

## 2倍体アルファルファの不定胚形成

小池正徳・嶋田 徹 (帯広畜産大学)

Somatic embryo formation of diploid alfalfa

Masanori KOIKE and Tohru SHIMADA.

(Obihiro Univ. of Agric. & Vet. Med., Obihiro, 080 Japan)

### 緒 言

ストレス抵抗性の細胞選抜を効果的に行なうためには、その遺伝的側面を明らかにする必要があるが、アルファルファの場合、2倍性の材料で再分化効率の高い安定した系があると、解析しやすく、便利である。

そこで本実験では2倍体アルファルファ (*Medicago sativa* L.) の再分化系作出を目的とし、奥村氏の提案した2段階法<sup>1)</sup> および不定胚誘導処理を行なう3段階法<sup>2)</sup> を用いて2倍体アルファルファの不定胚形成を検討した。

### 材料および方法

(供試植物) 2倍体アルファルファ (*M. sativa* L.,  $2n=16$ , PI 172989, トルコ原産, 草地試験場・杉信賢一氏より分譲) を供試した。

(2段階法<sup>1)</sup>)

2倍体アルファルファの種子を次亜鉛素酸ナトリウムで15分処理し、ハイポネックス寒天培地 (ハイポネックス 1g/l, 寒天 0.8%) に無菌播種した。発芽後、子葉が展開した時点で、子葉は1枚ごとおよび胚軸は約5mmごとに切断し、それぞれカルス形成培地に置床した。カルス形成培地はSH培地<sup>3)</sup> を基本とし、2.4-D 5mg/l, カイネチン 2mg/l, ショ糖 3%, 寒天 0.8% で加え、pH 5.8に調整して用いた。置床後30日、形成されたカルスについて、子葉由来のカルスは直径約5mmのカルス片に切断し、胚軸由来のカルスはそのままの状態では、不定胚発育培地 (SH, 50mM プロリン, 22.4mM,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) に移植した。移植30日後の不定胚形成を観察した。カルス誘導は暗所・25℃ならびに不定胚形成は明所・25℃で行なった。

(3段階法)

本法はBrownらの方法<sup>2)</sup> を改変したものである。無菌播種は2段階法と同様に行なった。カルス形成培地にはSH培地を基本とし2.4-D 1mg/l, カイネチン 0.1mg/l ショ糖 3%, 寒天 0.8% を加え、pH 5.8 に調整して用いた。植物片置床は2段階法と同様に行なった。置床30日後に、不定胚誘導培地 (SH+2.4-D 11.1mg/l, カイネチン 1.1mg/l) で3日間処理した。次に不定胚発育培地に移植し、30日後に不定胚形成を観察した。培養環境は2段階法と同様に設置した。

### 結果および考察

それぞれの処理区において、カルスは100%形成された (表1)。部位で比較すると子葉由来カルスは

大きく柔らかであり、胚軸由来のカルスは小さめでややかたかった。処理方法で比べると2段階法はカルス形成が早く、やや褐変するものもあった。各処理区における不定胚形成率を表2に示した。2段階法における子葉由来カルスの不定胚形成率が12.9%と高く、不定根の形成が2つのカルスで認められた。2段階法における胚軸由来のカルス、

3段階法の子葉ならびに胚軸由来のカルスの不定胚形成率はそれぞれ5.6%, 6.7%, 4.9%であった。奥村らは<sup>1)</sup> 2段階法を用いて4倍体のアルファルファの栽培品種の不定胚形成を見た。その結果、C.V. Roamerの6.9%を最高に、殆どの品種で3.0%以上の不定胚形成を認めた。筆者も別に同様な結果を得ている(未発表)。2培体アルファルファを用いた本実験でも、2段階法がやはり3段階法より形成率が高かったが、2段階法の有効性はそれほど顕著に認められなかった。

今後、本実験で得られた不定胚を小植物体まで育成しその個体の染色体数などを確認し、ストレス耐性の細胞選抜の実験に供試していきたい。

表1 子葉および胚軸部のカルス形成率

	子葉(カルス形成/置床切片)	胚軸(カルス形成/置床切片)
2段階法 <sup>1)</sup>	10/10 (100%)	56/56 (100%)
3段階法 <sup>2)</sup>	10/10 (100%)	51/51 (100%)

1) SH2.4-D 5 mg/l, カイネチン 2 mg/l  
 2) SH2.4-D 1 mg/l, カイネチン 0.1 mg/l

表2 2倍体アルファルファの不定胚形成

	外植片の位置	カルス数	不定胚形成数 (%)	不定根形成数 (%)
2段階法	子葉	31	4 (12.9%)	2 (6.5%)
	胚軸	54	3 (5.6%)	0
3段階法	子葉	30	2 (6.7%)	0
	胚軸	41	2 (4.9%)	0

引用文献

- 1) 奥村 健治・大澤 勝次 (1988) カルス形成培地中のホルモンがアルファルファの不定胚形に及ぼす影響, 日草誌 34 別号, 35-36
- 2) Brown, D. C.W. and A. Atansow (1985) Role of genetic background in somatic embryogenesis in *Medicago*. *Plant Cell Tissue Org Cult* 4: 111-122
- 3) Schenk BU, Hildebrandt AC (1972) Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can J Bot*: 199-204