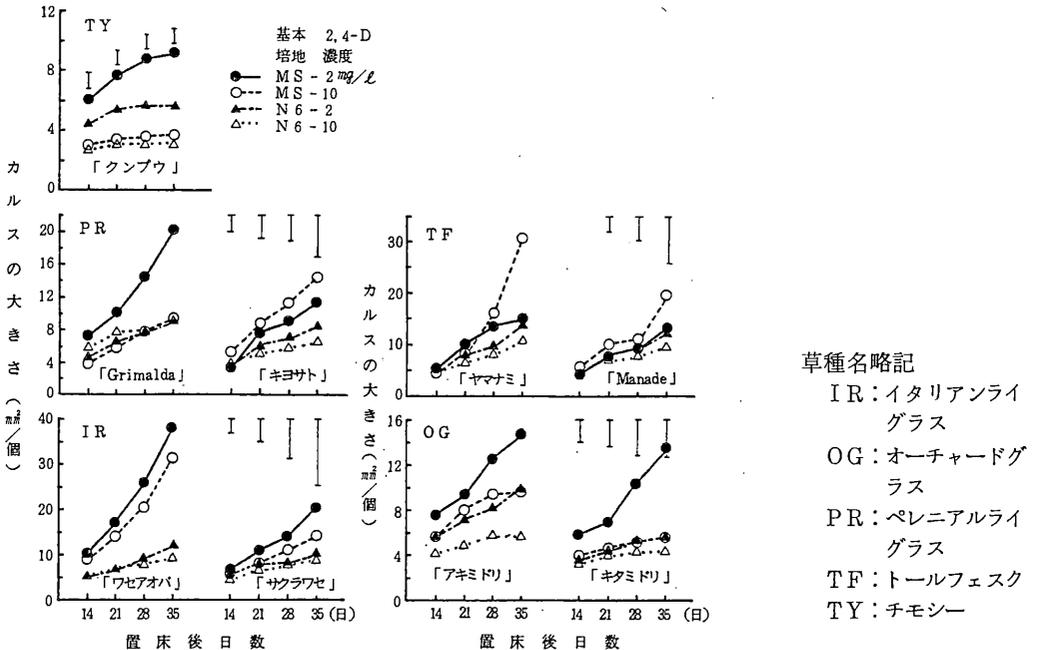


図3 基本培地と2, 4-D濃度がカルスの生育の推移に及ぼす影響

「」内は品種名を、I印は各時期、草種ごとの $l. s. d(5\%)$ を示す。  
 カルスの大きさ(mm<sup>2</sup>/個) = (カルスの長径/2) × (カルスの短径/2) ×  $\pi$

認められた。交互作用では、ペレニアルライグラスを除いて、そのひとつだけが有意となった。草種ごとの特徴は以下のとおりである。

オーチャードグラスとチモシーはMS培地, 2, 4-D 2mg/ℓで, トールフェスクはMS培地, 2, 4-D 10mg/ℓで大きかった。イタリアンライグラスは, 品種で基本培地が大きく, サクラワセでは顕著な差が認められなかった。ペレニアルライグラスは, 三要因の交互作用が有意となって, GrimaldaはMS培地, 2, 4-D 2mg/ℓで, キヨサトはMS培地が2, 4-D濃度にかかわらず大きく, 両者の比較では前者が大きかった。

## 考 察

本実験では, すべての草種でカルスが誘導でき, 誘導率は用いた基本培地及び2, 4-D濃度では, ペレニアルライグラスを除いて差がなく, 高い値を示した。ペレニアルライグラスでは, 胚が直接発芽してカルスを発達しない胚がN6培地で多く, カルス誘導にはMS培地が適すると考えられる。さらに, カルスの生育を合せて考えると, 供試したすべての草種でカルス誘導培地は, N6培地よりMS培地を用いた方が, 誘導から引き続き効率よく培養できる点で有利と思われる。MS, N6両培地の組成で特徴的に異なるのは, 窒素源とその濃度であり, このことがカルスの生育に差異をもたらしたと推察される。

カルス誘導に2, 4-D濃度の影響は認められなかったが, その後のカルスの生育では, 草種, 品種で異なる傾向がみられた。植物ホルモンの影響では, 杉信ら<sup>3)</sup>がイタリアンライグラスの未熟胚からのカルス誘導と再分化について, MS培地を用いて2, 4-Dとベンジルアデニン(BAP)の相互作用を検討し, カルス形成にはBAP濃度の影響はないものの, 2, 4-D濃度の高い方(4mg/ℓ)が良好であり, 再分化割合は2, 4-D濃度が低く(1mg/ℓ), BAP濃度の高い方(2mg/ℓ)が優れることを報告した。本実験のイタリアンライグラスでは, 2, 4-D濃度による有意な差が認められなかった。しかし, 2mg/ℓのカルスの大きさは, 各調査時期を通して大きい傾向がうかがえることから, 10mg/ℓではカルスの誘導, 生育にとって高濃度すぎるであろう。また, 草種によって異なる傾向が認められたことから, 今後は本実験で検討しなかった, 再分化まで考慮した植物ホルモンの種類と濃度について, 草種ごとの最適条件を検討する必要がある。

## 引用文献

- 1) Chu Chih - Ching, Wang Ching - Chu & Sun Ching - San (1975) Establishment of An Efficient Medium for Anther Culture of Rice Through Comparative Experiments on the Nitrogen Sources. Scientia Sinica 18: 659 - 668.
- 2) Murashige, T. & F. Skoog (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. Rhysiol. Pl. 15: 473 - 497.
- 3) 杉信賢一, 岡田忠篤・高溝 正(1987)未成熟胚利用によるイタリアンライグラスのカルス誘導及び植物体の再分化. 日草誌 33 (別号): 252 - 253.