

種間雑種によるアカクローバの改良

嶋田 徹・村上 馨

(1) 研究目的

アカクローバの牧草としての最大の欠点はその永続性が乏しく、2～3年しか利用できないことである。そこで、同じ属の他の種にみられる優れた永続性を、種間交雑によってアカクローバに導入することができれば、アカクローバの栽培的価値をさらに高めることができるであろう。ところでアカクローバを交配親とする種間雑種作成の最大の難点は、その交雑不和合性が著しくなかなか種子が得られないことである。そこでその難点を打破する方策として最近急速に進歩した組織培養法を利用し、本来なら胚の発生初期で退化して不稔となる種子を発芽可能な段階まで養育しようとした。今回は中島ら(1969)がシロクローバの胚珠培養に使用して優れた成績を示した培地を中心として、アカクローバの胚珠培養に適した培地の検討を行なう。

(2) 研究方法

授粉後5日から9日目の子房を試験培地に置床し、25℃、暗黒の定温器中にて約1カ月間培養した後、胚の生長の程度を測定した。子房をアンチホルミン液でよく殺菌したのち解培顕微鏡下で胚珠をとりだした。次いでこれらの胚珠を滅菌水でよく水洗し試験管(10ml)に入れた培地上に置床した。

Nitschの培地の各塩類に加えて、ショ糖3%、寒天0.7%を加えた培地を基本培地(BM)とし、これにイーストエキス(YE)0.5%、カザミノ酸(CA)100mg/l、ナフタレン酢酸(NAA)0.1mg/l、ジベレリン(GA)10mg/lを組み合わせて6種の培地を造り、個々の添加物の効果を予備的に検討した。その結果、基本培地にジベレリンおよびカザミノ酸を加えた培地(BM+GA+CA培地)がもっとも優れていることが分かったので、第2段階では、これらの塩類にさらにインドール酢酸(IAA)およびカイネチン(K)を加えた培地を造りその効果を検討した。また、基本培地を造る際リン酸第1カリウムの代りにリン酸緩衝液(1/30M, pH 6.1)を用いた。培養液はいずれも培養瓶に注入された後、圧力1kg/cm²で15分間加圧滅菌された。

(3) 研究結果

まず基本培地の外にジベレリン、ナフタレン酢酸、イーストエキス、およびカザミノ酸の効果を予備的に検討した。これらの濃度はシロクローバや他の近縁な種で検討されているものをそのまま使用した。それ故、個々の添加物の濃度水準を変えることはしなかった。得られた結果を要約すると第1表のとおりである。基本培地だけで培養した場合、胚の発達は非常に不良で胚珠の大きさも小さかった。中島ら(1969)はこの基本培地だけでシロクローバの5日目の胚珠を発芽種子まで発育させたが、アカクロー

ーバでは9日目の胚珠でも発芽種子を得ることができなかった。このような草種による差異は花粉の人工発芽の培地においても知られており、アカクローバは一般に複雑な培地を要求する傾向が認められた。イーストエキスの添加はむしろ胚珠の発達を阻害する傾向がみられた。基本培地にジベレリンおよびNAAを添加した№2の培地では8日目からの胚珠の11%が発芽しているのに、この培地にさらにイーストエキスを添加した№3の培地では発芽種子は全く得ることができなかった。このような傾向は№5および№6の培地でも認められた。もっとも優れた成績は№4の基本培地にジベレリンとカザミノ酸を加えた培地であった。この培地では6日目の胚珠で3%、7日目で11%、8日目で44%、9日目で79%が発芽種子まで発達した。完熟種子の比率はさらに高く6日目で33%であった。

第1表 置床後1カ月目における発芽種子の比率(%)

№	培地の種類	置床した胚珠の授粉後日数(日)				
		5	6	7	8	9
1	BM	0	0	0	0	0
2	BM+GA+NAA	0	0	0	11	60
3	BM+GA+NAA+YE	0	0	0	0	0
4	BM+GA+CH	0	3	11	44	79
5	BM+NAA+CH+YE	0	0	0	3	—
6	BM+CH+YE	0	0	0	0	0

次いで№4の培地をさらに改良しようとし、№4の培地の成分に加えて、IAAおよびカイネチンの各3水準の濃度を組合せた9種類の培地を造り、胚珠の発達程度を比較した。得られた結果を示すと第2表のようであった。供試胚珠が少ないのでかなりのばらつきがあるが平均で比較すると、IAAは10mg/lまで効果があり、カイネチンは1mg/lまで効果が認められた。したがって、本試験の結果からアカクローバの胚珠培養の培地としては第3表に示すような培地がもっとも優れており、この培地によって受粉後6日目の胚珠を18%程度発芽種子まで発達させ得ることが分った。

第2表 発芽種子の比率(%)に及ぼす
カイネチンとIAAの効果

濃度 (mg/l)		置床した胚珠の授粉後日数(日)			
カイネチン	IAA	6	7	8	平均
0	0	5	0	17	7.3
0	1	13	6	11	10.0
0	10	5	12	31	16.0
平均		7.7	9.0	19.7	
1	0	0	6	23	9.7
1	1	15	7	25	15.7
1	10	18	33	17	22.7
平均		11.0	15.3	21.7	
10	0	8	21	—	—
10	1	20	6	33	19.7
10	10	6	7	17	9.7
平均		11.3	11.3	25.0	

第3表 もっとも優れた成績を
示した培地の組成

組 成	濃 度 (mg/l)
MgSO ₄ · 7H ₂ O	125.0
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	500.0
KNO ₃	125.0
MnSO ₄ · 4H ₂ O	3.0
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.5
H ₃ BO ₃	0.5
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.025
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.025
Fe-citrate	10.0
Keinetin	1.0
IAA	10.0
Sucrose	3,000
Agar	700

(4) 考察・今後の方針等

種間交配の結果生ずる雑種胚が胚形成のどの段階で退化するかは、種間の組合せによって非常に異なっているが、多くは前胚期で退化する。これは授粉後2日から3日目であり、これらの胚珠の胚を組織原分化期(授粉後4日目)、子葉分化期(6日目)、子葉伸長期(7日目)、頂芽分化期(8日目)をへて初葉分化期(10日目)程度まで如何に発達させ得るかが胚珠培養の役割である。アカクローバにおけるこの種の研究は非常に少なくKein(1953)が雑種の胚培養を行なった報告だけが知られている。彼はRandolphとCoX(1943)の培地を利用して8日目の胚の1部を発芽種子まで発達させることに成功している。しかしそれ以前の胚については成功していない。これに対して本試験では、胚珠培養によって6日目の胚珠をかなりの成功率で養育することができ、養育可能な限界日数をさらに2日間短縮することに成功した。この時期の胚はだいたい子葉分化期であり、種間雑種の種子をより確実にとるためにはさらにもう2日程度この限界日数を短縮することが必要である。シロクローバにおける成功例などから判断して、そのことは決して不可能なことではないと思われ、さらにこの種の試験の続行が望まれる。