

葯培養による粟半数体の育成

伴 義之・国分 禎二・宮司 佑三

Production of Haploid Plant by Anther-culture of *Setaria italica*

Yoshiyuki BAN, Teiji KOKUBU, and Yuzo MIYAJI
(Laboratory of Plant Breeding)

I. 緒 言

植物の半数体は、その染色体を倍加することにより、すべての遺伝子をホモに有する個体を得ることができる点に、育種的価値があり、さらに、細胞学的ならびに遺伝学的にも重要な意義をもっている⁴⁾。そのため、これまでに半数体的人為的作出法が種々試みられたにもかかわらず、その一般的な人為的作出法は確立されていなかった。したがって、*Datura innoxia*の葯培養によって花粉から半数性植物を育成し得たと云う GUHA & MAHESHWARI の報告は¹⁾²⁾ 効果的な人為的半数体育成法の開発を示唆するものとして、育種研究者から注目されている³⁾。この報告以来、わが国の育種研究者により、各種作物について、葯培養による半数体育成法開発の努力がなされている⁵⁾⁶⁾⁷⁾⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾¹²⁾¹³⁾¹⁴⁾¹⁵⁾¹⁶⁾¹⁷⁾¹⁸⁾¹⁹⁾²⁰⁾²¹⁾。その結果、すでに、タバコとイネにおいて、葯培養による半数体の育成に成功し⁵⁾⁶⁾⁷⁾⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾¹⁷⁾¹⁸⁾²³⁾²⁴⁾ ブロccoliーにおいては莖葉根を有する植物体の育成が報じられている¹⁴⁾。しかし、その他の2~3の作物では葯からのカルス形成が報じられているにすぎず、いまだ、植物体を育成するまでに至っていない。

タバコおよびイネにおける成功例から、葯培養による人為的半数体の育成は、双子葉植物のみならず、単子葉植物を含むあらゆる作物において可能であろうと考えられる。しかし、これまでに明らかにされたところによると、葯培養における培養条件にはなお検討の余地があり、とくに、培養基の組成は供試材料により多少変更を必要とするのではないかと考えられる。

以上の如き観点と研究の現状から、筆者らは、これまでに実験材料として用いてきた粟において、葯培養による半数体育成法を確立しておくため、実験を試み、葯培養によって、カルスの形成、さらに葉茎根を有する半数性の植物体を育成することができたので、ここにその概要を報告する次第である。

II. 実験材料および方法

供試品種は早生品種の黄粟で、出穂直前の穂を切りとり、これを95%アルコールで、2~3秒、次に10%次亜塩素酸ソーダで10分間殺菌し、無菌水で洗った後、事前の調査で四分子期~一核期の花粉を含むと考えられる葯を小穂から取り出し、1小穂から取った2~3個の葯を1個の試験管培地に置床した。葯培養に用いた基本培養基は、Millerの基本培養基から生長調節物質を除き、これに yeast extract 3000 mg/l を加えたもので、その成分は第1表に示すとおりである。

葯からのカルス形成およびカルスから葉根の分化を起こさせるためには、この基本培養基に、2, 4-D, IAA, および kinetin を種々の濃度で添加した培地を用いた。

葯の培養は28°Cの暗黒でおこない、カルスから葉が分化した後は、20 W 蛍光灯照明下、25°Cで培養を続けた。幼植物が十分に生長した後、植物体を寒天無菌培地から取り出し、根部に附着している培養基をよく水洗した後、鉢植とした。鉢に移植後、不定根によって、染色体を観察し、出穂後、花粉および種子稔性を観察した。

III. 実験結果

1) カルスの形成 葯の置床は第1表の基本培養基に、2, 4-D, IAA および kinetin を種々の濃度(0~2 mg/l)で添加した培地でおこなった。これらの培地の中で、カルスの形成が認められたのは、2, 4-D 1 mg/l, IAA 1 mg/l および kinetin 1 mg/l 添加培地と 2, 4-D 1 mg/l, kinetin 2 mg/l 添加培地であって、形成されたカルスの数は、それぞれ、2個であった。したがって、合計4個のカルスが得られた。しかし、雑菌の侵入と植つぎの失敗のため、後に、完全植物体までに育成できたカルスは、2, 4-D

1 mg/l, kinetin 2 mg/l, 添加培地で得られた2個のカルスの中の1個のカルスのみである。

カルスの形成が外観的に認められたのは、藪を培地に置床してから、3～4週間後であって、この時期に、黒変した藪の内部から、淡白色のカルスが隆起してくるのが肉眼で観察された。

2) カルスからの葉根の分化 2, 4-D 1 mg/l, IAA 1 mg/l, kinetin 1 mg/l 添加培地で得られた2個のカルスの中の1個は、後に雑菌の侵入により増殖不能となった。また、他の1個のカルスは、このカルスから、葉茎の分化を計るため、これを分割して、2, 4-D を除き、IAA 2 mg/l, と kinetin を 2, 3, 4 mg/l 添加した培地に置床した。その結果、このいずれの培地においても、移植されたカルスは、僅かに増殖の気配を示した後、増殖を停止して枯死した。

そこで、この失敗例に基づき、まず、カルスを更に増殖させる目的で、2, 4-D 1 mg/l, kinetin 2 mg/l 添加培地に形成された培養約2カ月後のカルス2個のうち、増殖良好な方の1個のカルスを分割して、2, 4-D 1 mg/l, と IAA 0, 1, 2 mg/l, ならびに kinetin 0, 1, 2 mg/l とを添加した培地に置床した。この時期の分割前のカルスは、部分的に突起や細根らしきものの発生など、多少の分化様相が観察された。

上記の培地に置床1カ月後に、ただ1個のカルスに葉の分化が認められた。しかし、その他のカルスは、単に増殖を示すのみで、一部に細根らしき分化が認められたが、葉の分化は全く認められなかった。

さきに、葉を分化したカルスは、蛍光灯照明下で培養を続けたが、葉は発育は良好であったが、根の発育は不良であった。そこで、約2カ月間培養後、叢生した株を分割して、2, 4-D を除き、IAA 2 mg/l と kinetin 2, 3, 4 mg/l とを添加した培地に移植した。この分割した株はその後生長を続けたが、根の発育がなお不良なため、IAA 2 mg/l と kinetin 0.1, 0.05,

0.002 mg/l 添加した kinetin 微量培地に移植した結果、kinetin の量が微量なほど、根の発育が良好となった。

一方、前述の 2, 4-D 1 mg/l と IAA 0, 1, 2 mg/l ならびに kinetin 0, 1, 2 mg/l とを添加した培地で葉を分化しないカルスも、2, 4-D を除き、IAA 2 mg/l と kinetin 2, 3, 4 mg/l とを添加した培地に移した結果、葉を分化し、これらは、さらに IAA 2 mg/l と kinetin 0.1, 0.05, 0.002 mg/l 添加した kinetin 微量培地に移植した結果、根の発育が良好となった。

さらに、2, 4-D 1 mg/l と IAA 0, 1, 2 mg/l ならびに kinetin 0, 1, 2 mg/l とを添加した培地で葉を分化しない残余のカルスを、直接、前述の kinetin 微量培地に移植した結果、カルスは葉を分化せず、根のみを分化した。

なお、上記の結果を追試するため、さきに、2, 4-D 1 mg/l と kinetin 2 mg/l とを添加した藪置床培地で形成された残余の1個のカルスを用いて、前述の場合同様、まず、このカルスの増殖を計るため、2, 4-D 1 mg/l と IAA 0, 1, 2 mg/l, ならびに kinetin 0, 1, 2 mg/l とを添加した培地に移植したが、カルスの増殖に失敗した。

3) 染色体数、花粉および種子稔性 無菌培養で葉根が充分に発達した個体は、オートクレーブで土壤消毒した鉢に移植した。その後、活着をまって、発根した不定根によって、染色体数を観察した結果、半数性個体と2倍性個体が認められた。出穂をまって、花粉稔性および種子稔性を観察した結果、根端細胞の染色体数が2倍性の個体はすべて、花粉稔性と種子稔性が良好であったが、半数性の個体は花粉稔性および種子稔性が良好なものと、極めて不良なものとは観察された。

根端細胞で半数性を示し、花粉稔性も極不良な個体は2倍体に比較して早生で草丈が極めて小であった。

Table 1. Miller's basic nutrient medium constitution

KH_2PO_4	300 mg/l	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	4.4 mg/l
KNO_3	1,000	glycine	2.0
NH_4NO_3	1,000	thiamine HCl	0.1
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	347	nicotinic acid	0.5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	35	pyridoxin HCl	0.1
KCl	65	Na-Fe-EDTA	32
KI	0.8	sucrose	30,000
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.5	agar	10,000
H_3BO_3	1.6	PH	6.0

現在までに得られた葉根を有する完全個体 15 個体の中で、3 個体はアルビノで枯死し、1 個体は葉身に縞状のアルビノが認められた。

IV. 考 察

カルスの誘導は auxin によってひきおこされ、2, 4-D, NAA, IAA の順でカルスを形成し易いと考えられている。カルスを誘導する auxin 濃度は、植物の種類、部位によって異なっているが、一般に単子葉植物は双子葉植物に比較して高い auxin 濃度を必要とする²²⁾。

これまでに薬培養に供用され、カルス形成が認められた auxin 濃度は 2, 4-D 1~4 mg/l, IAA 1~2 mg/l が多い。

粟と同じ禾本科のイネで新関らは、IAA 1~2 mg/l, kinetin 1~2 mg/l, 2, 4-D 1~2 mg/l でカルスを得ている²³⁾。本実験では、カルス形成数が少ないので、いずれの培地がカルス形成に適當であるか判断することはできない。

カルスを形成し易い花粉の発育段階としてタバコの実験例から 4 分子期~1 核期を選定したが、粟の薬は極めて小さいので、外観から発育段階を推定する場合、正確さを欠き、これが、カルス形成率の低い一因と考えられる。

カルスからの葉根の分化に関して、Skoog などは、タバコの髓組織に由来するカルスを用いて、一定濃度の IAA (2 mg/l) と特定濃度の kinetin (0.02, 0.2, 0.5, 2.0 mg/l) との組合せにより、それぞれ、根 (kinetin 0.02 mg/l+IAA 2 mg/l), カルス (kinetin 0.2 mg/l+IAA 2 mg/l), 茎葉 (kinetin 0.5 mg/l+IAA 2 mg/l), カルス (kinetin 2.0 mg/l+IAA 2 mg/l) を分化せしめ得ることを明らかにし²⁵⁾、新関らもイネの薬培養によって得られたカルスが、IAA 2 mg/l と kinetin 2~4 mg/l とを加えた培地で葉根を分化したことを認めている¹⁷⁾。本実験の結果も、上記の Skoog らおよび新関らの結果とほぼ一致し、IAA 2 mg/l と比較的高濃度の kinetin (2~4 mg/l) を加えた培地では茎葉が分化し、IAA 2 mg/l と低濃度の kinetin (0.01~0.1 mg/l) とを加えた培地では根が分化した。

薬からカルスが形成される過程に関する観察を欠いてはいるが、根端細胞による染色体の観察の結果、半数性個体が観察されたので、薬培養によって得られたカルスは花粉に由来するものと考えられる。

なお、根端細胞の染色体数では半数性を示しなが

ら、花粉稔性および種子稔性が極めて良好で、2 倍体の生殖細胞としての様相を示す個体が認められたが、新関らもこのような事実を指摘している²³⁾。

V. 摘 要

(1) 粟の薬培養によって、カルスを形成せしめ、さらに、カルスから完全な葉・茎・根を有する植物体を育成した。

(2) 根端細胞によって染色体を観察した結果、育成した植物体には、半数体と 2 倍体とが認められた。

(3) 根端細胞で 2 倍性の染色体数 (2n=18) を示した個体は花粉稔性および種子稔性ともに良好であった。一方、根端細胞で半数性の染色体数 (2n=9) を示した個体には、花粉稔性および種子稔性がともに良好なものと、ともに極不良なものとは認められた。

(4) 根端細胞で半数性を示し、花粉稔性および種子稔性ともに極不良な個体は花粉を採取した対照品種および花粉から育成された 2 倍体に比し、早生で草勢は矮小であった。

文 献

- 1) GUHA, SIPRA and MAHESHWARI, S. C. : *Nature*. **204**: 497 (1964).
- 2) GUHA, SIPRA and MAHESHWARI, S. C. : *Nature*. **212**: 97-98 (1966).
- 3) 村上寛一：農及円. **42**(6): 971-972 (1967).
- 4) 片山義勇・根井正利：富崎大農育種 (1964).
- 5) 中田和男・田中正雄：農及円. **43**(4) (1968).
- 6) 中田和男・田中正雄：Jap. J. Genetics. **43** (1): 65-71 (1968).
- 7) 中田和男・田中正雄：育種学最近の進歩 9 集, 23-32 (1968).
- 8) 中田和男・田中正雄：育種学雑誌. **19**(別冊 1) (1969).
- 9) 中田和男・田中正雄：育種学雑誌. **19**(別冊 2) (1969).
- 10) 中田和男・田中正雄：育種学雑誌. **18**(別冊 1) (1968).
- 11) 西貢夫・大沢勝次・豊田 努：育種学雑誌. **20** (別冊 1) (1970).
- 12) 亀谷寿昭：育種学雑誌. **17** (別冊 2) (1967).
- 13) 亀谷寿昭日向康吉：育種学雑誌. **19** (別冊 1) (1969).
- 14) 勝尾 清：育種学雑誌. **19** (別冊 1) (1969).
- 15) 岡野信雄・淵之上康元：育種学雑誌. **19** (別冊 1) (1969).
- 16) 岡野信雄・淵之上康元：育種学雑誌. **20** (別冊 1) (1970).
- 17) 新関宏夫・大野清春：育種学雑誌. **18** (別冊 1) (1968).

- 18) 新関宏夫・大野清春：育種学雑誌. **18**(別冊 2)(1968).
 19) 角谷直人：育種学雑誌. **19**(別冊 1)(1969).
 20) 角谷直人・久保友明：育種学雑誌. **19**(別冊 2)(1969).
 21) 波止博明・小林仁：育種学雑誌. **20**(別冊 1)(1970).
 22) 山田康之：育種学雑誌. **19**(別冊 2)(1969).
 23) 新関宏夫, 大野清春：育種学雑誌. **20**(別冊 1)(1970).
 24) 中田和男・田中正雄：育種学雑誌. **20**(別冊 1)(1970).
 25) LINSMAIER, E. M. and F. SKOOG: *Physiol. plant.* **18**: 110-127 (1965).

Résumé

- 1) By the anther-culture of *Setaria italica*, the authors obtained the callus of pollen; and from the callus the entire plant with shoot and root was differentiated.
- 2) According to the observation of chromosome-number at the root tips, it was confirmed that there were haploid- and diploid- plants in those obtained by anther-culture.
- 3) The plants having diploid chromosome number at the root tips, were ascertained to be very rich in fertility of pollen and seed. But, there were two types in the plants having haploid number of chromosome at the root tips. One was rich in fertility of pollen and seed, the other was poor in fertility of pollen and seed.
- 4) The plants having haploid number of chromosome at the root tips and not rich in fertility of pollen and seed were smaller in size, and earlier in heading, than the original variety-plant and the diploid plant obtained by anther-culture.

Explanation of figures

- Fig. 1 Callus proliferation obtained by anther-culture.
 Fig. 2 Shoot differentiation from callus.
 Fig. 3 Root differentiation from callus.
 Fig. 4 Diploid plant and haploid plant obtained by anther-culture.
 Fig. 5 Haploid chromosome number ($2n=9$) in a root-tip cell of a plant by anther-culture.
 Fig. 6 Diploid chromosome number ($2n=18$) in a root-tip cell of a plant by anther-culture.

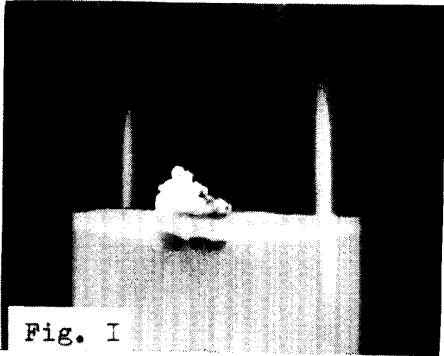


Fig. 1

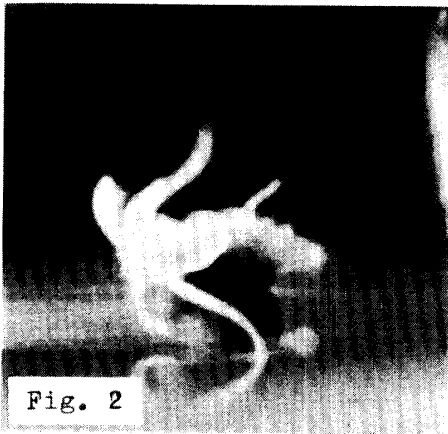


Fig. 2

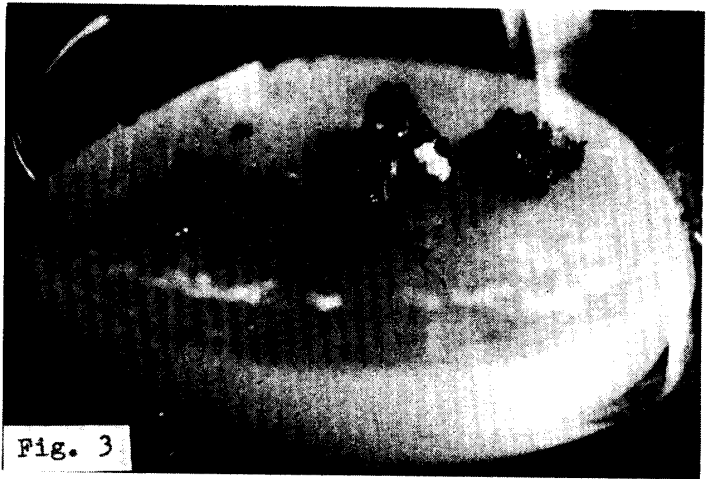


Fig. 3

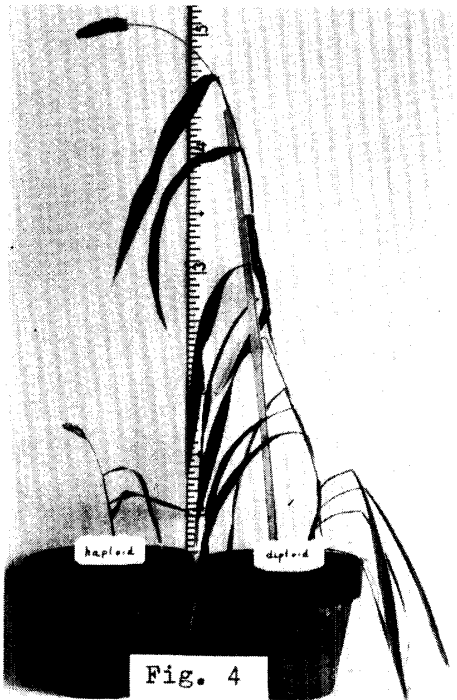


Fig. 4

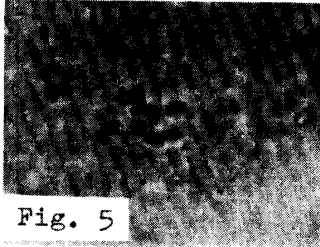


Fig. 5

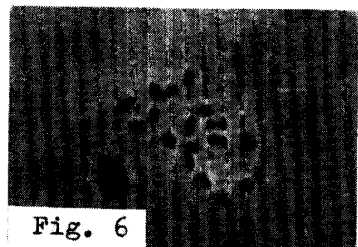


Fig. 6