

アルファルファのソマクローナル変異 I. 再生当代(SC₁)の圃場特性

小池正徳¹・東野裕広²・田守隆浩¹・嶋田 徹¹

(受理: 1992年5月22日)

Somaclonal variation of alfalfa

I. Field characteristics of SC₁ plant

Masanori KOIKE¹, Yasuhiro HIGASHINO², Takahiro TAMORI¹
and Tohru SHIMADA¹

摘 要

アルファルファの培養細胞から再分化した植物体を圃場に移植し2年間にわたり、圃場特性を中心に調査した。収量に関する諸形質(乾物重、草丈、茎数、頭花数、そばかす病)で広いソマクローナル変異が認められた。変異は概して有用性についてはマイナス方向であったが、一部プラス方向に、対照植物に比べ有意に高い値を示した栄養系が存在した。また、パーオキシダーゼおよびエステラーゼアイソザイムのバンドパターンにおいても変異が確認された。

キーワード: アルファルファ、ソマクローナル変異

結 言

プロトプラストまたはカルスから再生した植物体は、同一植物の体細胞を起源にするにもかかわらず、遺伝的に多様に変化していることが現在多くの植物種で明らかになっている。このような現象をLarkinとScowcroft¹⁾はソマクローナル変異と呼んだ。アルファルファ(*Medicago sativa* L.)においてもReischとBingham²⁾やNagarajanとWalton³⁾などの報告があり収量関連形質を中心にその変異が調べられてきた⁴⁾。本実験ではアルファルファの培養細

胞から再生した植物体を栄養系繁殖させ、圃場に移植し、栽培特性の変異を中心に調査した。

材料および方法

1) 供試植物

植物体はKoikeら⁵⁾が品種キタワカバの子葉由来カルスから再分化させた植物を材料とした。これらの再分化植物を温室で栽培し、形態的異状を示さなかった11個体について切り枝で増殖しキタワカバと比較した(A集団)。また、その中の1個体であるK3C-1-1の未展開葉由来カルスから更に再生植物体

¹ 帯広畜産大学飼料作物科学講座

² 千葉大学園芸学部作物学研究室

¹ Laboratory of Forage Crop Science, Obihiro University of Agriculture & Veterinary Medicine, Obihiro, Hokkaido 080, Japan.

² Laboratory of Crop Science, Faculty of Horticulture, Chiba University, Matsudo, Chiba, 271, Japan.

9個体を得て、これらの栄養系とK3C-1-1栄養系を比較した(B集団)。再分化の操作はKoikeら³⁾の方法に準じた。

2) 栄養系増殖

各植物体から5cm程度に枝を切り取り、切り口に発根剤(オキシベロン)を塗布し、パーミキュライトに移植しガラス室内で維持した(2~3週間)。発根後ジフィーポット(直径90mm)に移植し、4週間ガラス室で育苗した。

3) 圃場試験

1990年7月6日帯広畜産大学精密圃場に50×50cmの間隔で個体植した。各栄養系についてラメット数は3~5個体で、これらをランダムに配置し、移植した。初年度は9月10日、次年度(1991)は7月17日および10月9日に刈取し、乾物重を測定した。また、刈取の前日に草丈、茎数(初年度のみ)、頭花数(初年度のみ)を調査した。さらに次年度については、そばかす病の発病程度(7月16日、9月4日)も調査した。統計解析にはすべてダンカンの多重検定法を用いた。

4) アイソザイムの分析

K3C-1-1由来の8個体のみについて、アイソザイムの変異を調査した。それぞれの個体の未展開葉に10mMトリス-塩酸緩衝液(pH6.8)を200 μ l加え、氷冷した乳鉢中で摩擦した。その抽出液20 μ lを供試し、スラブ型ポリアクリルアミド電気泳動法により、4 $^{\circ}$ C、25mA定電流条件で約10時間泳動した。パーオキシダーゼには7%ゲルを用い、染色は山本と桃谷⁹⁾の方法で、エステラーゼでは10%のゲルを用い染色はBrewbaker⁷⁾、およびBrown⁸⁾の方法を用いた。

結 果

1) 乾物重

品種キタワカバの子葉カルス由来再生植物体栄養系集団(以下集団A)およびK3C1-1由来再生植物体栄養系集団(以下集団B)の個体あたりの乾物重をTable 1に示した。

集団Aにおいて対照品種キタワカバの集団より有意に高い値を示したのは、1回目の調査(1990)では1栄養系(K3C-2)、3回目の

調査(1991/9/5)でも1栄養系(K3C-13)であった。2回目の調査(1991/7/17)では有意に高い値を示した栄養系は存在しなかった。

集団Bにおいては、1回目の調査で、1栄養系(K3C-2)、3回目の調査(1991/9/5)でも1栄養系(KEC-13)であった。2回目の調査(1991/7/17)では有意に高い値を示した栄養系は存在しなかった。

集団Bにおいては、1回目の調査で、1栄養系(K3C-1-2-5)が親栄養系のK3C-1-1に比べ有意に高い値を示し、2、3回目の調査共に有意に高い値を示したのは栄養系K3C-1-1-3であった。

Table 1 Mean dry matter yield of somaclones regenerated from calli derived from cv. Kitawakaba (A) and K3C-1-1 (B). Lines are listed in order of mean yield in 1990

Line	n	Mean dry matter yield/plant (g)		
		'90 (9/10)	'91 (7/17)	'91 (10/9)
A				
K3C-16	6	24.9 a*	103.5 ab	59.5 a
K3C-3	11	26.6 a	124.7 a-c	68.3 c
K3C-5	25	25.6 a	88.5 a	38.4 a
K313-1-1	5	26.0 a	112.8 ab	65.8 c
K3C-13	11	30.4 a	173.9 e	8.2 d
K3C-7	13	33.6 ab	131.7 a-e	63.9 c
Kitawakaba	20	36.3 ab	136.4 b-e	58.1 a-c
K3C-1-1	15	37.4 ab	129.3 a-e	50.5 a-c
K112-1	4	46.5 bc	127.0 a-d	66.8 c
K3C-1-4	26	46.8 bc	166.5 c-e	69.5 c
K3C-2	13	52.3 c	171.5 de	42.5 ab
B				
K3C-1-2-4	19	14.6 a	86.7 ab	32.7 a
K3C-1-2-11	8	15.1 a	59.8 a	33.5 ab
K3C-1-2-6	9	19.6 a	65.9 a	39.9 a-c
K3C-1-2-12	7	23.0 ab	112.7 bc	48.1 a-d
K3C-1-2-3	4	23.5 ab	127.8 b-e	47.0 ad
K3C-1-2-13	16	24.0 ab	120.1 b-d	55.3 b-d
K3C-1-1-4	14	33.0 bc	166.1 de	67.9 de
Kitawakaba	20	36.3 c	136.4 c-e	58.1 cd
K3C-1-1	15	37.4 c	129.3 b-d	50.5 ad
K3C-1-1-3	35	38.2 c	175.6 e	83.2 e
K3C-1-2-5	5	50.0 d	150.2 c-e	35.4 ab

A is a population of regenerants from calli derived from cotyledon of cv. Kitawakaba (Kitawakaba is control.) B is a population of regenerants from calli derived from K3C-1-1 (K3C-1-1 is control.)

* Means within columns followed by the same letter are not significantly different ($P=0.05$) using Duncan's multiple range test.

2) 草丈

集団A, Bの草丈の値をTable 2に示した。

集団Aの1回目の調査では3栄養系(K3C-1-4, K3C-1-1, K112-1)が対照品種キタワカバより有意に高い値を示した。しかし, 2, 3回目の調査において, 有意に高い値を示した栄養系は存在しなかった。

集団Bで対照系統K3C-1-1より高い値を示した栄養系は3回の調査共に存在せず, 逆に有意に低い栄養系が, 1回目の調査では6栄養系, 2回目では5栄養系, 3回目では3栄養系存在し, 3回の調査すべてにおいて有意に低い値を示したのは, K3C-1-2-4, K3C-1-2-13の2栄養系であった。

Table 2 Plant length of somaclones regenerated from calli derived from cv.Kitawakaba (A) and K3C-1-1 (B).

Lines are listed in order of plant length in 1990.

Line	n	Plant length (cm)		
		'90 (9/9)	'91 (7/16)	'91 (10/8)
A				
K3C-16	6	71.8 a*	154.0 bc	97.3 bc
Kitawakaba	20	81.0 a-c	151.3 bc	109.7 c-e
K3C-13	11	81.4 a-c	153.8 bc	112.6 de
K3C-5	25	85.1 a-d	136.3 a	83.9 ab
K313-1-1	5	91.0 b-e	160.2 bc	121.4 e
K3C-7	13	91.2 b-e	154.2 bc	100.1 cd
K3C-3	11	94.5 b-e	155.5 bc	108.8 c-e
K3C-2	13	97.5 c-e	149.8 b	77.5 a
K3C-1-4	26	102.3 de	162.9 bc	111.8 c-e
K3C-1-1	15	103.6 e	160.2 bc	121.4 e
K112-1	4	104.0 e	165.5 c	82.8 a
B				
K3C-1-2-12	7	71.6 a	153.4 d	104.9 c-e
K3C-1-2-4	19	74.0 a	136.3 ab	96.3 bc
K3C-1-2-11	8	79.9 ab	125.8 ab	101.5 b-d
K3C-1-2-13	16	80.4 ab	140.1 bc	89.3 b
K3C-1-2-3	4	81.0 ab	149.8 cd	109.5 ce
Kitawakaba	20	81.0 ab	151.3 cd	109.7 c-e
K3C-1-2-6	9	91.4 bc	128.0 ab	108.6 c-e
K3C-1-1-4	14	92.9 bc	150.9 cd	115.1 de
K3C-1-1-3	35	96.0 bc	153.6 d	118.4 e
K3C-1-2-5	5	101.0 c	126.4 a	75.8 a
K3C-1-1	15	103.6 c	156.8 d	114.7 de

A is a population of regenerants from calli derived from cotyledon of cv. Kitawakaba (Kitawakaba is control.) B is a population of regenerants from calli derived from K3C-1-1 (K3C-1-1 is control.)

* Means within columns followed by the same letter are not significantly different ($P=0.05$) using Duncan's multiple range test.

3) 茎数

茎数の値をTable 3に示した。集団Aでは3栄養系(K3C-2, K3-5, K3C-1-4)が有意に高い値を示した。集団Bでは対照栄養系に比べ有意に高い値を示した栄養系は存在しなかった。

4) 頭花数

頭花数の値をTable 3に示した。集団Aにおいては有意に高い値を示した栄養系は存在せず, 集団BにおいてはK3C-1-2-5が対照栄養系に比べ有意に高い値を示した。

5) そばかす病

そばかす病の発病程度は1~5の5段階評定(1が抵抗性, 5が感受性)で2年目のみ調査した。

集団Aの2回目の調査ですべての栄養系が親品種キタワカバの発病程度より低い値を示し, 7栄養系が有意に低かった。その他の調査では発病程度が高く, 対照栄養系に比べ有意に発病程度が低かった栄養系は存在しなかった(Table 4)。

6) 年次相関

乾物重, 草丈およびそばかす病の年次相関をTable 5に示した。

集団Aにおいて, 乾物重では初年度と次年度第1回目の調査間に5%の有意な相関が認められた($\gamma=0.655$)。しかし, その他の調査間において, 有意な相関は認められなかった。

集団Bでは, 乾物重において, 初年度と次年度1回目の間, 次年度の1回目と2回目の調査間で1%の有意な相関が認められた(それぞれ, $\gamma=0.797$, $\gamma=0.762$)。草丈では次年度1回目と2回目において5%の有意な相関が認められた($\gamma=0.671$)。

そばかす病に関しては集団A, B共に次年度1, 2回目の調査間に有意な相関は認められなかった。

7) アイソザイム

パーオキシダーゼ, エステラーゼアイソザイムのバンドパターンをFig. 1に示した。パーオキシダーゼではK3C-1-1-3, K3C-1-2-6, K3C-1-2-11, K3系統で対照系統

K3C-1-1には存在しない新しいバンドが出現し、
エステラーゼでは5系統 (K3C-1-2-12, 1-2-

6, 1-2-5, 1-2-4, 1-2-3) でバンドパターン
が異なっていた。

Table 3 Stem and receme number of somaclones
regenerated from calli derived cv.
Kitawakaba (A) and K3C-1-1 (B).
Lines are listed in order of stem number.

Line	n	Stem number	Receme number
A			
K112-1	4	12.3 a*	47.0 cd
K313-1-1	5	14.4 ab	5.2 a
Kitawakaba	20	14.8 ab	50.7 d
K3C-16	6	15.0 a-c	21.5 a-d
K3C-7	13	15.2 a-d	31.3 b-d
K3C-3	11	17.4 a-d	19.9 a-c
K3C-1-1	15	20.6 b-e	50.2 d
K3C-13	11	21.1 b-e	17.6 ab
K3C-2	13	22.2 c-e	50.8 d
K3C-5	25	22.4 de	31.6 b-d
K3C-1-4	26	25.1 e	28.8 a-d
B			
K3C-1-2-4	19	12.6 a	5.8 a
K3C-1-2-11	8	14.3 ab	26.9 a-c
Kitawakaba	20	14.8 ab	50.7 c
K3C-1-2-3	4	16.3 b-d	28.6 a-c
K3C-1-2-13	16	19.3 b-d	16.1 ab
K3C-1-2-6	9	19.4 b-d	42.1 c
K3C-1-1	15	20.3 b-d	50.2 c
K3C-1-2-5	5	21.6 b-d	171.4 d
K3C-1-2-12	7	21.7 cd	13.6 ab
K3C-1-1-4	14	21.9 cd	9.4 a
K3C-1-1-3	35	25.3 d	36.3 bc

A is a population of regenerants from calli derived
from cotyledon of cv. Kitawakaba (Kitawakaba is
control.) B is a population of regenerants from calli
derived from K3C-1-1 (K3C-1-1 is control.)

* Means within columns followed by the same letter
are not significantly different (P=0.05) using
Duncan's multiple range test.

Table 4 Leptosphaerulina leaf spot severity of
alfalfa somaclones in 1991. Lines are listed
in order of Leptosphaerulioa leaf spot
severity in July 16.

Line	n	Leptosphaerulina leaf spot severity	
		7/16	9/4
A			
K3C-13	11	2.9 a*	3.0 a-d
K3C-1-1	15	3.2 ab	2.8 a-c
K3C-1-4	26	3.2 ab	3.1 b-d
K3C-5	24	3.3 ab	3.4 c-e
K3C-16	4	3.3 ab	3.8 e
K112-1	4	3.3 ab	3.0 a-d
K3C-2	13	3.3 ab	2.7 ab
Kitawakaba	20	3.4 ab	3.8 e
K3C-3	11	3.5 b	3.5 de
K313-1-1	5	3.6 b	2.4 a
K3C-7	13	3.6 b	2.9 a-d
B			
K3C-1-2-5	5	2.8 a	3.2 bc
K3C-1-2-6	7	2.9 ab	3.3 c
K3C-1-2-11	8	2.9 ab	3.1 bc
K3C-1-2-4	19	2.9 ab	3.2 bc
K3C-1-1-4	14	3.0 a-c	3.0 a-c
K3C-1-1-3	35	3.2 a-d	3.3 c
K3C-1-1	15	3.2 a-d	2.8 a-c
K3C-1-2-12	7	3.3 b-d	3.1 bc
Kitawakaba	20	3.4 cd	3.9 d
K3C-1-2-13	16	3.5 d	2.6 ab
K3C-1-2-3	4	3.5 d	2.5 a

A is a population of regenerants from calli derived
from cotyledon of cv. Kitawakaba (Kitawakaba is
control.) B is a population of regenerants from calli
derived from K3C-1-1 (K3C-1-1 is control.)

* Means within columns followed by the same letter
are not significantly different (P=0.05) using
Duncan's multiple range test. Each score was
based on five-point severity scale where 1=lowest
and 5=highest.

Table 5 Correlation coefficients in field characters of alfalfa somaclones among three seasons.

Character	1990-1991 First	1990-1991 Second	1990-1991 Second
A			
Mean dry matter yield /plant	0.665 *	-0.144 NS	0.410 NS
Plant length	0.488 NS	-0.062 NS	0.381 NS
Leptosphaerulina leaf spot	—	—	-0.055 NS
B			
Mean dry matter yield /plant	0.797 **	0.409 NS	0.762 **
Plant length	0.038 NS	0.096 NS	0.671 *
Leptosphaerulina leaf spot	—	—	-0.290 NS

A is a population of regenerants from calli derived from cotyledon of cv. Kitawakaba (Kitawakaba: control). B is a population of regenerants from calli derived from K3C-1-1 (K3C-1-1: control).

*: significant at 5%, **: significant at 1%, NS: not significant.

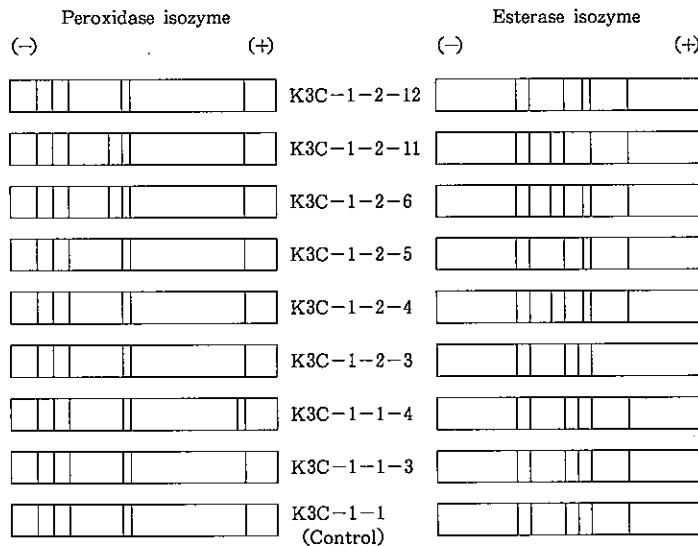


Fig. 1 Peroxidase and esterase isozymes of somaclones regenerated from K3C-1-1. K3C-1-1 were included as controls.

考 察

近年、ソマクローナル変異は多くの植物種について報告されている¹⁾。そのメカニズムとしては核型の変化、染色体の再配列、転移因子、遺伝子の増幅と欠失、DNAのメチル化、更にこれらの過程のさまざまな組み合わせが含まれている⁹⁾。Ryanら¹⁰⁾はコムギで、Dahleenら¹¹⁾はエンバクで、組織培養からの再生植物体の収量関連形質に広いソマクローナル変異が生じたことを報告した。またNagarajanとWalton³⁾もアルファルファにおいて同様な結果を報告している。本実験においてもカルスからの再分化植物の収量に関する各形質に広い変異増加が認められた。

本実験の再生個体の栄養系において、乾物重などの形質について対照系統(品種キタワカバ, K3C-1-1)より有意に高い値を示した栄養系が存在した。同様な結果がReischとBingham²⁾によってすでに報告されている。集団B(K3C-1-1由来系統)の乾物重で有意な年次相関が認められたことから、本形質が各系統において安定していると推測される。特に栄養系K3C-1-1-3は2年間の調査において対照系統(K3C-1-1)より乾物重が有意に高く、わずか9系統の中からこのような栄養系が出現したことは注目すべきことである。このことから、系統数をさらに増やせば対照系統より優れた系統をかなりの頻度で得ることが予想されよう。

そばかす病の発病程度の調査においては、対照系統に比べ安定して有意に抵抗性である栄養系は認められなかった。これは発病程度3~4の個体が多かったためと推察される。アルファルファそばかす病は病原菌 *Leptosphaerulina briosiana* によって引き起こされる葉枯れ性病で、冷夏多湿で発病しやすいことが明らかになっ

ている¹²⁾。1991年の7, 8月は冷夏多湿であったため発病程度が高かったと考えられる。

K3C-1-1を親個体とする再分化植物体8個体でのアイソザイムバンドパターンに変異が認められた。これはタンパク合成レベル上での変異を意味しており、遺伝子構造上の変化を示唆するものである。このことから収量などの形質における変異が遺伝子構造上の変化によってもたらされた可能性があると考えられる。

本実験の最終目標は北海道道東地域に適応するそばかす病抵抗性品種の育成である。今後、更に系統数を増やし検討したい。

引用文献

- 1) Larkin, P.J. and W.R. Scowcroft (1981) *Theor. Appl. Genet.* 60, 197-214
- 2) Reisch, B. and E.T. Bingham (1981) *Crop Sci.* 21, 783-788
- 3) Nagarajan, P. and P.D. Walton (1989) *Plant Breed.* 102, 333-337
- 4) Bingham, E.T. and T.J. McCoy (1986) *Plant Breed. Rev.* 4, 123-152
- 5) Koike, M., Y. Yoshida, Y. Kagaya and T. Shimada (1991) *Plant Tissue Culture Lett.* 8, 152-157
- 6) 山本多聞, 桃谷好英 (1971) *植化調* 6, 187-189
- 7) Brewbaker, J.L., M.D. Upadhyaya, M. Yrjo and T. Macdonald (1968) *Physiol. Plantarum* 21, 930-940
- 8) Brown A.H.D. (1978) *Genetica* 49, 97-108
- 9) Mantell S.H., J.A. Matthews and R.A. Mckee (1985) *Principles of Plant Biotechnology*, Blackwell. 清水 碩ら訳 (1987) *植物バイオテクノロジー*, オーム社
- 10) Ryan, S.A., P.J. Larkin and F.W. Ellison (1987) *Theor. Appl. Genet.* 74, 77-82
- 11) Dahleen, L.S., D.D. Stuthman and H.W. Rines (1991) *Crop Sci.* 31, 90-94
- 12) 富永時任 (1987) *作物病害虫百科 診断と防除* ムギ, マメ類, 飼料作物 農文協 p475-476

Summary

The field performance of two populations of alfalfa (*Medicago sativa* L.) someclones (SC., regenerants from calli) were investigated for two years (1990-1991). Variation occurred for dry matter yield, plant length, and stem and receme number. One clone, K3C-1-1-3, showed good field performance, especially in dry matter yield. It had significantly higher yields than the original cv. Kitawakaba and the original parental clone, K3C-1-1, in two trials in the second year trials. Variation also occurred for peroxidase and esterase isozymes.

Key words : alfalfa, somaclonal variation