

レンゲの2倍体および同質4倍体における葯壁細胞からの カルス形成と植物体の分化

林 喜三郎・中村幸生
(農学部作物・育種学研究室)

Callus Formation from Anther Wall Cells and The Differentiation of Plants from Calluses in Diploid and Autotetraploid Renge, *Astragalus sinicus* L.

Kisaburo HAYASHI and Yukio NAKAMURA
(Laboratory of Crop Science and Plant Breeding, Faculty of Agriculture)

Abstract: In diploid and autotetraploid Renge, calluses were formed from anther wall cells and plants were differentiated from these calluses by means of anther culture. This paper reports the process of callus formation, root and shoot differentiation, the culture condition used to obtain plants and the character of the plants resulting from the anther culture. (1) Anther from the tetrad to uninuclear pollen stage were aseptically explanted on agar slant medium which contained 1×10^{-5} mol of kinetin and 1×10^{-5} mol of naphthalene acetic acid (NAA) in addition to Murashige & Skoog's basal medium. Pale yellowish calluses were readily obtained from anthers about 7 days after explanting. Roots and shoots were differentiated about 40 days after explanting and their process was quite like the seed germination process. (2) The highest degree of callus formation and root differentiation in diploid and autotetraploid plants was induced on a medium containing 1×10^{-5} mol of NAA. The highest degree of shoot differentiation was on a medium containing 1×10^{-7} mol of NAA for diploid and on a medium containing 1×10^{-6} mol of NAA for autotetraploid. (3) Obtaining a large number of plants, it was desirable that calluses be formed immediately on a medium containing 1×10^{-5} mol of NAA, therefore calluses were transplanted on a medium containing 1×10^{-6} mol or 1×10^{-7} mol of NAA to promote root and shoot differentiation and plants were grown vigorously on the hormonefree medium. (4) In order to induce haploid plants of Renge from the anther culture, studies of the basal medium, and the kinds, concentration, and mixtures of growth hormones were needed. (5) A diploid plant ($2n=16$), two tetraploid plants ($2n=32$) and an aneuploid plant ($2n=30$) were obtained from this experiment. It was interesting that the size of guard cells in aneuploid plant resembled these in diploid plant more than these in tetraploid plants. Also, both pollen and seed fertility were a little higher in aneuploid plant and in one of the tetraploid plants than in the colchicine induced tetraploid plants.

緒 言

Guha と Maheshwari^{1,2)}は1966年に *Datura* の葯培養によって、被子植物では始めて半数体の育成に成功した。このような半数体は、染色体の倍加によって容易にホモ化出来、交雑育種の効率向上に役立つ所が大きいため、その後極めて多数の植物で葯培養が試みられた。その結果、現在までに11種の植物で半数体の育成に成功しているが³⁾、マメ科植物の成功例は未だ見当たらない。また同質4倍体では各種の異数性花粉を生じるが、このような花粉より植物体を得ることが出来れば、多数の各種異数体を一挙に得ることが出来、遺伝育種学的研究材料として役立つ所が大きいと思われる。しかし、従来このような試みもなされていない。

以上の現状にもとづき、筆者らはレンゲの2倍体および同質4倍体を用いて葯培養を行って来た。その結果未だ所期の目的を達成するまでに到っていないが、葯壁細胞からのカルス形成および

植物体の分化に成功した。本報告は、それらの結果の概要を述べたものである。

材料および方法

材料にはレンゲの2倍体 (*Astiagalus sinicus* L. $2n=16$) と同質4倍体 ($2n=32$) を供試した。これらの供試系統は、当研究室で岐阜大晩生種より育成され、1956年以後自殖を重ねた固定系統である。培地は、Murashige and Skoog⁴⁾ の基本培地に kinetin 1×10^{-5} モルを添加し、さらに NAA, 2, 4-D および IAA のいずれかを 1×10^{-5} , 10^{-6} および 10^{-7} モル添加したものを試験管による斜面培地とし、各区12本を供試した。培養には、あらかじめ蕾の大きさと花粉ステージの関係を調査した結果にもとづき、四分子期から一核期の花粉を含むと思われる葯を採取して表面殺菌した後、針の先で葯を摘出して、試験管当り約25個ずつ前記培地に置床した。置床後は 25°C 暗黒下に置き、カルス形成後は人工光条件下で培養を続けた。なお、カルス形成率の算出は、置床葯数に対するカルス化葯数の百分率、根および茎葉の形成率は、それぞれを形成した試験管数を供試試験管数に対する百分率で表示した。分化した幼植物は、本葉が3枚展開した後パーミキュライトに移した。

植物体の染色体数の決定は、根端を12時間氷水中で冷蔵した後、塩酸オルセインで染色解離したおしつぶし標本で行なった。

実験結果および考察

(1) カルスおよび幼植物の分化経過

葯よりカルスおよび幼植物を分化する経過は、Fig. 1. および Plate に示す通りである。

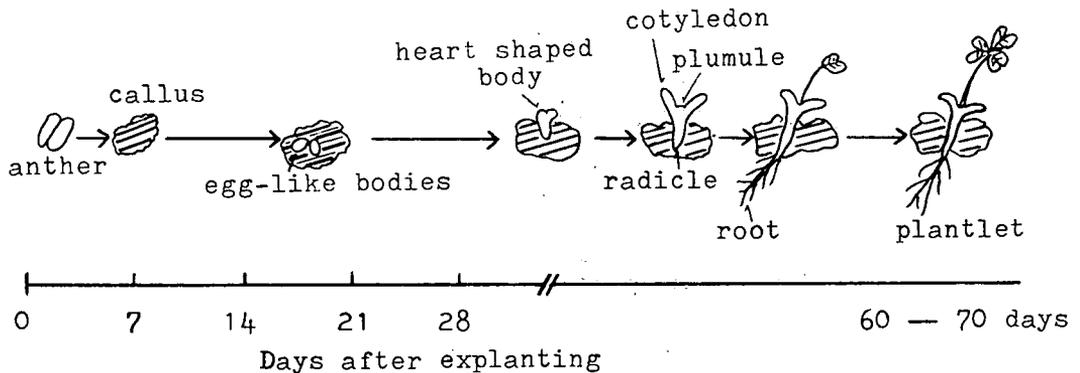


Fig. 1. Days after explanting and callus formation and differentiation of plantlet in NAA plot.

すなわち、NAAを添加した培地では、培養7日後より葯は膨大し、淡黄色のカルスが形成されはじめる。このカルスはその後しだいに大きさを増し、培養21日目にはほぼ1cm大となり、表面には大小多数の突起を形成し、この突起はやがて卵球状となる (Plate 1)。これらの突起は約40日目まで細長いハート状に成長し (Plate 2)、子葉類似の葉および幼根を生じ (Plate 3)、さらに培養60~70日目には第1本葉を形成して完全な幼植物になる (Plate 4)。以上のカルスからの幼植物の分化経過は、種子の発芽経過と非常に類似しているが、その分化の進行ならびに分化後の幼植物の生育は極めて緩慢である。なお、カルス形成直後の葯についてパラフィン切片により組織学的

に観察した結果, Plate 6 に示すように, 形成されたカルスは葯壁細胞に由来しており, したがって分化した植物体も後述のように半数体ではない。また IAA 添加区では, 上記に比べカルス形成は約1週間遅れ, 形成率も低いが, 根や茎葉を分化することができる。一方, 2, 4-D 添加の場合は, カルス形成および卵球状突起形成までは NAA と同様であり, 卵球状突起もクロフィルを形成するまでになるが茎葉までに発達しない (Plate 5)。

(2) カルス, 根および茎葉形成率に対するホルモンの種類と濃度の影響

培養基別および2倍体, 4倍体別に培養30日後のカルス形成率および培養90日後の根および茎葉の形成率を示すと Fig. 2. および Fig. 3. のごとくである。

a) 2倍体; Fig. 2. によるとカルス形成率は, NAA および 2, 4-D とも濃度の増加とともに増加し, 1×10^{-5} モル区では100%近くに達する。しかし, IAA 添加区では, 培養初期に枯死するものが多く, 培養30日目までにはカルスの形成は認められない。ただし, 40日後にはごくわずかの葯でカルスの形成を認めている。Fig. 3. によると, 根の形成には NAA 添加が効果的であり, どの濃度区でも形成率はほぼ100%に達している。つまり, カルスを形成した試験管はほとんど根が分化していることになる。また茎葉の形成は, NAA を添加した全ての区で認められ, その形成率は濃度の低下とともに増加し, 1×10^{-7} モル添加区で最高の75%に達している。また IAA の 1×10^{-6} モル区でも比較的低率ながら茎葉を形成することが出来る。

b) 4倍体; Fig. 2. のカルス形成率は, NAA および 2, 4-D 両添加区とも2倍体と同様に濃度の増すにつれ増加するが, 全般に4倍体の方がやや劣っている。一方, 2倍体でカルス形成のみられない IAA 添加区で, 4倍体では低率ながらカルスを形成したことは, 倍数性による差異として興味ある点である。Fig. 3. の根の形成率は, NAA および 2, 4-D 両添加区では2倍体と大差はないが, IAA 添加区では4倍体が高い。また茎葉形成率は, 2倍体のそれより一般的に低いが, 最高形成率は NAA の 1×10^{-6} モル添加区であり, 2倍体より高濃度が適しているように思われる。また IAA の添加の場合にも高濃度における4倍体の形成率が高い。

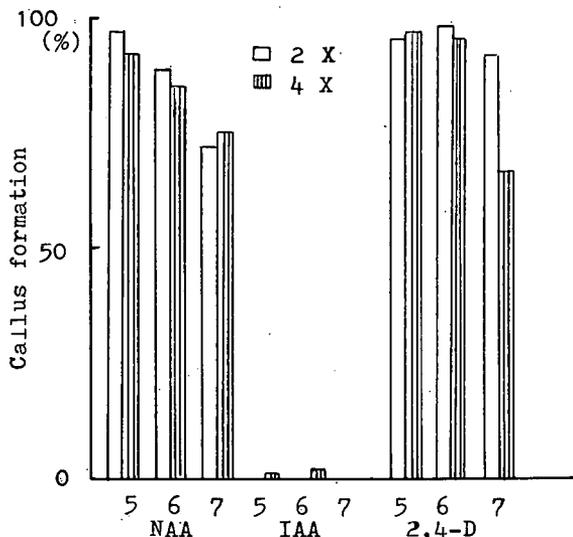


Fig. 2. The effect of growth hormones for callus formation in diploid and autotetraploid Renge (30 days after explanting) 5, 6, 7 show 1×10^{-5} , 1×10^{-6} , 1×10^{-7} mol, respectively. Each medium contains 1×10^{-5} mol of Kinetin.

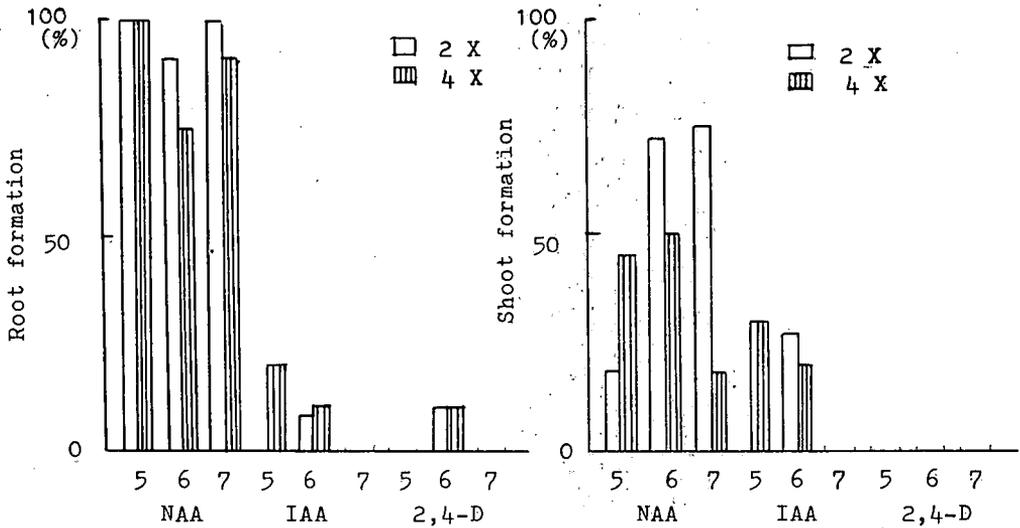


Fig. 3. The effect growth hormones for root formation and shoot formation in diploid and autotetraploid Renge (90 days after explanting) 5, 6, 7 show 1×10^{-5} , 1×10^{-6} , 1×10^{-7} mol, respectively. Each medium contains 1×10^{-5} mol of kinetin.

したがって以上の実験結果より、レンゲでは、2, 4倍体ともカルスの形成および根の分化にはNAAの 1×10^{-5} モルが最適であるが、茎葉の分化には、2倍体では 1×10^{-7} モルが、4倍体では 1×10^{-6} モルが良いように思われる。なお、2および4倍体薬ともNAA添加区では分化した根や茎葉は培地に触れると再びカルス化し、生育が異常となって枯死するものが多く、この傾向はとくに 1×10^{-5} モルで著しい。したがって効率よく植物体を獲得するには、 1×10^{-5} モル培地でカルスを形成させ、カルス形成後は直ちに 1×10^{-6} あるいは 1×10^{-7} モルの培地に移しかえて根および茎葉の分化を促がし、さらに茎葉分化後は、ホルモンを添加しない基本培地に再度移しかえ植物体の発育を促進するのが望ましい。

従来NAAを添加してカルスおよび植物体の分化に成功している例は多くないが、本実験で得られた最適のNAA濃度は、これらの報告とほぼ一致している⁵⁻⁸⁾。一方、現在まで半数体の育成に成功しているイネでは、概して塩類濃度の低いMiller⁹⁾の基本培地であり⁵⁾、同じくタバコでも栄養的に貧弱な培地での培養が望ましいことが指摘されている¹⁰⁾。本実験では塩類濃度が高く栄養的に良い条件で培養を試みたため花粉より薬壁が早く細胞分裂を始め、半数体が得られなかったとも考えられる。しかし、この点について筆者らが別に検討した結果によると、レンゲの薬培養では、薬壁細胞のカルス化は基本培地の種類とは余り関係なく、むしろNAAの添加の有無および濃度の方が密接に関係しており、上記のイネやタバコの場合と必ずしも一致しない。したがってレンゲで花粉起源の植物体を得るには、今後さらに基本培地とホルモンの種類および濃度との関係に重点をおいた検討が必要と思われる。

(3) 分化植物の特徴

上記で得られた幼植物の大多数は、根の先端がカルス化したので鉢植え時にほとんど枯死した。ようやく鉢植えに成功し、順調に発育した4個体について染色体数および特定葉位の葉について孔辺細胞の長径および短径を調査した結果は、Table 1のごとくである。

Table 1. *Chromosome number and size of guard cell of plant induced from anther culture*

NO.	Chromosome number (2n)	Size of guard cell 1)		Material ploidy
		width 2)	length 2)	
1	32	9.64±0.347	8.74±0.763	4 X
2	32	11.51±0.869	7.99±0.460	2 X
3	30	8.13±0.799	6.07±0.707	2 X
4	16	8.04±0.599	5.86±0.600	2 X

1) 50 guard cells were observed.

2) Width and length, respectively ($\times 2.45\mu$)

4倍体葯からは正4倍体(No. 1)が、2倍体葯からは2倍体(No. 4)、正4倍体(No. 2)および4倍体に近い異数体(No. 3)が生じている。このように培養中に染色体数の変異する現象は、すでに多くの研究報告がある¹¹⁻¹⁵⁾。その原因について、Torrey¹¹⁾は、培地に生長ホルモンおよび核酸物質を添加した場合に染色体数が増加することを認めている。一方、Shimada¹³⁾は、タバコの髓組織で培養初期に染色体数が増加するのは柔組織中に種々の染色体数をもつ細胞が含まれていたためとしている。本実験ではこのような検討を行っていないので染色体数の変異の原因については明らかでないが、上記諸研究者の指摘する所と同様の原因によるものと思われる。

つぎに孔辺細胞の大きさは、2倍体(No. 4)では小さく、4倍体(No. 1, 2)は大きくいわゆる4倍体の巨大化現象を示しているが、異数体(No. 3)では、その染色体数が正4倍体(No. 1)に近いにもかかわらず孔辺細胞の大きさは2倍体に類似している点は注目に値する。

つぎに分化した植物の花粉および種子稔性について調査した結果は、Table 2に示すごとくである。

Table 2. *Pollen fertility and seed fertility of plants induced from anther culture*

NO.	Pollen fertility 1)	Seed fertility 2)
1	98.0%	3.01
2	87.8	2.15
3	96.7	6.66
4	87.0	6.60

1) Pollen fertility was shown with number of stainable pollen grains per observed 500 pollen grains.

2) Seed fertility was shown with number of seeds per legume.

同表によると個体による花粉稔性の差異は著しくないが、種子稔性にはかなり差異がみられる。このうち2倍体起源のNo. 2 (4x) およびNo. 4 (2x) は、林¹⁶⁾の報告値にそれぞれほぼ一致し、いわゆる4倍体の低稔化現象が認められる。しかし、4倍体起源のNo. 1 (4x) は同じNo. 2よりかなり高く、またNo. 3 (異数体) は2倍体と同様の高率である。このように一部の4倍体あるいは4倍体に近い異数体が高稔化した点については今後詳細に検討したい。

要 約

レンゲの2倍体および同質4倍体の葯培養を試みた所、葯壁細胞からカルスを形成し、植物体を

分化した。それらの分化経過、培養条件および植物体の特性などについて検討した結果の概要はつぎのとおりである。

(1) Murashige & Skoog の基本培地に kinetin 1×10^{-5} モルおよび NAA 1×10^{-5} モル添加した培地に四分子期から1核期の花粉を含む葯を置床すると、培養7日目よりカルスを、約40日で根および茎葉を分化する。この経過は種子の発芽に類似している。

(2) 2, 4 倍体ともカルスの誘導および根の分化には NAA の 1×10^{-5} モルが最適であるが、茎葉の分化には、2 倍体では 1×10^{-7} モルが、4 倍体では 1×10^{-6} モルが最適と思われる。

(3) 植物体を多数獲得するには、NAA 1×10^{-5} モルでカルスを形成させ、カルス形成後は直ちに 1×10^{-6} あるいは 10^{-7} モルに移しかえて根および茎葉の分化をうながし、さらに茎葉分化後はホルモンを添加しない培地で植物体の発育をはかることが望ましい。

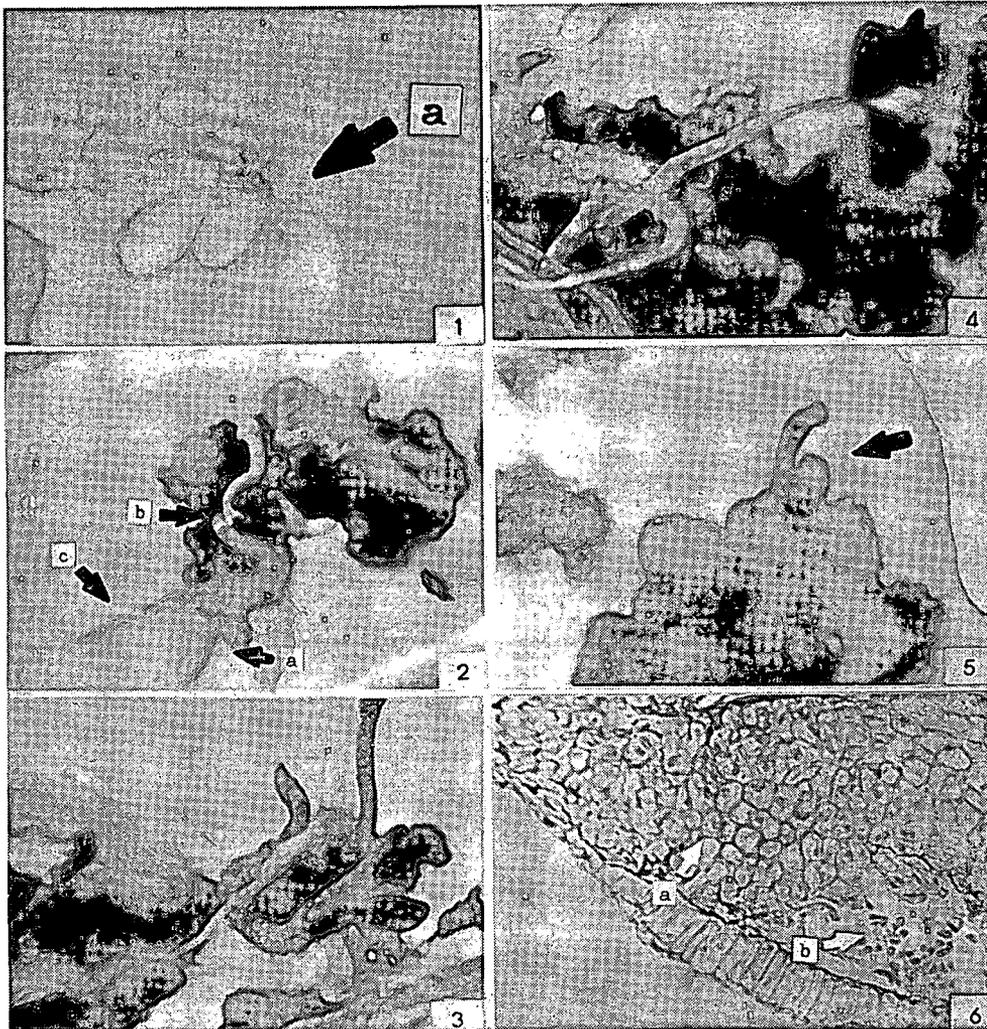
(4) 本実験結果を検討の結果、レンゲにおいて花粉起源植物を得るには、今後基本培地とホルモンの種類および濃度との関係に重点をおいて検討することが重要と考えられる。

(5) 分化植物は2倍体葯より4倍体および4倍体に近い異数体を示すものがあり、しかも異数体の気孔は2倍体に類似して小さいこと、またこれら倍加個体ならびに異数体の中にはいくぶん高稔性の個体がある。

引 用 文 献

- 1) Guha, S. and Maheshwar, S. C., *In vitro* Production of embryos from anthers of *Datura*. *Nature*, 204, 498 (1964)
- 2) ——— and ———, Cell division and differentiation of embryos in the pollen grains of *Datura in vitro*. *Nature*, 212, 97-98 (1966)
- 3) 新関宏夫, 葯培養に関する最近の文献. 育種, 22, 180-183 (1972)
- 4) Murashige, T. and Skoog, L., A revised medium for rapid growth and Bioassays with *Tobacco* tissue culture. *Physiol. Plant.*, 15, 473-497 (1962)
- 5) 新関宏夫・大野清春, 葯培養によるイネ半数体の育成. 農業技術, 23, 327-328 (1968)
- 6) Kameya, T. and Hinata, K., Induction of haploid plants from pollen grains of *Brassica*. *Japan. J. Breeding*, 20, 82-87 (1970)
- 7) Harn, C., Studies on anther culture in *Solanum nigrum*. SABRAO Newsletter, 3, 39-42 (1971)
- 8) ———, Studies on anther culture in *Solanum nigrum*. II Cytological and histological observation. SABRAO Newsletter, 4, 27-31 (1972)
- 9) Miller, C. O., Kinetin-like compound. "Moderne Methoden der Pflanzen-analyse", b, eb. by Linsken, H. F. and Trancy, M. V., p. 194-202 springer-verlag, Berlin. (1963)
- 10) 中田和男・田中正雄, タバコ葯培養における培養基の種類と幼植物の分化. 育種19 (別冊), 97-98 (1969)
- 11) Torrey, J. G., Differential mitotic response of diploid and polyploid nuclei to auxin and kinetin treatment. *Science*, 128, 1148 (1958)
- 12) Nishiyama, I. and Taira, T., The effects of kinetin and indoleacetic acid on callus growth and organ formation in two species of *Nicotiana*. *Japan. J. Genetics*, 41, 357-365 (1966)
- 13) Shimada, T. and Tabata, M., Chromosome numbers in cultured pith tissue of *tobacco*. *Japan. J. Genetics*, 42, 195-201 (1967)
- 14) Tabata, M. Yamamoto, H and Hiraoka, H., Chromosome constitution and nicotin formation of mature plants derived from cultured pith of *tobacco*. *Japan. J. Genetics*, 43, 319-322 (1968)
- 15) Nishi, Y. and Mitsuoka, S., Occurrence of various ploidy plants from anther and ovary culture of rice plant. *Japan. J. Genetics*, 44, 341-346 (1969)
- 16) 林喜三郎, レンゲ4倍体の不稔機構に関する研究 V. 成熟分裂異常と配偶子機能との関係. 高知大学研報. 農学17, 61-67 (1968)

(昭和47年9月27日受理)



Explanation of Plate

1. Anthers 21 days after explanting. Arrow a shows egg-like bodies. 2. Long heart-shaped bodies about 40 days after explanting. Arrow a, b and c show long heart-shaped bodies, cotyledon and root, respectively. 3. Growing cotyledon. 4. Differentiated first leaf about 60—70 days after explanting. 5. Egg-like bodies in 2, 4-D plot. 6. Section of anther about ten days after explanting. Arrow a and b show the proliferating calluses of anther wall and pollen grains, respectively:

