

## ダイズ成熟種子胚軸からの不定芽形成

吉田泰二

(東北農業研究センター)

遺伝子組換えに用いることのできる簡単に安定なダイズの培養系を開発するため、成熟種子胚軸からの効率的な不定芽形成条件を明らかにした。胚軸上部を軸に対して垂直に切断した子葉節部位を含む長さ1 mmの切片とその根側の1 mmの切片を材料として用いた。チジアズロン(TDZ)の効果、切片の培地への置床方法の影響、品種間差について調べた。胚軸の子葉節切断面では、全ての条件で芽が形成された。一方、胚軸切断面では、TDZが不定芽形成に必要で、最適濃度は2~10 μMであった。不定芽形成効率は材料の置床方法により変化し、胚軸の軸

を培地に垂直になるように置くことで上昇した。また、不定芽は、培地の表面に接している切断面から形成され、空気中および培地中の切断面からは形成されなかった。さらに、子葉節からの長さが1 mmの切断面が2 mmの切断面より効率的に不定芽を形成した。東北地域で栽培されている6品種を用いた場合、子葉節切断面における芽形成に品種間差は認められなかったが、胚軸切断面における不定芽形成には著しい品種間差が認められた。

Breeding Science 52: 1-8 (2002)

## ソバ種間交雑 *Fagopyrum tataricum* × *F. esculentum* の接合体の発育停止をともなう受精の不成立

Nilufar Yasmin Shaikh<sup>1)</sup>・関 黎明<sup>2)</sup>・足立泰二<sup>1)</sup>

(<sup>1)</sup>大阪府立大学大学院・農学生命科学研究科, <sup>2)</sup>宮崎大学・農学部)

ダツタンソバ(*F. tataricum*)と普通ソバ(*F. esculentum*)との種間雑種における胚のうの発達を光学顕微鏡と透過型電子顕微鏡(TEM)で観察した。雑種胚形成のための受精前後の障壁を超微細構造の特性を中心に見たものである。TEM試料として受粉後1~5日目の胚珠を摘出し、固定した。ダツタンソバでは自家受粉を実施し、普通ソバでは適法受粉を行ったものを対照として用いた。主な異常症状としては、受粉後1日目の接合胚のうにおいて、両助細胞の同時変形発育および助細胞間の合点側細胞壁肥大が観察された。正常な細胞質の卵細胞と中央細胞が観察されたが、この場合、助細胞へ花粉管の貫入が行われない結果の受精不成立による種間不和合であると考えられた。一方、

受粉後5日目の胚のうにおいて、卵、精核の融合は観察されたものの、その後、接合体細胞壁の部分崩壊、消失をともなう細胞分裂停止が見られ、また、リボソームの減少により疎に散在したその他の細胞内小器官や、各細胞内小器官の減少をともなう胚乳細胞分裂の遅延が観察された。この場合、接合体細胞は、周辺の異常な胚乳細胞からの栄養供給が行われず、結果的に接合子胚の生育に遅延をもたらしていると考えられた。これらの受精前後の諸症状を、種間雑種の障害が生じていることと関連づけて論じた。

Breeding Science 52: 9-13 (2002)

## 倍加半数体イネ品種「白雪姫」の形質安定性

杉本和宏<sup>1)</sup>・荒井輝博<sup>2)</sup>

(<sup>1)</sup>南九州大学・園芸学部, <sup>2)</sup>岐阜県農業技術研究所)

薬培養によって育成された品種と従来法による品種が理論的に提唱されているように等しく扱いうるものかどうかを確かめるため、イネ(*Oryza sativa* L.)の薬培養由来の倍加半数体品種「白雪姫」と、従来法による3品種「コシヒカリ」、「日本晴」、「ハツシモ」の形質安定性を比較した。出穂期、稈長、穂長、穂数について、世代を追って10年間調査を行った。出穂始から出穂揃までの日数については、倍加半数体品種と従来品種との

間に差異は認められなかった。変動係数(CV)からみた稈長と穂長の安定性にもとくに有意差は認められなかった。稈長の変動係数についても、年次間及び品種間で有意差が認められなかったことから、稈長の高い安定性が示された。穂数の変動係数では、年次間、品種間及び作期において有意差が認められたものの、倍加半数体品種と従来品種との間には、両作期ともに有意差は認められなかった。したがって、「白雪姫」の変動係数は

従来品種よりも高くないことが示された。これらの結果は、倍加半数体品種の形質安定性は従来品種とは異なることを示すものであり、葯培養法は従来の育種法を十分に補完しうる技

術であることが示唆された。

**Breeding Science** 52: 15-21 (2002)

## ハクサイ [*Brassica rapa* (syn. *B. campestris*)] の小孢子培養における蕾および花序の低温前処理の効果

佐藤正紀<sup>1,2)</sup>・加藤紀夫<sup>1)</sup>・岩井純夫<sup>1,3)</sup>・萩森 学<sup>1)</sup>

(<sup>1)</sup>日本たばこ・植物開発センター, <sup>2)</sup>現: 日本たばこ・葉たばこ研究所, 現:<sup>3)</sup>鹿児島大学・農学部)

ハクサイの小孢子培養において、蕾と花序の低温前処理の効果を調査した。培養前の蕾または花序を4°Cにて3日または10日間処理することにより不定胚形成数の向上効果が認められた。蕾の前処理は花序の前処理よりも効果的で、20日間にわたる長期間の前処理においても向上効果が認められた。そこで、蕾の低温前処理中の小孢子発達について調査を行った。花弁長と葯長の比が0.7~1.0の蕾を集めて低温処理を行い、小孢子的発達ステージを29日間にわたり、経時的に調査した。処理前の小孢子は全て一細胞期後期の発達ステージであったが、低温処理期間中に一細胞期後期の小孢子的割合は減少し、不均等二

分裂の結果生じた栄養細胞と生殖細胞からなる二細胞期の小孢子が増加したことから、成熟花粉へ向かう小孢子的発達が緩やかに進行していることが示唆された。また同時に、均等な大きさの二つの核を持つ二細胞期の小孢子も観察された。この均等二分裂はハクサイ小孢子培養において、正常な小孢子発達から逸脱して不定胚形成へと向かう最初のステップであり、低温前処理によって不定胚形成が誘導されることを示唆するものである。

**Breeding Science** 52: 23-26 (2002)

## *Alstroemeria ligtu* L. hybrid と *A. pelegrina* L. var. *rosea* 間の種間雑種、複二倍体および二基三倍体における花粉母細胞の染色体対合とギムザCバンドパターン

石川貴之<sup>1)</sup>・石坂 宏

(埼玉県農林総合研究センター園芸支所, <sup>1)</sup>現: 埼玉県加須農業改良普及センター)

*Alstroemeria ligtu* L. hybrid (LH,  $2n=2X=16$ ), *A. pelegrina* L. var. *rosea* (PR,  $2n=2X=16$ ) およびそれらの雑種 ( $2n=2X=16$ ,  $3X=24$ ,  $4X=32$ ) について、花粉母細胞の染色体対合とギムザCバンドパターンを調査した。LH および PR の花粉母細胞減数分裂の第一中期における染色体の平均対合数は、それぞれ  $0.04 I+7.98 II$  と  $0.08 I+7.96 II$  であった。花粉母細胞は正常に分裂し、それぞれ 98.4%、94.9% と高い花粉稔性を示し、自家受粉により成熟種子を形成した。LH×PR ( $2n=16$ ) の花粉母細胞の第一中期における二価染色体対合頻度は低く、平均対合数は  $11.18 I+2.41 II$  であった。この雑種では、花粉母細胞の第一後期、第二後期および小孢子的一核期初期において、高頻度で染色体橋や小核が観察され、0.6% の低い花粉稔性を示し、自家受粉および両親種への戻し交雑により成熟種子を形成しなかった。一方、LH×PR の複二倍体 ( $2n=32$ ) の花粉母細胞の第一中期における二価染色体対合頻度は高く、平均対合数は  $0.82 I+15.59 II$  であった。この複二倍体の花粉母細胞は正常に分裂し、86.3%

と高い花粉稔性を示した。自家受粉により成熟種子は形成されなかったが、LH との正逆交雑により成熟種子が形成された。また、二基三倍体 ( $2n=24$ , LH×複二倍体および PR×複二倍体) の花粉母細胞の第一中期における染色体の平均対合数は、それぞれ  $8.24 I+7.85 II+0.02 III$  と  $8.58 I+7.66 II+0.03 III$  であった。これらは花粉母細胞の第一後期、第二後期および小孢子的一核期初期において、高頻度で染色体橋や小核が観察され、それぞれ 14.8% と 13.0% の花粉稔性を示した。自家受粉により成熟種子は形成されなかったが、LH に LH×複二倍体による二基三倍体を交雑した場合のみ成熟種子が形成された。ギムザCバンド法により、LH では花粉母細胞減数分裂の第一中期の 8 本中 7 本の二価染色体、第一後期の 8 組中 7 組の染色体から Cバンドが観察されたが、PR では観察されなかった。これらの Cバンドを有する染色体は、種間雑種、複二倍体および二基三倍体でも認められた。

**Breeding Science** 52: 27-33 (2002)

## イネの出穂期に関与する量的形質遺伝子座 *Hd9* の検出と特徴づけ

林 鴻宣<sup>1,4)</sup>・芦荊基行<sup>1,5)</sup>・山内歌子<sup>2)</sup>・佐々木卓治<sup>3)</sup>・矢野昌裕<sup>3)</sup>

(<sup>1</sup>)生物系特定産業技術研究推進機構, (<sup>2</sup>)農林水産先端技術研究所, (<sup>3</sup>)農業生物資源研究所, (<sup>4</sup>)現: Shanghai Institute of Plant Physiology and Ecology, The Chinese Academy of Sciences, (<sup>5</sup>)現: 名古屋大学・生物分子応答研究センター)

日本型イネ品種「日本晴」を繰り返し親としたインド型品種「Kasalath」との戻し交雑後代 BC<sub>4</sub>F<sub>2</sub> 世代を利用して, 出穂期に関与する新規な量的形質遺伝子座 *Hd9* を検出した. RFLP マーカーによる連鎖解析により, *Hd9* は単一遺伝子座として第3染色体短腕上に位置づけられた. すなわち BC<sub>4</sub>F<sub>2</sub> 個体から由来する BC<sub>4</sub>F<sub>3</sub> 系統の後代検定により, *Hd9* は RFLP マーカー S12021 と共分離することが判明した. さらに *Hd9* を含む Kasalath の染色体領域を日本晴のゲノムに置換した準同質遺伝子系統 NIL (*Hd9*) を, 戻し交雑後代からマーカー支援による選抜で作出し

た. NIL (*Hd9*) の到穂日数は長日条件あるいはつくば市の圃場栽培では日本晴に比較して増加したが, 短日条件では日本晴とほぼ同じであった. NIL (*Hd1*) および NIL (*Hd2*) と NIL (*Hd9*) との交配によって得られた F<sub>2</sub> 集団の解析により, *Hd9* の晩生化作用は *Hd1* および *Hd2* の形質発現に対して相加的であることが判明した. この結果はこれらの遺伝子の発現には相互作用が存在しないことを示唆する. 以上の結果を基に, *Hd9* の生物的機能を推定した.

**Breeding Science** 52: 35-41 (2002)

## *Bacillus thuringiensis* 由来 delta-endotoxin 遺伝子の導入による耐虫性キク作出

篠山治恵<sup>1)</sup>・駒野雅保<sup>1)</sup>・野村幸雄<sup>2)</sup>・永井輝行<sup>1)</sup>

(<sup>1</sup>)福井県農業試験場, (<sup>2</sup>)福井県庁)

キク [*Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitamura] の生産現場では, 害虫の発生による収量の減少や, 防除のための化学農薬にかかるコスト増加, また化学農薬使用による環境への負荷が大きな課題になっている. そこで *Bacillus thuringiensis* 由来の delta-endotoxin 遺伝子を, キク品種「秀芳の力」に導入し, 耐虫性キクの作出を試みた. *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1 由来の遺伝子 *cry1Ab* はキクの主要害虫の1つであるオオタバコガ (鱗翅目昆虫) に対して毒性を持つことが知られている. この遺伝子をバイナリーベクター pBI121 に組み込み, *Agrobacterium* 法にてキクに導入した. 1,760 枚の葉片より, 92 個体の植物体

が再分化し, サザンプロット解析により, 92 個体すべてに *Bt* 遺伝子の存在が確認された. 92 個体より無作為に 20 個体を抽出し, ウェスタンプロット解析により Cry1Ab タンパク質の含量を同定したところ, 可溶性タンパク質 50 μg あたり 4.5 ng から 40 ng の Cry1Ab タンパク質 (0.009 から 0.08%) が検出された. 可溶性タンパク質 50 μg あたり 32.5 ng 以上の Cry1Ab タンパク質が検出された形質転換体では, 非形質転換体に比べて, オオタバコガに対する生育抑制効果と食害抑制効果が有意に高かった.

**Breeding Science** 52: 43-50 (2002)

## プロピザミド処理したヘメロカリス懸濁培養細胞からのマイクロプロトプラストの単離とその特徴

斉藤宏之・中野 優

(新潟大学・農学部)

マイクロプロトプラストを用いた非対称融合により, ユリ科花卉園芸植物において属間の染色体添加系統を作出することを目的として, 微小核を形成したヘメロカリス「ステラ・デ・オロ」 (*Hemerocallis hybrida* cv. *Stella d'Oro*) の懸濁培養細胞からマイクロプロトプラストを単離する方法を確立した. 培養細胞を 2 mM ハイドロキシウレア (HU) で 24 時間, その後 8 μM プロピザミド (PRO) で 60 時間処理し, さらに PRO 処理を開始して 20

時間後に 20 μM サイトカラシン-B (CB) を添加することにより, 微小核の形成が効率的に誘導され, そのときの微小核形成率は 19.1% であった. 微小核を形成した細胞を細胞壁消化酵素溶液で処理し, 単離されたプロトプラストをパーコール連続密度勾配を用いて超遠心分離を行うことにより, わずかな細胞質に囲まれた小核をもつマイクロプロトプラストが単離された. それらを孔径 50, 20 および 10 μm のナイロンメッシュに連続して

通すことにより、直径10 μm以下のマイクロプロトプラストが1 ml圧縮細胞量の培養細胞あたり $2.9 \times 10^4$ 個得られた。フローサイトメトリー分析により、それらのマイクロプロトプラストは2Cレベル以下のDNA量をもち、それらの一部の核の相対蛍

光強度は、1から数本の染色体のものに相当することが示された。

**Breeding Science** 52: 51-56 (2002)

## 凍結マイクロトームによる植物組織の生体切片作製

前川雅彦<sup>1)</sup>・川本忠文<sup>2)</sup>

(<sup>1)</sup>岡山大学・資源生物科学研究所, <sup>2)</sup>鶴見大学・歯学部・RI研究センター)

従来から、生体切片作成のために凍結マイクロトームが利用されてきているが、植物組織の場合、種々の環境要因に対する防御機構(ワックス、棘毛など)を発達させていて、凍結マイクロトームによる超薄切片作製が難しかった。そこで、Kawamoto and Shimizu (2000)がネズミの歯や骨などの硬組織を含む全身の超薄切片作製に成功した方法、すなわち凍結マイクロトームで作製

した切片を接着剤つきのフィルムで支持する方法をイネの葉の横断切片作製に適用した。さらに、前処理として0.3%Tween 20を含む10%のショ糖溶液を減圧浸透させた。その結果、イネの葉身の均一な横断切片作製に成功した。凍結マイクロトームによる植物組織の生体切片作製法の手順を詳述した。

**Breeding Science** 52: 57-60 (2002)

## リョクトウの種々の開花盛期由来の収量及び収量構成要素

Gul S. S. Khattak<sup>1)</sup>・Muhammad A. Haq<sup>2)</sup>・Muhammad Ashraf<sup>3)</sup>・Said Hassan<sup>1)</sup>

(<sup>1)</sup>Nuclear Institute for Food and Agriculture, Pakistan, <sup>2)</sup>Nuclear Institute for Agriculture and Biology, Pakistan, <sup>3)</sup>Department of Botany, University of Agriculture, Pakistan)

リョクトウは熱帯、亜熱帯の多くの国々に於いて重要なマメ科作物である。アジアで共通する播種時期は7月から10月であるが、この時期には開花盛期が繰り返し、成熟期が揃わない。本研究では、パキスタンの7品種、インドの1品種を用いて、無作為配列ブロッコ法により、最初の開花盛期と2回目の開花盛期に咲いた花を区別して、開花まで日数、成熟まで日数、個体当たり莢数、莢長、莢当たり種子数、1000粒重、個体当たり収量を調査した。最初の開花盛期に開花したものは2回目の開花盛期に咲いたものに比較して莢長、莢当たり種子数、1000

粒重、個体当たり収量が高い値を示した。両開花盛期とも個体当たり収量と相関の高い形質は1000粒重と成熟まで日数であった。これらのことから最初の開花盛期で多く(全体の80~90%)の花を咲かせ、成熟までの日数が短く、かつ1000粒重の多い品種を開発することを育種目標として挙げる事が出来る。このような品種は、kharif season(7月から10月)にワタ等の間作として栽培し、最初の開花盛期の種子だけを収穫することによって高収量を上げることが出来ると考えられる。

**Breeding Science** 52: 61-63 (2002)

## 近赤外分光データを用いた米食味評価のための統計解析手法の比較

Bo-Jein Kuo<sup>1)</sup>・Kun-Chi Su<sup>1)</sup>・Mei-Chu Hong<sup>2)</sup>・Fu-Sheng Thseng<sup>1)</sup>

(<sup>1)</sup>Agronomy Department, National Chung Hsing University, Taiwan, ROC, <sup>2)</sup>Taichung District Agricultural Improvement Station, Taiwan, ROC)

炊飯溶液のヨード呈色反応度が米食味評価の重要な指標となることが知られているが、一連の分析操作は手間がかかり、材料が限られている場合も使いにくい。一方、近赤外分光法による分析法は、薬品処理が不要で、前処理も簡単であり、測定時間が短く、複数成分を同時に定量できる特長を持っている。そこで本研究では、近赤外分光スペクトルデータを用いて、炊飯溶液のヨード呈色反応度を予測するためのモデルを、PLS (partial least square) 回帰分析、主成分回帰分析、重回帰分析の3

種類を用いて構築し、それらの予測精度ならびに頑健性について比較した。PLS回帰は他の回帰モデルより予測精度がやや劣るが、モデルの安定性は高く頑健性があった。炊飯溶液のヨード呈色反応度予測モデルの予測精度は十分に高いとはいえないが、反応度にめぼしをつけることで食味評価の初期段階への適用が期待される。

**Breeding Science** 52: 65-70 (2002)