

オオムギ葯培養における不定胚形成と培養条件

浜地 勇次・小松田隆夫*・中島 皐介*
(福岡県農業総合試験場・*農業生物資源研究所)Effect of some factors on embryoid formation
in barley (*Hordeum vulgare* L.) anther cultureYuji HAMACHI, Takao KOMATSUDA* and Kousuke NAKAJIMA*
(Fukuoka Agric. Res. Cent., *NIAR)

オオムギの育種において、半数体を利用して育種年限を短縮する方法としては(1)葯および花粉培養、(2)野生大麦 (*Hordeum bulbosum* L.) との種間交雑等があげられ、二条オオムギ品種を用いた例として、葯培養では浜地ら^{3,4)}の、野生大麦との種間交雑では古庄ら⁷⁾の報告がある。

このうち、浜地ら^{3,4)}は花粉から直接不定胚を経由して緑色植物体を得たことを報告した。しかし、花粉からの緑色植物の再生率は、野生大麦との種間交雑による方法⁷⁾と比較してかなり劣った。この原因として、花粉からの不定胚の出現率がまだ低いこと、不定胚から再分化した植物体はアルビノが多いことがあげられる⁴⁾。

オオムギ葯培養において、花粉からの緑色植物の再生率を高める試みとしては低温による前処理⁵⁾、培地上の葯の向き⁶⁾、培地の糖類成分¹⁰⁾等の検討があるものの、いずれも供試品種が外国での限られた品種である。

そこで、本報告では日本の二条オオムギ品種について、花粉からの不定胚形成率をさらに高めるために、不定胚およびカルス形成における低温による前処理、培地上の葯の向き、培地のしょ糖濃度および培養時の光条件の効果について検討した。

材料および方法

供試した品種は、「はるな二条」および「ニシノチカラ」の二条オオムギ 2 品種である。材料は1986年 9 月下旬～12月中旬と1986年11月中旬～1987年 2 月下旬に養成した。材料は止葉の基部が抽出した長さを目安¹¹⁾として、花粉の生育段階が第 1 核中期に採取した。

採取した材料は、葉鞘を残したまま有効塩素1.0～1.5%のアンチホルミン溶液で15～20分間滅菌し、滅菌水で3回洗浄してから穂を取り出した。穂は適度に湿らせたろ

紙を敷いた直径 9 cmのシャーレに置床し、4℃、暗黒条件下で28日間の低温処理⁵⁾を行った。なお、一部の材料については対照として低温処理を行わなかった。

低温処理後、穂から葯を取り出して次の 2 種類の培地に置床した。一つはMSの基本組成⁸⁾に 1 ℓ 当り I A A 1 mg, B A 1 mg, しょ糖60 g および寒天 8 g を加えて pH6.0に調整した培地²⁾(培地 I)で、もう一つはN₆の基本組成¹⁾に 1 ℓ 当り2.4-D1.75mg, カイネチン0.25mg および寒天 8 g を加えて pH6.0に調整した培地⁹⁾(培地 II)である。なお、培地 II はしょ糖濃度を 1 ℓ 当り80 g と120 g の 2 段階とした。

葯は二つの半葯の片方だけが培地に接するようにして垂直に置床し⁴⁾(以下垂直な葯とする)、25℃の暗黒条件および100luxの弱光条件下で培養した。

置床後、一部の葯は培地に対して水平に傾いた。置床 1 か月後に形成された不定胚およびカルスの数を、培地に対して垂直な葯と水平に傾いた葯(以下水平な葯とする)に分けて数えた。

結果および考察

オオムギ葯培養では、葯を置床する前にあらかじめ穂を低温処理しておくことがカルス形成にとって効果的である⁶⁾。本試験で供試した「はるな二条」においても、第 1 表に示すように低温処理によってカルスおよび不定胚形成率が高まった。低温処理をしなかった葯からは不定胚が全く観察されなかった。したがって、オオムギ葯培養では低温による前処理が不定胚形成にとっても効果的である。

オオムギの花粉からの不定胚形成には培地上の葯の向きが重要であると報告されている⁶⁾。二条オオムギ品種においても、不定胚はすべて垂直に置床した葯の培地に

第1表 オオムギ葯培養の不定胚形成における低温による前処理の効果²⁾

低温 期間 (日)	置床 葯数	反応 葯数	カルス形成		不定胚形成	
			葯数	総数	葯数	総数
0	272	2 (0.7) ¹⁾	2 (0.7)	2 (0.7)	0 (0)	0 (0)
28	838	17 (2.0)	7 (0.8)	7 (0.8)	13 (1.6)	22 (2.6)

注) 1) () 内の数値は置床葯数に対する比率 (%) を示す

2) 培地 I (本文参照), 供試品種: はるな二条

接していない上側の葯室の割れ目から形成されたことを浜地ら⁴⁾は報告している。ここでははるな二条を供試して, 培地上の葯の向きとカルスおよび不定胚形成率との関係について詳細に検討したところ, 培地に対して垂直な葯からは2種類の培地の合計で置床葯数の4.2%の不定胚, 1.9%のカルスが形成されたのに対し, 培地に対して水平な葯からは不定胚, カルスともに全く観察されなかった(第2表)。したがって, 二条オオムギ品種においても, 培地上の葯の向きは不定胚形成にとって著しい影響を及ぼした。

培地のしょ糖濃度および培養時の光条件とカルスおよび不定胚形成率との関係を第3表に示した。供試品種は二条オオムギ品種のなかで高い不定胚形成率を示した「ニシノチカラ」³⁾で, 低温による前処理を行い, 培地に対して垂直な葯のみについて検討した。しょ糖濃度は8%の方が12%より, 培養時の光条件は暗黒下の方が100luxの弱光下より不定胚の形成率が高かった。このうち, 培地のしょ糖濃度はカルスと不定胚形成に影響を及ぼすという報告¹⁰⁾がある。本試験の結果からも, 培地のしょ糖濃度は不定胚形成に影響を及ぼすと考えられる。また, 培養時の光はカルスと不定胚形成を抑制すると考えられる。

以上の結果から, 二条オオムギ品種について花粉からの不定胚形成率を高めるためには, 低温による前処理と培地上の葯の向きが効果的であった。また, 培地のしょ糖濃度および培養時の光条件も不定胚形成に影響を及ぼすと考えられる。

現在のところ, 二条オオムギ品種の葯培養による緑色植物の再生率は, 野生大麦との種間交雑による方法⁷⁾と比較してかなり劣っている。したがって, 二条オオムギ品種の葯培養による緑色植物の再生率を高めるためには, 今後多くの品種について不定胚形成率の高い品種の探索と, さらに培養条件を検討することによって不定胚形成率の向上を図ることが重要である。

第2表 オオムギ葯培養の不定胚形成における葯の向きの効果³⁾

葯の ²⁾ 向き	置床 葯数	反応 葯数	カルス形成		不定胚形成	
			葯数	総数	葯数	総数
垂直	1541	47 (3.0) ¹⁾	24 (1.6)	30 (1.9)	34 (2.2)	65 (4.2)
水平	93	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

注) 1) 第1表と同じ

2) 置床1か月後の葯の向き

3) 低温による前処理を行った葯について数え, 数値は培地 I と II (本文参照) の合計で示した。供試品種: はるな二条

第3表 オオムギ葯培養の不定胚形成における培地のしょ糖濃度および培養時の光の効果²⁾

しょ糖 濃度 (%)	光強度 (lux)	置床 葯数	反応 葯数	カルス形成		不定胚形成	
				葯数	総数	葯数	総数
8	0	327	33 (10.1) ¹⁾	16 (4.9)	24 (7.3)	25 (7.6)	61 (18.7)
8	100	196	13 (6.6)	2 (1.0)	2 (1.0)	12 (6.1)	24 (12.2)
12	0	213	15 (7.0)	10 (4.7)	15 (7.0)	9 (4.2)	17 (7.9)

注) 1) 第1表と同じ

2) 培地 II (本文参照), 供試品種: ニシノチカラ。

低温による前処理を行い, 培地に対して垂直な葯について数えた

摘 要

日本の二条オオムギ品種の葯培養において, 花粉からの不定胚形成率を向上させるためにいくつかの培養条件について検討した。

1. 葯を置床する前にあらかじめ穂を4°C, 28日間の低温処理をすることによって, 不定胚の形成率が高まった。
2. 培地に対して垂直に置床した葯では, 置床葯数の4.2%の不定胚, 1.9%のカルスが形成されたのに対し, 培地に対して水平な葯からは不定胚, カルスともに全く観察されなかった。
3. 不定胚の形成率は培地のしょ糖濃度8%の方が12%より, 葯置床後の光条件では暗黒下の方が100lux 前後の弱光条件下より高かった。

引用文献

- 1) CHU, C. C. 1978. The N6 medium and its application to anther culture of cereal crops. In "Proc Symp Plant Tissue Cult", Science Press, Peking. 45—50.
- 2) CLAPHAM, D. 1973. Haploid *Hordeum* plants from anthers in vitro. Z. Pflanzenzüchtg 69 : 142—155.
- 3) 浜地勇次・小松田隆夫・中島皐介 1987. オオムギ培養系の育種的利用に関する研究. III. 葯培養からの不定胚形成と植物体再生. 育種 37 (別2) : 110—111.
- 4) HAMACHI, Y., T. KOMATSUDA and K. NAKAJIMA 1988. Embryoid formation and plant regeneration in anther culture of tow-rowed barley cultivars in Japan. Japan. J. Breed. 38 (3) : 363—366.
- 5) HUANG, B. and N. SUNDERLAND 1982. Temperature-stress pretreatment in barley anther culture. Ann. Bot. 49 : 77—88.
- 6) HUNTER, C. P. 1985. The effect of anther orientation on the production of microspore-derived embryoids and plants of *Hordeum vulgare* cv. Sabarlis. Plant Cell Reports 4 : 267—268.
- 7) 古庄雅彦・浜地勇次・伊藤昌光 1987. 半数体利用によるビール大麦の育種方法. I. 効率的な半数体の作出法. 日作九支報 54 : 92—94.
- 8) MURASHIGE, T. and F. SKOOG 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15 : 473—497.
- 9) SHANNON, P. R. M, A. E. NICHOLSON, J. M. DUNWELL and D. R. DAVIES 1985. Effect of anther orientation on microspore-callus production in barley (*Hordeum vulgare* L.). Plant Cell Tissue Organ Culture 4 : 271—280.
- 10) SORVARI, S. and O. SCHIEDER 1987. Influence of sucrose and melibiose on barley anther cultures in starch media. Plant Breeding. 99 : 164—171.
- 11) WHEATLEY, W. G., A. A. MARSOLAIS and K. J. KASHA 1986. Microspore growth and anther staging in barley anther culture. Plant Cell Reports 5 : 47—49.