

ネパール産普通ソバの植物体からの カルス形成及び色素発現について

氏原暉男・北林広己*

信州大学農学部 生物資源開発学講座

Callus Formation and Pigmentation from Explants of Nepalese Common Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* MOENCH)

Akio UJIHARA and Hiromi KITABAYASHI

Laboratory of Plant Breeding, Faculty
of Agriculture, Shinshu University

Summary

Callus formation and induction of adventitious root were examined in explants of common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* MOENCH) with red colour flowers, which were introduced from the high altitude areas of Central Nepal.

Calli and adventitious roots were induced from the leaf pieces and the segments of hypocotyl in different ages of explant on the MS basal medium supplemented with 0 to 2.0mg / l of 2, 4-D and 6-benzyladenine (BA), respectively.

The most suitable culture condition to induce the callus was the medium included 1.0 mg / l of 2, 4-D and BA, and induction rate of the adventitious roots was increased as the hormone concentration in media decreased. The pieces of cotyledon or segments of hypocotyl at 7 days after sowing showed the maximum increases of callus formation. On the other hand, the adventitious roots were induced from the segments of cotyledon or leaf pieces of both growing stages in explants.

Since the strains used in this experiment were selected progenies with red flower, the calli appeared the red pigment in a medium of composition of 1.0mg / l of both hormones.
(Jour. Fac. Agric. Shinshu Univ. 28 : 45-52, 1991)

要 約

中部ネパール山岳地帯より導入した普通ソバ (*Fagopyrum esculentum* MOENCH) の赤色花個体の選抜後代系統を供試材料として、生育ステージや異なる部位の外植片を用いて組織培養を行ない、カルスの形成や不定根の誘導について検討した。

また、形成されたカルスが条件によっては赤色色素を発現したので、特にホルモンの添

*タカノ株式会社

1991年4月30日 受付

加条件と発色との関係についても検討を試みた。

基本培地としてはMS培地を用い、BA及び2, 4-Dの両ホルモンを添加して培養を行った結果、カルスの形成率では各1.0mg/lのBAと2, 4-Dの培地で最も高く、また外植片のステージについては、播種後7日目の幼植物の子葉片あるいは胚軸片がカルス形成にとって適した材料であることが明らかとなった。

また、不定根の形成率では両ホルモンが各々0.1mg/lのようなホルモンの比較的少ない条件で高い傾向を示し、部位別にみると葉片で好結果が得られた。生育ステージによる不定根形成率の差異は殆どみられなかった。

カルスの赤色発現の程度は、培地のホルモンの添加量によって差異を生じ、BA及び2, 4-D各々2.0mg/lでは赤色発現は認められなかったが、両ホルモンが1.0mg/lの場合に最も強い赤色を発現した。

緒 言

普通ソバ (*Fagopyrum esculentum* MOENCH) は、異型花柱性にもとづく他殖性植物である。このため普通ソバの育種法としては、主として集団選抜および系統集団選抜などが用いられてきた。この育種法は、他殖性植物においては、近交弱勢を防ぐ意味でも有効な方法である。しかし一方では、選抜は母本個体のみを対象とするため目的の形質を持たない個体の遺伝子が次代集団に入り込む可能性があり、この点から普通ソバの育種には長年月が必要とされてきた (中山ら1972, 角田ら1977, 松尾1987)。

育種期限の短縮化のための方策及び、遺伝的変異拡大のための手段として、細胞や組織の培養による一連の手法の適用が考えられる。系統集団選抜の初期の段階あるいは選抜途上で優良個体を組織培養により遺伝的に均一な個体を増殖させることが出来れば、育種期限の短縮や効率的な選抜が可能となる (Lachmann 1991)。

以上のような考え方に立脚して、本研究は遺伝的に大きな変異を持つ集団と考えられるネパール産普通ソバを材料として用い、クローン系獲得のための第一段階として、より効率的なカルスの誘導条件について植物ホルモン条件を中心に検討を試みようとしたものである。あわせて、供試器官 (部位) や生育ステージとカルス及び不定根形成との関係についても検討を加えた。

また、供試材料は、中部ネパールの山岳地帯から導入されたもので、桃色～赤色の花色を表す系統であり、1990年に赤色花を対象とした個体選抜を行ってきたものである。従って、形成されたカルスの中に、かなりアントシアン系の赤色の色素を発現することが観察され、培地の種類とカルスの赤色色素発現との関係についても検討をおこなったので、これらについても報告する。

材料および方法

1. 無菌植物の育成

供試材料とした普通ソバ (*F. esculentum*) は1988年に中部ネパール山岳地帯より導入されたもので、1990年に本学部付属農場において赤色花について選抜し、隔離採種した個体の

次代種子を用いた。

供試種子の外皮を取り除いたものを、70%エチルアルコールに30秒間浸した後、有効塩素濃度0.85~1.35%次亜塩素酸ナトリウムで30分間殺菌消毒した。その後、滅菌水で水洗し、滅菌濾紙で水分を取り除いてから、植物ホルモンを含まない Murashige-skoog (MS)培地 (1962) に Sucrose 30g/1及び Agar 7g/1を加え、pH5.7~5.8に調整した試験管内の培地上に無菌状態で播種した。播種後、25°Cで16時間蛍光灯照明下(2000lux)で育成を行った。

2. カルス誘導

カルス誘導のための植物材料は上記方法によって生育した無菌の幼植物を用い、植物の部位と生育ステージの組合せにより以下の4区を設定した。すなわち、A区では播種後7日(子葉展開)の子葉片を、B区では同じく7日の胚軸片を、さらにC区では播種後65日経過し本葉が展開した葉片を、D区では同上65日目の胚軸片を各区の供試材料とした。なお、葉片はいずれも展開した葉を約5mm角の切片とし、胚軸片はいずれも胚軸を約5mm長の切片とし、マルチウェルプレート(テルモ社製24穴ペトレイ24F)中の培地上に置床し、25°C、16時間蛍光灯照明下(2000lux)で培養した。カルス誘導培地は、MS培地(30g/1 Sucrose, 7g/1 Agar, pH5.7~5.8)に0.1, 1.0, 2.0mg/1の2, 4-dichlorophenoxy-acetic acid (2, 4-D)と0.1, 1.0, 2.0mg/1の6-benzyladenine (BA)を組み合わせた9種類(一部ホルモンフリー培地も使用)の培地をA~Dの各区で用いた。

3. カルスの発色程度の測定

材料として、最も赤色が強く現れたB区の置床後30日目のカルスを測色した。直接カルス表面の色度を測定することが困難なため、カルスを撮影した写真を対象に測色をおこなった。測色は日本電色工業社製測色色差計(NDR-21B)のUCS系によりL, a, bを測定し、Table 3に示した培地の組合せごとに各24組織片の平均値を算出し、ホルモンの組合せと発色との関係を解析した。

結果および考察

外植片置床後7日頃からカルスが誘導され始め、15日頃から不定根の発生が観察され始めた。

カルス形成率の経時的变化をFig. 1に示したが、カルスの形成数は3mm以上に発達したカルスを対象とした。培地条件B, C, D区については置床後40日以降でもカルスの誘導が継続されたが、A区においては22日目ごろからカルス誘導はほぼ停止した。

Fig. 2は不定根形成率の経時的な変化を示したものであるがA, Cいずれの区も葉片においては置床後20日以降から急激に不定根が分化した。しかしB, D区の胚軸片の場合は40日以降でも不定根の形成率は10%以下と極めて低い値であった。

1. 植物ホルモンとカルス形成の関係

用いた培地のうち0.1mg/1のBAと0.1mg/1の2, 4-Dの低濃度区ではカルスの形成は33.2%と低く、また逆に、2.0mg/1のBAと2.0mg/1の2, 4-Dの比較的高濃度区でもカルス形成は抑制された。全般的にみると、BA濃度では1.0mg/1で、2, 4-D濃度では1.0mg/1で最も高頻度でカルスが誘導され、形成率は77.1%に達した(Fig. 3)。

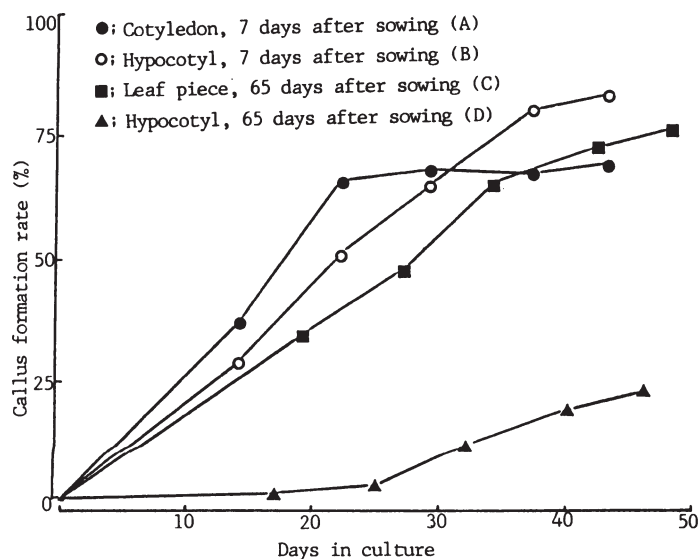


Fig. 1. Increase of callus formation rate according to culture period with different ages and segments of explant.

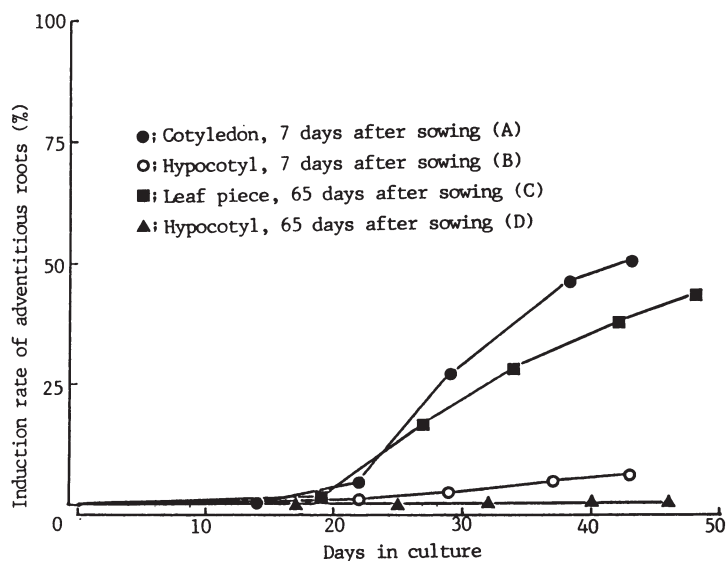


Fig. 2. Increase of induction rate of adventitious roots according to culture period with different ages and segments of explant.

2. 植物ホルモンと不定根形成の関係

不定根は低濃度のホルモン濃度で多く形成された (Fig. 4)。すなわち、BA濃度では0.1 mg/lで、また2, 4-D濃度では0.1mg/lで比較的多くの不定根が誘導された。最も不定根形成率が高かった組合せは、0.1mg/lのBA及び1.0mg/lの2, 4-Dの組合せであり、その率

は34.1%であった。また最も不定根形成率が低かったのは、2.0mg/1のBA及び2.0mg/1の2,4-Dの組合せで、わずか2.1%にとどまった。なおBA及び2,4-Dの量比と不定根誘導との明確な規則性は認められなかった。

3. 外植片のステージ及び部位とカルス形成との関係

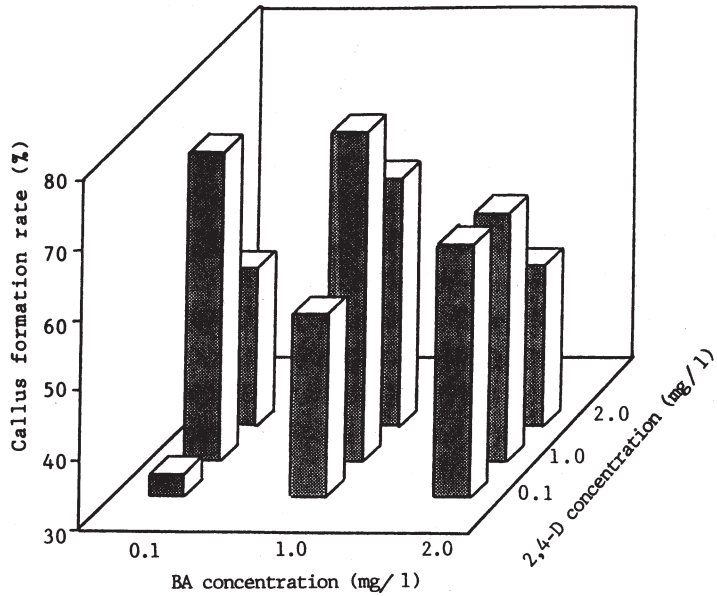


Fig. 3. Effect on the callus formation rate of hormones, BA and 2, 4-D.

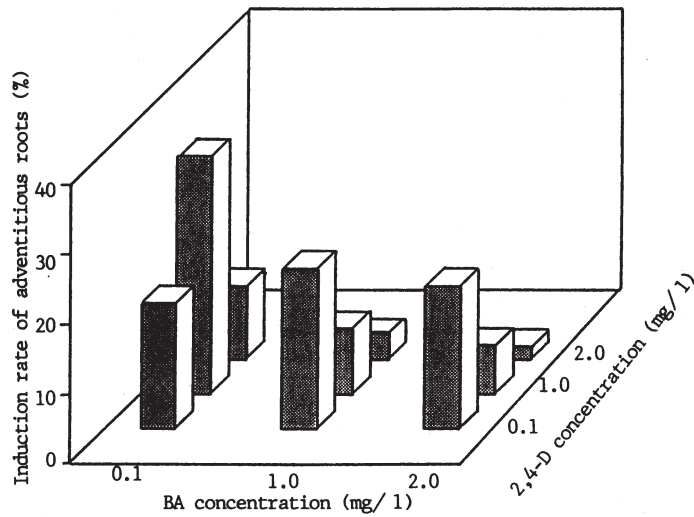


Fig. 4. Effect on the induction rate of adventitious roots of hormones, BA and 2, 4-D.

外植片に用いた植物体部位では、葉片が胚軸片に較べカルスの形成率が高いことが確認された (Table 1)。しかし、カルスの大きさ及び均一性等の量的あるいは質的な面を考慮にいと、胚軸片由来のカルスのほうが葉片由来カルスに較べ優れているように思われた。外植片に用いた植物のステージとカルス形成との関係は、播種後7日目の比較的新鮮な材料では、播種後65日目のものと較べカルス形成が促進された。特に胚軸片では材料の老化に伴いカルス形成率の著しい低下がみられた。これらのことからカルス誘導のための外植片には播種後1週間程度の胚軸片あるいは子葉片が適当と思われた。

4. 外植片のステージ及び部位と不定根形成との関係

Table 2 で明らかのように、不定根形成率は外植片の植物体部位による差異が著しかった。葉片ではいずれも26~28%に達したが、胚軸片では5%以下であった。一方、供試材料の生育ステージ間では、不定根形成率には殆ど差異が認められなかった。このことから不定根の分化には植物体の部位間での内生ホルモンの作用が大きく影響しているものと思われた。

5. 培地の種類と組織片の赤色色素発現の関係

培地に添加する植物ホルモンの条件 (Table 3) と置床後30日目の組織片の赤色の色度との関係を示したのが Fig. 5 である。ホルモン無添加の培地では色差計による a 値はほぼ0を示し赤色は検出されなかった。しかし植物ホルモンの添加量にともなって a 値は変化し、ホルモン条件5の場合のように B A 及び2, 4-D が各々1.0mg/1で最高値の11.6を示し、肉眼でも透明の鮮やかな赤色のカルスが形成された。さらに、植物ホルモンの濃度が6, 8, 9の条件のように増加するにしたがい徐々に a 値は減少を示し、条件9のように両ホルモン

Table 1. Percentage of callus formation with different growing stage and segment of explant.

Growing stage of explants*	% of callus formation**	
	Leaf	Hypocotyl
7	90.5	75.5
65	65.3	11.1

* Days after sowing

** Observed at 30 days after culture

Table 2. Percentage of adventitious root induction with different growing stage and segment of explant.

Growing stage of explants*	% of adventitious root induction**	
	Leaf	Hypocotyl
7	26.6	2.3
65	28.2	0.0

* Days after sowing

** Observed at 30 days after culture

Table 3. Hormone composition used in culture medium for pigmentation of red colour.

BA (mg/1)	2,4-D (mg/1)		
	0.1	1.0	2.0
0.1	1	4	7
1.0	2	5	8
2.0	3	6	9

Hormone Free: 0

が2.0mg/1となると赤色は全く検出されず、カルスの色相は明らかに緑色を呈していた。

カルスの赤色色素は、正確な同定は行っていないものの、希塩酸メタノール溶液に容易に溶出したためアントシアン類と推察された。いずれにしても、カルスの赤色色素の発現は培地中に添加したホルモンの量と密接に関係することは明らかとなったが、植物体のアントシアン色素生産の遺伝的な差異については、現在通常の白色花品種を用いて確認のための実験を行っている。また、カルスのアントシアン類の生産については、三澤 (1979) によって指摘されているように、培養変異あるいは細胞選抜などを用いて、安定的でしかも高生産性の株を獲得することも今後の検討すべき課題の一つである。

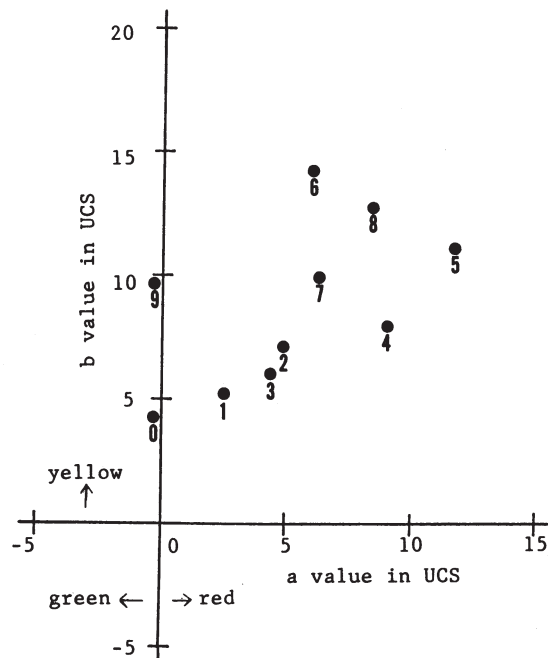


Fig. 5. Relationships between the hormone condition in media and the spectrum of callus colour measured by colorimeter.
(Numbers in figure show hormone composition of Table 3.)

文 献

- 原田 宏・三澤正愛 et al 1979. 植物細胞組織培養, 理工学社, 373-375.
- LACHMANN, S. 1991. Plant cell and tissue culture in buckwheat, Proc. of ICOBB in Miyazaki, Miyazaki University, March, 11-15. 1991 : 145-154.
- 松尾孝嶺 1987. 改訂増補育種学, 養賢堂, 163-165.
- MURASHIGE, T. and F. SKOOG 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures, *Physiol. Plant.* 15, 473-497.
- 中山 包・氏原暉男・俣野敏子 1972. ソバの育種に関する基礎的研究, 農林水産業特別試験研究報告書, 116-117.
- 角田重三郎 et al 1977. 植物育種学, 文永堂, 105-107.