

## ソバの薬培養における植物体再生

高畑 義人\*

(1987年10月9日受理)

### 緒 言

薬あるいは花粉培養により人為的作出が可能となった半数体は実際の育種において利用価値が高い(新関 1970, Melchers 1972)。すなわち、1) 自殖性作物においては固定年限の短縮を可能にし、2) 他殖性作物においては  $F_1$  育種に欠かすことのできない純系を効率的に獲得でき、3) 性染色体をもつ作物においては性的人為的制御を可能とする。現在、タバコ、イネ、コムギ等でこの方法を用いて実用的な品種が生まれている。

ソバはわが国ではなじみの深い作物であるが、その育種はほとんど進んでおらず、収量も10 a 当たり 100kg 前後と低い。その低収量の原因の1つとして、ソバが異型花型の自家不和合性であることがあげられる。一方、他作物においては自家不和合性を利用した  $F_1$  採種が効率的に行われている例がある(治田 1968)。しかし、ソバにおいては、1) 純系を得る有効な手段がない、2) 異型花現象による自家不和合性的人為的制御ができないことから  $F_1$  の利用が困難になっている。もし花粉由来の植物体の作出が可能となれば純系の獲得だけでなく、遺伝子型 SS をもつ超短花柱花(ソバの短花柱花は Ss, 長花柱花は ss) を得ることができ、異型花型の自家不和合性の機構の解明とともにその人為的制御が可能になるものと思われる。そこで、本研究はソバの薬培養による半数体作出について検討した。

### 材料および方法

供試品種は「階上早生」と「岩手在来秋ソバ」の2系統を用いた。ビニールハウス内で生育させた植物体から幼花序を採取し、70%アルコールで30秒間さらに1%次亜塩素酸ナトリウム液で10分間滅菌した。滅菌水で3回水洗したのち、花粉1核期の薬を蕾から取り出し、6cmのプラスチックシャーレ内の寒天培地に置床した。

培地は Gamborg *et al.* (1968) の B5 培地を基本とし、1-ナフタリン酢酸 (NAA) 2.0 mg/l, 6-ベンジルアデニン (BA) 2.0mg/l, 蔗糖20g/lを添加した区と NAA 0.5mg/l, BA 0.05mg/l, 蔗糖80g/lを添加した区の2種類を用いた。培養はすべて25°C暗黒下で行った。

薬から得られたカルスは植物体再生をはかるため、B5培地を基本とした植物ホルモン無添加およびNAA 0.2mg/l, BA 1.0mg/l添加の再分化培地に移植した。この時の培養条件は25°C16時間日長とした。

再生した植物体の染色体数は0.002 M 8-オキシキノリンで4時間前処理したのちフォイル

\* 岩手大学教育学部

ゲン押しつぶし法により決定した。

### 結果および考察

葯置床後30日目のカルス形成の結果を Table 1 に示す。NAA 2.0mg/1, BA 2.0mg/1, 蔗糖 20g/1添加の培地では、階上早生、岩手在来秋ソバでそれぞれ19.7%, 18.9%の頻度でカルス形成がみられ、両品種間で差異は認められなかった (Fig. 1)。また、カルスから直接細かい繊毛状の根が発生しているものも、階上早生で1.0%, 岩手由来秋ソバで3.8%の頻度で観察された。一方、NAA 0.5mg/1, BA 0.05mg/1, 蔗糖80g/1添加物の培地では、岩手由来秋ソバの置床した263個の葯はまったくカルスを形成しなかった。また、この培地においては胚様体および根の形成もみられなかった。大麦 (Clapham 1973), ナタネ (Keller *et al.* 1975, Dunwell and Thuring 1985), ジャガイモ (Sopory *et al.* 1978) 等の葯培養においては高濃度蔗糖が胚様体形成に有効であることが報告されているが、本実験からはソバ葯からの胚形成における蔗糖の効果については明らかにできなかった。

Table 1. Callus induction from buckwheat anther after 30 day culture on B5 medium

| Cultivar            | NAA2.0+BA2.0mg/1+2%Sucrose |                           | NAA0.5+BA0.5mg/1+8%Sucrose |                           |
|---------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|
|                     | No. of anthers cultured    | Anthers forming callus(%) | No. of anthers cultured    | Anthers forming callus(%) |
| Hashikamiwase       | 208                        | 19.7                      | —                          | —                         |
| Iwatezairai-Akisoba | 106                        | 18.9                      | 263                        | 0.0                       |

次に、誘導したカルスから植物体を再生するために、階上早生の葯由来のカルスを植物ホルモン無添加およびNAA 0.2mg/1, BA 1.0mg/1 添加の再分化培地に移植した。さらに、30日毎に2回同様の培地にカルスを継代し不定芽の形成を調査した。その結果、どちらの培地においても不定芽の分化がみられた (Table 2, Fig. 2)。分化率はNAA 0.2mg/1, BA 1.0mg/1 添加培地より植物ホルモン無添加の方が若干高い傾向にあったが、明瞭な差異は認められなかった。幼花序由来のカルスからの不定芽の分化においてもこれら2つの培地間にはっきりした差異は認められず (高畑・奥 1987), ソバカルスからの再分化にはどちらの培地を用いても同程度の分化率を持つことが推測された。一方、継代回数によって再分化率に差異がみられ、カルス誘導培地から再分化培地に移植した時より同じ培地に継代することにより不定芽の形成率は増加した。すなわち、植物ホルモン無添加の培地に継代した場合、継代1代目では11.1%の分化率であったが、2回、3回と継代するにつれて13.5%, 33.3%と増加した。NAA 0.2mg/1, BA 1.0mg/1 添加培地に継代した場合も、継代1代目は5.6%の分化率であったのが、3代目には27.8%と増加した (なお、この3代目の継代に使用したカルスは植物ホルモン無添加の培地で2回継代したものをを用いた)。このように再分化培地で2回、3回と継代を繰り返すことによって再生頻度が増加する事はイネの根由来カルスにおいても報告されている (Abe and Futsuhara 1984)。その原因については、再生能力のあるカルスを無意識的に選抜している可能性もあり、またそうであるなら高再生能カルスを獲得することもでき、今後検討する必要がある

**Table 2.** Percentage of shoot formation from anther callus of 'Hashikamiwase' on different B5 regeneration media after 1-3 subcultures

| Passage of subculture | Regeneration media |                  |
|-----------------------|--------------------|------------------|
|                       | Hormone free       | NAA0.2+BA1.0mg/l |
| First                 | 11.1               | 5.6              |
| Second                | 13.5               | —                |
| Third                 | 33.3               | 27.8             |

と思われる。

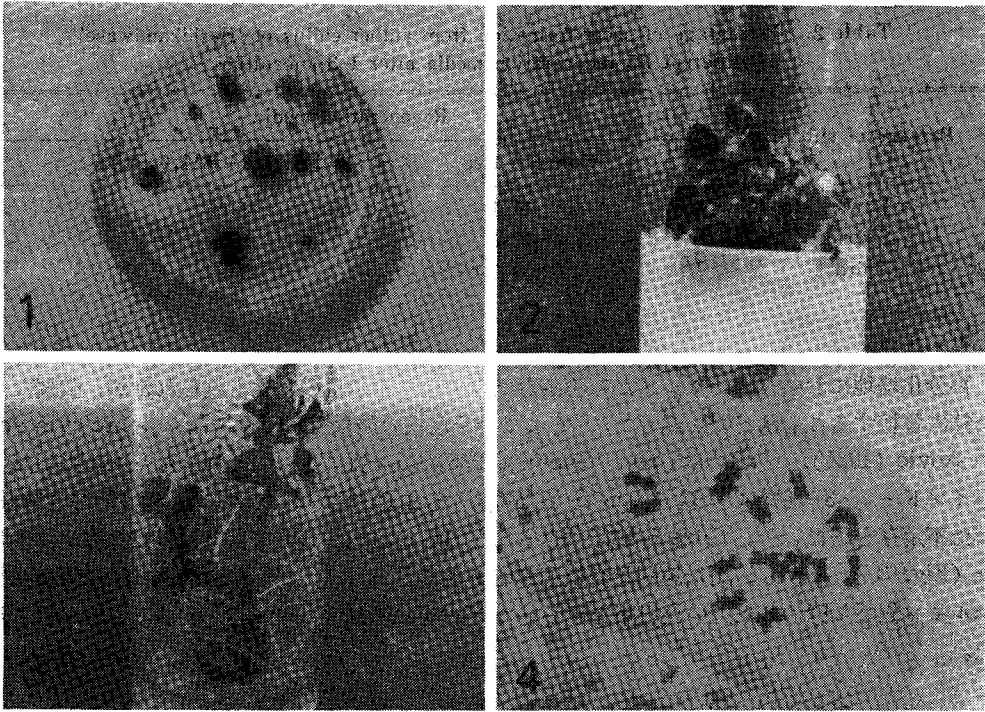
再分化培地においては、カルスから不定芽だけでなく不定根の分化もみられたが、貧弱なため鉢に移植することはできなかった。そこで十分な根の発生を誘導するため、Srejović and Nešković (1981), Takahata and Jumonji (1985) の方法に従って植物ホルモン無添加およびインドール-3-酪酸 (IBA) 1.0mg/l 添加のMS培地 (Murashige and Skoog 1962) に伸長した不定芽を移植した。Table 3 に示すようにどちらの培地においても発根し植物体が再生した (Fig. 3)。しかし、両培地間で発根率に差が生じ IBA 1.0mg/l 添加培地で68.2%と植物ホルモン無添加区の3倍近い発根率を示し、ソバの発根には IBA が有効であることが示された。

**Table 3.** Effect of IBA on root formation from differentiating shoot of 'Hashikamiwase' after 30 day culture on MS medium

| Concentration of IBA (mg/l) | No. of shoots cultured | No. of shoots rooted | Frequency (%) |
|-----------------------------|------------------------|----------------------|---------------|
| 0.0                         | 24                     | 6                    | 25.0          |
| 1.0                         | 22                     | 15                   | 68.2          |

再生した植物体の染色体数は  $2n=16$  の2倍体であり、半数体は見いだされなかった (Fig. 4)。花粉粒から直接胚様体を経て植物体を形成する場合、および花粉由来のカルスから植物体を得る場合のどちらにおいても、半数体だけでなく2倍体が得られることが多くの植物で報告されており (Niizeki 1968, Keller *et al.* 1975), 本実験で得られたカルスが花粉起源であるのかその他の葍組織に由来するのかは本実験からだけでは言及できない。今後葍培養で得られたカルスの起源を解明するとともに、花粉粒から直接胚様体を得る方法を開発していく必要があると思われる。

本実験の遂行にあたり、便宜をはかれた岩手大学教育学部教授武田豊蔵博士に謝意を表します。また、階上早生の種子を頂いた青森県農業試験場の津川秀仁氏に対し御礼申し上げます。



- Fig. 1. Callus induction from buckwheat anther on B5 medium supplemented with 2.0 mg/l NAA and 2.0 mg/l BA
- Fig. 2. Shoot differentiation from callus on B5 medium without hormones
- Fig. 3. Root formation from differentiated shoot on MS medium without hormones
- Fig. 4. Metaphase chromosomes in a root tip cell of a regenerated plant that determined to be diploid ( $2n=16$ )

#### 文 献

- Abe, T. and Y. Futsuhara, 1981. Varietal difference of plant regeneration from root callus tissue in rice. *Japan. J. Breed.* **34**: 147-155.
- Clapham, D. 1973. Haploid *Hordeum* plants from anthers *in vitro*. *Z. Pflanzenzücht.* **69**: 142-155.
- Dunwell, J. and N. Thurling, 1985. Role of sucrose in microspore embryo production in *Brassica napus* ssp. *oleifera*. *J. of Exp. Bot.* **36**: 1478-1491.
- Gamborg, O. L., R. A. Miller and K. Ojima, 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell. Res.* **50**: 151-158.
- 治田辰夫 1968. そ菜におけるヘテロシスの育種的利用, 育種学最近の進歩 第9集 養賢堂 73-86.
- Keller, W. A., T. Rajhathy and J. Lacapra, 1975. *In vitro* production of plants from pollen in *Brassica campestris*. *Can. J. Genet. Cytol.* **17**: 655-666.
- Melchers, G. 1972. Haploid higher plants for plant breeding. *Z. Pflanzenzücht.* **68**: 19-32.
- Murashig, T. and F. Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physil. Plant.* **15**: 473-497.

- Niizeki, H. 1968. Induction of haploid plant from anther culture. Jap. Agr. Res. Quart. 3: 41-45.
- 新関宏夫 1970. 葯培養と育種, 育種学最近の進歩 第11集 養賢堂 45-51.
- Sopry, S. K., E. Jacobsen and G. Wenzel, 1978. Production of monohaploid embryoids and plantlets in cultured anthers of *Solanum tuberosum*. Plant. Sci. Lett. 12: 47-54.
- Srejić, V. and M. Nešković, 1981. Regeneration plants from cotyledon fragments of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). Z. Pflanzenphysiol. Bd. 104: 37-42.
- Takahata, Y. and E. Jumonji, 1985. Plant regeneration from hypocotyl section and callus in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). Ann. Rep. Fac. Educ. Iwate Univ. 45: 137-142.
- 高畑義人・奥直樹 1987. ソバ (*Fagopyrum esculentum*) および宿根ソバ (*F. cymosum*) の幼花序からの植物体再生. 育雑 37 別冊 1: 148-149.

### Summary

#### Plant Regeneration in Buckwheat Anther Culture

Yoshihito TAKAHATA

*Faculty of Education, Iwate University, Ueda, Morioka 020 Japan*

Anthers of two cultivars of buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) were cultured on different B5 media. About 20 % of callus induction was obtained on the medium supplemented with 2.0 mg/1 NAA, 2.0 mg/1 BA and 20 g/1 sucrose (Table 1). On the other hand, no calli and embryoids were induced on the medium with 0.5 mg/1 NAA, 0.05 mg/1 BA and 80 g/1 sucrose. Shoots were differentiated from calli when they were transferred to the B5 regeneration media (with 0.2 mg/1 NAA and 2.0 mg/1 BA or without hormones). The frequency of shoot differentiation was increased with progress of subculture on the same regeneration media (Table 2). Root formation from shoot was obtained when transferred to MS media with 1.0 mg/1 IBA or without hormones. The frequency of rooting on the medium with 1.0 mg/1 IBA was three fold as high as without hormones (Table 3). Cytological analysis of regenerated plants showed they had diploid chromosome number ( $2n=16$ ).