

## 組織選抜を利用した病害抵抗性植物の育生

小池正徳

草地生産学研究室

### 1. 目的

植物育種において、病原菌毒素ならびに各種ミネラルを選抜因子として用いる細胞選抜 (in vitro selection) が現在数多くの作物で行われている。本研究はアルファルファ・バーティシリウム萎ちよう病の病原菌 (*Verticillium albo-atrum*) の培養ろ液を用い、組織培養の技術を利用して、本病害の抵抗性植物を作出することを目的とした。

### 2. 方法

#### • 供試植物

アルファルファ (*Medicago sativa* L.)

品種 キタワカバ・バーナル (カルス維持系統の Vernal-No. 32)

#### • 供試菌

*Verticillium albo-atrum* アルファルファ系 (以下 V.a.a. と略す)

#### • カルス誘導

キタワカバについては、種子をハイポネックス寒天培地 (ハイポネックス 1g/l, 寒天 8g/l) で無菌発芽させ、展開した子葉を切り出して B5h 培地<sup>1)</sup> に置床し、カルスを誘導した。Vernal-No. 32 はカルスを維持していたのでそのまま供試した。次にカルスを MS<sup>2)</sup> 液体培地 (2.4-D 2mg/l, カイネチン 0.1mg/l) に移植し懸濁培養した。

#### • 選抜

選抜培地は MS を基本とし、Czapeck-Dox 液体培地で 2 週間培養した V.a.a. の培養ろ液を 0.45  $\mu\text{m}$  のメンブランフィルターで無菌ろ過し、10, 20, 30% の濃度になるように基本培地に添加した。次に細胞濃度が  $1 \times 10^4$  になるようにトーマの血球計算板で調整し、アルファルファの細胞をそれぞれの濃度の培地に移植した。選抜は振透培養で 2 週間続けた。

#### • 生存細胞のカルス形成・植物体の再分化

選抜終了後、細胞を遠心分離で集め、カルス形成培地<sup>3)</sup> (SH+2.4-D 5.0mg/l+カイネチン 2.0mg/l) にプレティングした。その後 30 日目に、生育したカルス数を調査した。次に生育したカルス数を不定胚形成培地<sup>3)</sup> (SH+50mM プロリン+22.4mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) に移植した。その後カルスを 25°C, 日長 16 時間で培養し、出現した不定胚数を測定後、ホルモン無添加の 1/2 SH 培地に移植し、小植物体の再分化操作に移った。

表1. V.a.a. ろ液選抜後のカルス形成式

品種/ろ液濃度	0%	10%	20%	30%
vernal-No.32	275	31(11.3%)	5(1.8%)	4(1.5%)
キタワカバ	634	129(20.3%)	0	0

表2. V.a.a. ろ液選抜後の不定胚形成(Vernal-No.32)

ろ液濃度(%)	供試カルス数	不定胚形成数	再分化植物体数
0	275	34(12.4%)	3(1.1%)
10	31	6(19.4%)	0
20	5	—	—
30	4	—	—

表3. V.a.a. ろ液選抜後の不定胚形成(キタワカバ)

ろ液濃度(%)	供試カルス数	不定胚形成数	再分化植物体数
0	322	181(56.2%)	41(12.3%)
10	217	117(53.9%)	9(4.1%)

### 3. 結果と考察

ろ液濃度別のカルス生存数を表1に示した。10% 処理区では、キタワカバおよび Vernal-No. 32 ともカルスが形成された。20% および 30% 処理区においては Vernal-No. 32 のみがそれぞれ 4 個、5 個のカルスを形成した。無処理区についてはプレーティング後 30 日目に直径約 3 mm 以上のカルスを計測しており、測定後もかなり多数のカルスが形成された。よって各処理区の無処理区に対する生存率は、実際にはかなり低くなるものと思われる。

Vernal-No. 32 の不定胚の形成数および植物体の再分化数を表2に示した。10% 処理区の不定胚の形成率は無処理区にくらべやや高かった。20% および 30% 処理区の生存カルスは不定胚形成培地に移植後 1~2 週間で褐変枯死した。Vernal-No. 32 では、ろ液処理生存カルスからの植物体は得られなかった。

キタワカバの不定胚形成数および植物体の再分化数を表3に示した。不定胚形成率は無処理区、10% 処理区それぞれ 56.2%、53.9% と Vernal-No. 32 に比べかなり高かった。これは Vernal-No. 32 は継代培養を続けていたカルスを供試したのに対し、キタワカバは植物体から誘導直後の新鮮なカルスを供試したからではないかと思われる。再分化植物体も、キタワカバでは無処理区で 41 個体、10% 処理区では 9 個体得られた。

今後、ろ液処理生存カルスから得られた植物体の生育を待ち、本病に抵抗性を有するかどうか、また染色体数が安定しているかどうか、さらには抵抗性が後代に遺伝するかどうかの検定が必要である。

### 4. 引用文献

- 1) Brown D.C.W. & A. Atanassov(1985). Plant Cell Tissue Organ Culture 4, 111-122.
- 2) Murashige T. & F. Skoog(1962). Physiol. Plant 15, 473-497.
- 3) 奥村健治・大澤勝次(1988). 日草誌, 34(別), 35-36.