

セインフォイン (*Onobrychis viciifolia* Scop.) の実生からのカルス誘導と植物体再生に及ぼす 植物成長調節物質の影響

中嶋 博・楊 苗萌* (北大農)

Effects of plant growth regulators on callus induction and regeneration from callus in sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) seedling

Hiroshi Nakashima and Zhuomeng Yang*

(Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo, 060 Japan)

諸 言

セインフォイン (*Onobrychis viciifolia* Scop.) は乾燥地帯に生育するマメ科牧草である。アルファルファやクローバなどのマメ科牧草は反芻動物に鼓腸症を起こすが、本草種はそれが無いこと、アルファルファタコゾウムシ抵抗性であること、および嗜好性も良好であることなどの特徴を有している。近年注目されている生物工学的手法を応用して、これらの優良形質をアルファルファに導入しようとする試みがなされている。本草種についてのカルス誘導、植物体再生についての植物成長調節物質などの培地の影響についての報告は限られている。また葉肉プロトプラストからの幼植物の再生が報告されている。

本報告はセインフォインの実用的な育種に利用するために必要なより効率のよい個体再生の技術を開発すべく行った。本研究では外植体の部位の違い、遺伝子型の差異についても調査した。

材料及び方法

6品種・系統を供試した(表1)。種子を次亜塩素酸ナトリウム(有効塩素2.5%)に5分間浸漬し、滅菌水で洗浄後、2%シヨ糖と0.8%寒天を含む培地に置床した。最初の5日間暗所に、その後5日間は明所で生育させた。これらの発芽実生を胚軸(H)、根(R)および子葉(C)の3つの部位に分け、それらを外植体として2~3mmにして培養した。カルス誘導はMS培地を基本として、3%シヨ糖、0.8%寒天、pH5.8、植物成長調節物質としてオーキシンの2,4-ジクロロフェノキシ酢酸(2,4-D)またはナフタレン酢酸(NAA)、サイトカイニンとしてベンジルアデニン(BA)を用いた。

Table 1. Materials used in this experiment

Cultivar or Line	Origin	Collection Region
Melrose (L1)	Canada	China
Sainfoin (L2)		Xinjiang, China
L2111	Canada	Saskatchewan pool, Canada
Nova	Canada	
Melrose	Canada	
Matra	Hungary	

Table 2. Combination and concentration of plant growth regulators

2,4-D or NAA	6-Benzyladenine (BA)			
	B ₁ 0 μM	B ₂ 1 μM	B ₃ 10 μM	B ₄ 25 μM
A ₁	0 μM A ₁ B ₁	A ₁ B ₂	A ₁ B ₃	A ₁ B ₄
A ₂	1 μM A ₂ B ₁	A ₂ B ₂	A ₂ B ₃	A ₂ B ₄
A ₃	10 μM A ₃ B ₁	A ₃ B ₂	A ₃ B ₃	A ₃ B ₄
A ₄	25 μM A ₄ B ₁	A ₄ B ₂	A ₄ B ₃	A ₄ B ₄

* 新疆ウイグル自治区・新疆八一農学院草原系、松前国際友好財団招聘研究員

これら2種をそれぞれ4濃度(0, 1, 10, 25 μM)の計16組み合わせの培地を用いた(表2)。9cmのシャーレに、10mlの培地を加えて実施した。カルス誘導は3種の外植体をそれぞれシャーレ当り10個、2反復で行った。培養条件は暗所、25℃である。カルス誘導後の個体再生は植物成長調節物質を含まないMS培地で明所(16時間)約5,000 lux、25℃で行った。

カルス誘導開始日、1週間後のカルス誘導率および1, 2, 4週間毎にカルスの増殖を調査した。カルスの増殖は0(カルスの増殖ほとんどなし)から4(よく増殖)のスコアを与え評価した。

4週間後に植物成長調節物質を添加しない培地に継代培養した。各プレート当り10~25カルスで2反復で行った。2~3週間後にさらに継代した。プレートによっては、茎葉、根および幼植物に分化しているものもあった。得られた結果を統計解析した。

結果および考察

表3には、それぞれの外植体の2,4-DとBA(AB)およびNAAとBA(NB)の組み合わせでの培地からのカルス誘導ならびにカルス増殖についての平均値が示されている。明らかに2,4-Dとの組み合わせの培地でカルスが早く誘導され、

Table 3. Comparison between two different plant growth regulators on callus induction and callus proliferation(mean data from L1 and L2)

	Callus induction		Callus proliferation*		
	Days	Rate(%)	1 wk	2 wk	4 wk
2,4-DxBA					
Hypocotyl	3.87	89.22	30.41	34.98	-
Root	3.45	87.19	27.45	33.11	-
Cotyledon	5.61	75.17	11.17	22.48	-
NAAxBA					
Hypocotyl	6.77	24.95	2.61	8.17	14.69
Root	6.14	30.78	3.42	9.22	14.00
Cotyledon	6.20	47.17	4.73	7.23	11.07

*:0(poor)-4(good)

カルス増殖でも良好な結果を示した。さらに外植体として用いた胚軸と根の方が子葉に比較して、カルスの誘導ならびに増殖は良好であった。NAAを添加した培地では、外植体による顕著な差異は見出されなかった。オーキシンの反応性は外植体により異なり、また2,4-DとNAAとは異なる反応を示すことが明らかとなった。

表4にはそれぞれの植物成長調節物質の異なる濃度の組み合わせの培地で、外植体毎に最も良好なカルス誘導と増殖を示すものの6品種・系統を込みにした場合の平均値の比較を示した。カルス誘導開始日、一週間後のカルス形成率、

Table 4. Comparison between best combination of two plant growth regulators in each explant

	Hypocotyl		Root		Cotyledon	
	A ₁ B ₁	N ₁ B ₂	A ₂ B ₁	N ₂ B ₂	A ₁ B ₂	N ₂ B ₁
Days of callus induction	3.2**	6.8	2.9**	5.7	5.8**	7.2
Rate of callus induction(%)	84.5**	11.7	96.1**	2.9	56.1**	19.4
Callus proliferation(1 wk)	26.6**	1.7	33.0**	5.0	8.9**	2.6
(2 wk)	34.9**	12.1	37.3**	11.2	26.5**	8.1
Callus regeneration						
Green spot (%)	37.5**	65.8	29.2**	56.7	54.2	40.0
Shoot (%)	3.3**	42.5	2.5**	35.0	0.8**	18.3
Root (%)	0.8	0	1.7	0	2.5	0

** : significant at 1% level

カルス増殖はすべて、2,4-Dを含む組み合わせの培地で良好であった。しかし、カルスからの茎葉分化については、外植体として子葉を用いた場合を除きNAAを含む培地で誘導されたカルスの方が良好であった。発根率は2,4-Dで少なく、またNAAでは発根は認められなかった。これらのことから誘導されたカルスに何らかの差異があり、これと形態形成の関連を研究することは興味ある問題である。

表5には2,4-DとBAの組み合わせの培地で系統2(L2)を用いた二週間後のカルス増殖を示した。い

れの外植体においても、2,4-Dが添加されていないA₁培地で増殖は少なかったが、かなり増殖しており内生オーキシンの存在が推定される。BAについても添加されていないB₁培地で少ない傾向であったが、2,4-Dに比べカルス増殖とは関係がないことが明らかとなった。カルス増殖はそれぞれ10 μMの添加培地で良好であった。

図1には2つの異なる組み合わせより誘導・増殖したカルスの継代後の個体再生、茎葉、根の再分化についての概要を示した。NAAを含む培地で誘導・増殖されたカルスは高率で茎葉を再分化するが、幼植物、根の分化は認められない。一方、2,4-Dを含む培地で誘導・増殖されたカルスは幼植物、茎葉および根を細分化している。子葉からのカルスの再分化は低率であった。本実験では2つの遺伝子型を用いたが、差異は言及できなかった。

セイムフォインは茎葉分化はかなり容易であったが、発根率を改善することが今後の課題であり、現在研究を進めている。

摘 要

セイムフォインのカルス誘導とカルスからの効率のよい再分化についての研究を行い以下の結果を得た。

- 1) 2,4-Dを含む培地でカルス誘導・増殖は良好であった。
- 2) 2,4-Dを含む培地よりNAAを含む培地で誘導・増殖されたカルスの方が、茎葉分化は高率であったが、根の分化は認められなかった。
- 3) 外植体として、胚軸、根は同様な傾向を示し有効であったが、子葉は悪かった。

Table 5. Callus proliferation in 2,4-DxBA combination from each explant of line 2 (2 weeks)

Hypocotyl					
	B ₁	B ₂	B ₃	B ₄	\bar{B}
A ₁	16 c*	23.5b	28 b	25.5b	23.3
A ₂	40 a	39.5a	37.5a	39 a	39
A ₃	39.5a	39.5a	40 a	38.5a	39.4
A ₄	39.5a	37 a	38.5a	39 a	38.5
\bar{A}	33.8	34.9	36	35.5	35.0

Root					
	B ₁	B ₂	B ₃	B ₄	\bar{B}
A ₁	22 c	28.5b	26.5bc	23.5c	25.1
A ₂	37.5a	39 a	29.5b	38.5a	36.1
A ₃	30.5b	38 a	37.5a	38.5a	36.1
A ₄	34.5ab	37 a	37.5a	31 b	35
\bar{A}	31.1	35.6	32.8	32.9	33.1

Cotyledon					
	B ₁	B ₂	B ₃	B ₄	\bar{B}
A ₁	10 f	12ef	15 ef	20de	14.3
A ₂	15 ef	24cd	20.5d	17de	19.1
A ₃	32 b	27c	33 b	17de	27.3
A ₄	23.5cd	28bc	39.5a	32b	30.8
\bar{A}	20.1	22.8	27	21.5	22.9

*: different letter shows significant difference

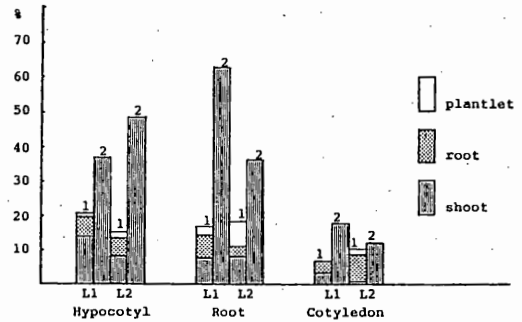


Fig. 1 Regeneration from callus induced from two combinations of plant growth regulators L1:Melrose ,L2:Line 2 1:2,4-DxBA, 2:NAAxBA