

アルファルファ (*Medicago sativa* L.) のカルス および胚様体形成の品種間差異

高橋季之*・亀谷寿昭**

* 日本石油精製株式会社下松製油所
(〒744 下松市東豊井 766)** 東北大学遺伝生態研究センター
(〒980 仙台市青葉区片平 2-1-1)

(1990年1月16日受付)

(1990年3月2日受理)

アルファルファの31品種を用いてカルス形成、再分化に関して検討した。カルスは葉、胚軸、根を NAA 3.7 (mg/l), kinetin (2.2 mg/l) を含む SH 培地 (Shenk and Hildebrandt, 1972) あるいは, 2, 4-D (2 mg/l), kinetin (3.7 mg/l) を含む MS 培地 (Murashige and Skoog, 1962) で培養して作出した。その後カルスをホルモンフリーの培地に移植し再分化を試みた。カルス形成は、品種間および誘導する部位によって異なった。胚様体形成は、SH 培地で3品種、MS 培地では14品種において観察された。品種 Orca はいずれの培地でも胚様体を形成した。さらにホルモンの最適条件を検討したところ、2, 4-D (5 mg/l), kinetin (0.2 mg/l) を含む MS 培地を用いることにより、75% の頻度で胚様体が形成されることがわかった。これらの胚様体はすべて植物個体まで生長した。

アルファルファの組織培養は、1972年 Saunders と Bingham¹⁾ によってカルス状態からの植物体再生が報告されて以来、さまざまな方法、さまざまな品種によって再生が試みられている²⁻⁶⁾。しかしながら供試された品種数は少なく、その他の報告も過去の研究において *M. sativa* で再分化率の高いといわれている品種についてのみにとどまっている⁷⁻¹¹⁾。そこで本研究においては、アルファルファの組織培養における再分化実験で、今まで供試されていない品種のカルス形成及び再分化能について調査をすることにした。さらに再分化の最適条件についても検討した。

1. 材料および方法

供試材料として、アルファルファの次にあげる31品種を用いた。

1: Amasor, 2: Angus, 3: Ardiente, 4: Bayer, 5: Challenge, 6: Decathalon, 7: DuPuits, 8: Endure, 9: Glapiator, 10: Honeoye, 11: Hunter River, 12: Julius, 13: Kara, 14: Lutece, 15: Natador, 16: Nova, 17: Oneida, 18: Orca, 19: Peak, 20: Phytor, 21: Sitel, 22: So Special, 23: Szarvasi, 24: Trident, 25: Vancor, 26:

Veko, 27: Vela, 28: ソア, 29: パータス, 30: ヨーロッパ, 31: ルーサンコンモン

(以下にでてくるアルファルファの品種間差を示した図表での品種の番号は、すべてこの品種番号に従うものとする。)

カルス形成および再分化には、アルファルファにおいて一般的に用いられている2種類の方法を比較して用いることにし、それぞれの再分化の手順については、Table 1 に示した。

種子を70% エタノールで1分間殺菌し、2% アンチホルミンでさらに殺菌を行った後、滅菌水で5回すすいだ。径16.5 mm 長さ110 mm の試験管にショ糖2% を含む0.8% 寒天を10 ml 入れた素寒天上に試験管あたり1粒ずつ各品種20粒置床した。25°C の暗黒条件下で種子を発芽させた後、胚軸の長さが約10 mm になったときに生育の揃っている10個体を選び、その下胚軸を5 mm に切り、各々の方法のカルス誘導培地に試験管あたり1胚軸を置床し、25°C, 3000 lux の連続光条件下で培養した。

カルス誘導培地として、第1の方法は、NAA 3.7

Table 1. Protocol for tissue culture.

Protocol	Reference	Medium sequence (days of culture) [Growth regulator concentration mg/l] and [Other materials]			
		Callus initiate	Pre-culture	Embryoid formation	Plantlet formation
I	[12]	SH (30)	→SH (7)	→SH (30)	→SH (30)
		[3.7 NAA]	[11.1 2, 4-D]	[2 g/l YE]	[0]
		[2.2 kinetin]	[1.1 kinetin]	[0]	
II	[13]	MS (30)	→	→	MS (30)
		[2.00 2, 4-D]			[0]
		[0.25 kinetin]			

YE: Yeast extract.

mg/l+kinetin 2.2 mg/l を含む pH 5.8 の SH 培地¹²⁾に置床し、第2の方法 (Meijer と Brown (1987)¹³⁾の一部改変) では、2, 4-D 2 mg/l+kinetin 0.25 mg/l を含む pH 5.8 の MS 培地¹⁴⁾に置床した。

再分化に関しては、前述の2とおりの方法でカルス形成させたものを、それぞれの再分化条件におき、1カ月後の胚様体形成の比較を行った。培養は、カルス形成能の比較実験と同様に、25°C, 3000 lux の光条件下で行った。

第1の方法では、継代第1代目のカルスを用いた。つまりカルス形成を起こしてから1カ月後、カルス誘導培地と同様の培地にそれぞれのカルスを、もとの植物体の組織から取り除いて継代し、さらに1カ月後に再分化能の調査材料とした。それぞれのカルス 10 mg ずつを 2, 4-D 11.1 mg/l+kinetin 1.1 mg/l を含む pH 5.8 の SH 培地 (前培養培地) 上で7日間前培養した後⁴⁾、Yeast extract 2 g/l を含むホルモンフリーの pH 5.8 の SH 培地 (胚様体再分化培地) に移植し、1カ月後に胚様体形成能を調査した。供試個体数は、各品種1シャーレ当たり 50 個体とし、10 反復行った。その後胚様体形成したものについては、胚様体ごとにホルモンフリーの SH 培地 (植物体再分化培地) に置床して植物体への再分化能を調査した。

第2の方法ではカルス形成後、ホルモンフリーの MS 培地 (pH 5.8) に移植して再分化を調査した。1シャーレ当たり 10 mg ずつ 12 個体のカルスを置床し、それを2反復行った。

また第2の方法では、多品種にわたって再分化したため、再分化に器官特異性があるかどうかについて同様の方法で検討した。

2. 結果

(1) カルス F.W.

第1の方法における各品種のカルス形成能および、再分化についてまとめたものを、Table 2 に示した。カルス

Table 2. Varietal difference of callus, embryoid and root formation. (at MS medium)

	Callus weight ± S. E. (mg)*	Embryoid form. (%)	Root form.
1. Amador	181.2± 60.7	0	○
2. Angus	656.4±137.6	0	
3. Ardiente	325.6± 96.5	0	○
4. Bayer	478.4± 77.3	0	○
5. Challenge	774.8±201.2	4.0	○
6. Decathalon	370.4± 45.7	5.0	
7. DuPuits	366.0±234.9	0	
8. Endure	494.6±131.4	0	○
9. Glapiator	354.6±167.0	0	○
10. Honeoye	772.2±288.9	0	○
11. Hunter River	326.4±294.7	0	
12. Julus	670.6±249.1	0	○
13. Kara	285.0±102.1	0	
14. Lutece	472.6±148.9	0	○
15. Natador	749.6±249.8	0	○
16. Nova	829.6±136.5	0	
17. Oneida	709.8±240.8	0	○
18. Orca	323.4±123.0	12.5	
19. Peak	811.0±112.4	0	
20. Phytor	373.0±167.9	0	○
21. Sitel	592.8± 52.0	0	○
22. So Special	809.8±220.9	0	
23. Szarvasi	291.4± 59.4	0	○
24. Trident	904.0±571.3	0	
25. Vancor	569.0± 72.9	0	○
26. Veko	489.0±130.3	0	○
27. Vela	564.0±222.9	0	
28. ソア	660.2±179.7	0	
29. パータス	445.2±138.9	0	
30. ヨーロッパ	554.4± 25.4	0	○
31. ルーサンコンモン	449.4± 62.2	0	

* Mean callus fresh weight from after 1 month.

形成能は、Amador, Kara, Szarvasi, Ardiente, Hunter River 等の品種において低く、So Special, Peak, Nova, Trident 等の品種では高かった。

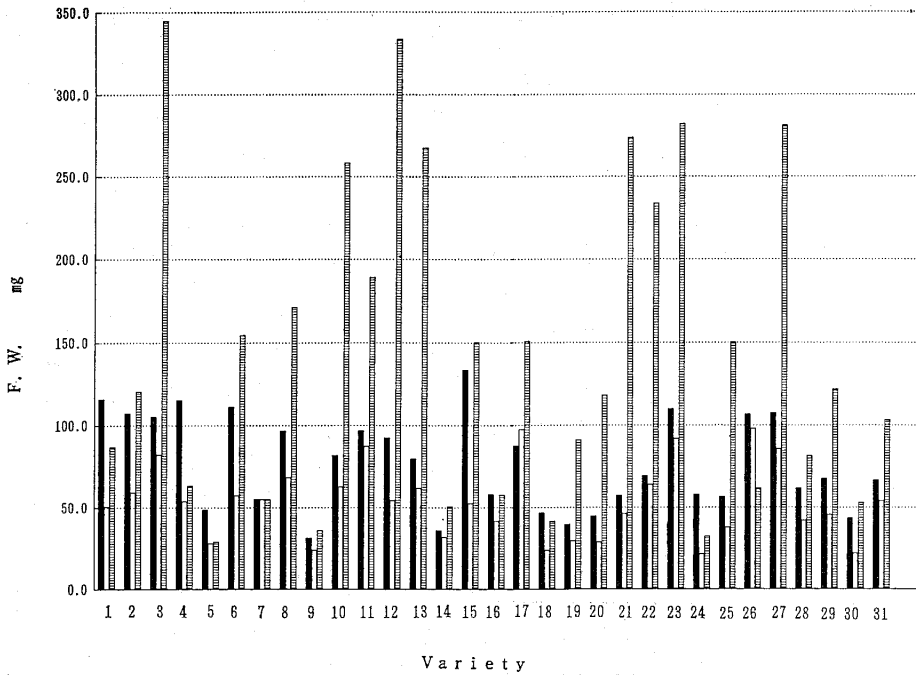


Fig. 1. Varietal difference of callus formation from hypocotyl, root and leaf. (at SH medium) ■ -Hypocotyl, □ -Root, ▨ -leaf.

第2の方法における4週間後の各品種の下胚軸・根・葉のカルス形成能をまとめたものを **Fig. 1** に示した。それによると、葉のカルス形成能は品種間差が激しいが、たいてい他の部位よりは高い値を示した。下胚軸と根は品種間差がほとんど見られないが、カルス形成能も低かった。

両方法において、So Special は高い値を示したが、Ardiente, Kara, Nova, Peak, So Special, Trident は、正反対の結果を示した。

(2) 再分化能

第1の方法では、3品種が胚様体を形成した (**Fig. 2**)。品種名としては、Orca, Challenge, Decathlonであった。それぞれの品種の胚様体の形成率は、12.6% (63 個体), 4.0% (20 個体), 5.0% (25 個体)であった。それぞれ植物体再分化培地へ移植したところ、Orcaにおいて植物体への再分化が見られた。植物体への再分化率は、胚様体形成したものからについては100%であった。**Fig. 3** に Orca の植物体再分化の様子を示した。

しかしながら、他の Challenge, Decathlon は、植物体再分化培地へ移植しても植物体の形成は起こらなかった。また、植物体の再分化ではないが、31 品種中17品種において胚様体再分化培地で根の形成がみられた。品

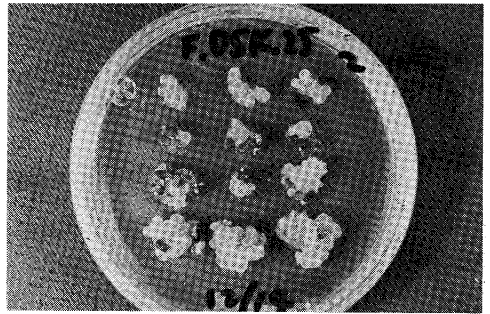


Fig. 2. Embryoid formation of Orca. (at SH medium).

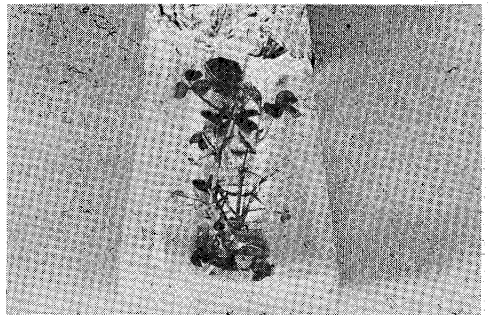


Fig. 3. Plant regeneration of Orca. (at SH medium).

種名としては, Amador, Ardiente, Bayer, Challenge, Endure, Glapiator, Honeoye, Julius, Lutece, Natador, Oneida, Phytor, Sitel, Szarvasi, Vancor, Veko, ヨーロッパであった。

Orca と Decathalon の2品種は, 胚様体分化培地での1カ月の処理期間中に胚様体形成を起こしたが, 根の形成は認められなかった。Orca の場合, 胚様体分化培地ではさらに1~2カ月後にしか根の形成が始まらなかったが, 植物体再分化培地に移植することにより1~2週間で根の形成がみられた。Decathalon も2カ月目に入ってから根の形成が起こった。

第2の方法での各品種における再分化能については, **Table 3** に示した。各品種において再分化してきた部位と胚様体の数を示してある。また根の形成についても並

Table 3. Embryoid formation from hypocotyl, root and leaf by the method of Meijer and Brown (1987).

	Embryoid formation		
	Hyp.	Root	Leaf
1. Amador			
2. Angus			
3. Ardiente		7	
4. Bayer	17		
5. Challenge			
6. Decathalon			
7. DuPuits			
8. Endure			
9. Glapiator	3		
10. Honeoye			
11. Hunter River	1		
12. Julius			
13. Kara			
14. Lutece		3	
15. Natador			16
16. Nova			
17. Oneida			
18. Orca	4		
19. Peak	5		
20. Phytor	1		
21. Sitel			
22. So Special			
23. Szarvasi		10	
24. Trident			
25. Vancor	2		
26. Veko	3		
27. Vela	8		
28. ソア			
29. バータス			
30. ヨーロッパ	1		
31. ルーサンコンモン			

記した。胚様体を形成した品種は, Ardiente, Bayer, Glapiator, Hunter River, Lutece, Natador, Orca, Peak, Phytor, Szarvasi, Vancor, Veko, Vela, ヨーロッパの14品種で, 根のみを再分化したのは Bayer 1品種だけであった。

再分化能の調査において, Orca は2つの方法で再分化したため, さらに詳細な検討を試みた。Meijer と Brown の方法を改良し, カルス形成培地の生長調節物質濃度としては, 2, 4-D を 0.0, 9.0, 22.6, 45.2, 90.5 mg/l の5区と kinetin を 0.0, 1.2, 4.7 mg/l の3区を設定し, 再分化の最適条件を調査した。

胚様体形成したものについては, 植物体に100%再分化したため, 再分化能はプレート当りの胚様体形成の数として **Fig. 4** に示した。

2, 4-D 5 mg/l + kinetin 0.25 mg/l のとき, 胚様体の形成が著しく, カルス1個体当りで数個~10数個見られた (**Fig. 5**)。この条件でのカルス当りの再分化を考えた場合は, 置床個体数24に対し, 胚様体を形成したカルスは18個体であり, 75%の再分化率であった。

kinetin が 0.25 mg/l の場合は, 2, 4-D 濃度が高くなるほど胚様体形成は減少するのに対し, kinetin が 1.0 mg/l の場合再分化率は低いものの, 2, 4-D 濃度に比例して胚様体形成が増えていた。

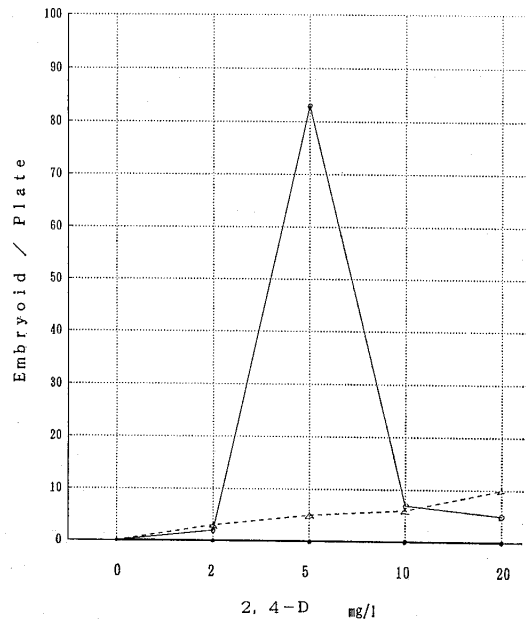


Fig. 4. Effect of 2, 4-D and kinetin on embryoid formation of Orca.

— kinetin 0.00 mg/l, — kinetin 0.25 mg/l, - - - kinetin 1.00 mg/l.

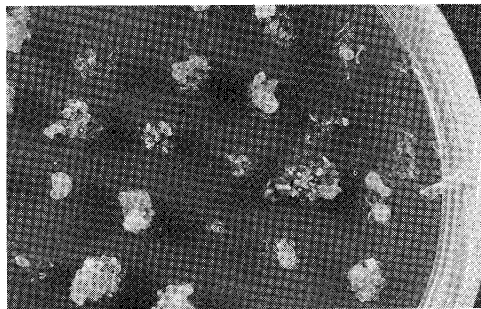


Fig. 5. Embryoids formed on MS medium containing 2,4-D (5 mg/l) and kinetin (0.25 mg/l).

表には載せなかったが、2,4-D 0 mg/l + kinetin 0.25 mg/l 区では根の形成がみられ、2,4-D 2~5 mg/l + kinetin 0.25 mg/l 区で植物体への再分化がみられた。

3. 考 察

本実験において使用した品種の中で、Angus, DuPuits, ヨーロッパ, Oneida, Peak については他の研究者によっても再分化実験の報告がある¹⁵⁾。それによると Angus, DuPuits の2品種では10~20%の再分化が報告されているが、今回の実験では、この2品種とも再分化は起こさなかった。しかしながら、Peak, ヨーロッパは Meijer と Brown の方法により再分化することに成功した。

Meijer と Brown は、アルファルファの再分化には2つの方法があり、1つは未分化の状態が長く続いた状態から再分化するもの、もう1つは即座に再分化させるものがあるとしている。後者が Meijer と Brown の用いた方法であり、前者が一般的に用いられていた方法である。

また Meijer と Brown も、Hypocotyl, Petiole, Leaf, Stem についての分化能を調査しているが、品種を問わず、Hypocotyl の再分化がよく、Stem では特によくないことを示している。今回、Root, Leaf からの再分化も試みたが、再分化はあまり見られなかった。

アルファルファの品種のうち Bingham らがつくりだした再分化能力の高い Regen-S¹⁵⁾は、前者の方法で選抜を行ったため、後者の方法ではほとんど再分化しなかった。この Regen-S については、再分化に関与する優性遺伝子が2対発見されている¹⁷⁾が、他の方法では再分化しないため、再分化に関係する遺伝子の作用は非常に複雑であると考えられる。方法論的には Meijer と Brown の方法が、再分化に必要な時間・手間を少なく、再分化した品種も多いといったメリットが認められた。実際、

14 品種において胚様体を形成させ、この方法の有効性を物語っている。

今回の実験で Orca はどちらの方法でも再分化する事がわかったので、組織培養の有用な材料となろう。さらに実験を進めていく際には、この品種から再分化能の高い系統を、選抜していくことも検討する必要があると思われる。

本研究を進めるに当たり多大なご指導、ご助言をいただきました東北大学遺伝生態研究センターの菅 洋教授に深く感謝の意を表す。また、実験を行うに当たり、御協力いただきました東海林英夫技官、アルファルファの種子を提供してくださった、雪印種苗の方々のご好意に深く感謝の意を表す。

文 献

- 1) Saunders, J. W., E. T. Bingham, 1972. *Crop Sci.*, **12**: 804-808.
- 2) McCoy, T. J., E. T. Bingham, 1977. *Plant Sci. Lett.*, **10**: 59-66.
- 3) Walker, K. A., P. C. Yu, S. J. Sato, E. G. Jaworski, 1978. *Am. J. Bot.*, **65**: 654-659.
- 4) Walker, K. A., M. L. Wendeln, E. G. Joworski, 1979. *Plant Sci. Lett.*, **16**: 23-30.
- 5) Staverek, S. J., T. P. Croughan, D. W. Rains, 1980. *Plant Sci. Lett.*, **19**: 253-261.
- 6) Atanassov, A., D. C. W. Brown, 1984. *Plant Cell Tissue Org. Cult.*, **3**: 149-162.
- 7) Staverek, S. J., T. P. Croughan, D. W. Rains, 1980. *Plant Sci. Lett.*, **19**: 253-261.
- 8) Novak, F. J., D. Konecna, 1982. *Z. Pflanzenphysiol.*, **105**: 279-284.
- 9) Lupotto, E. 1983. *Z. Pflanzenphysiol.*, **111**: 95-104.
- 10) Stuart, D. A., S. G. Strickland, 1984. *Plant Sci. Lett.*, **34**: 165-174.
- 11) Strickland, S. G., J. W. Nichol, C. M. McCall, D. A. Stuart, 1987. *Plant Sci.*, **48**: 113-121.
- 12) Shenk, R. U., A. C. Hildebrandt, 1972. *Can. J. Bot.*, **50**: 199-204.
- 13) Meijer, E. G., D. C. W. Brown, 1985. *Plant Cell Rep.*, **4**: 285-288.
- 14) Murashige, T., F. Skoog. 1962. *Physiol. Plant.*, **15**: 473-497.
- 15) Brown, D. C. W., A. Atanassov, 1985. *Plant Cell Tissue Org. Cult.*, **4**: 111-122.
- 16) Bingham, E. T., L. V. Hurley, D. M. Kaatz, J. W. Saunders, 1975. *Crop Sci.*, **15**: 719-721.
- 17) Reisch, B., E. T. Bingham, 1980. *Plant Sci. Lett.*, **20**: 71-77.

Summary

Varietal Difference of Callus Formation and Embryoid Formation in Alfalfa (*Medicago sativa* L.)

Toshiyuki TAKAHASHI* and Toshiaki KAMEYAA**

* *Nippon Petroleum Refining Co., Ltd., Kudamatsu Refinery,
Higashitoyoi 766, Kudamatsu, Yamaguchi, Japan*

** *Institute of Genetic Ecology, Tohoku University
Katahira 2-1-1, Sendai, Miyagi, Japan*

Callus and embryoid formation were examined with 31 varieties of alfalfa (*Medicago sativa* L.). Callus was induced by culturing leaves, hypocotyls and roots on SH medium (Shenk and Hildebrandt, 1972) containing NAA (3.7 mg/l) and kinetin (2.2 mg/l) or on MS medium (Murashige and Skoog, 1962) containing 2, 4-D (2 mg/l) and kinetin (0.2 mg/l), cultured for about two months and then transferred on hormone free SH or MS medium for embryoid formation. There were wide differences in ability of callus and embryoid formation between two media, and among varieties of alfalfa. Embryoid formation was observed in 3 varieties on SH medium and in 14 varieties on MS medium. In one variety, Orca, embryoids were formed in both media. The optimum condition of hormone for embryoid formation in Orca was investigated. It was found that the callus from hypocotyls cultured on MS medium containing 2, 4-D (5 mg/l) and kinetin (0.25 mg/l) and transferred on hormone free MS medium produced embryoids with high frequency (75%). These embryoids developed to whole plants.