

キュウリの接合子・初期球状胚から胎座切片培養により 誘導した植物の花粉の異常

藤下 典之・斎藤 清子¹⁾

大阪府立大学農学部 〒591 大阪府堺市百舌鳥梅町4丁804

Abnormality of Pollen Grains on Cucumber Plants Induced from Zygotes and Early-globular Embryos through the Placental Region Disk Culture

Noriyuki FUJISHITA and Kiyoko SAITO

College of Agriculture, University of Osaka Prefecture, Sakai, Osaka, 591

(1990年5月8日受理)

Stainability, germination capacity and germinal pore number of pollen grains were investigated in order to estimate fertility and ploidy level on cucumber plants induced from zygotes and early-globular embryos through the Placental Region Disk Culture. Undehisced anthers without pollen were recognized on flower blooming in culture tube and vessel. Abnormal pollen grains, such as pollen stained partially with shrivelled cytoplasm, pollen unstained without cytoplasmic contents and pollen retained starch at anthesis occurred frequently periods of culture in test-tube, acclimation in vessel and early cultivation in greenhouse. On four within 23 induced plants, the pollen fertility as measured by percentage of pollen grains stained densely by acetocarmine was as low as 34-61% throughout the whole flowering periods. On the other plants, it was more than 90% for the period of cultivation in greenhouse. The normal diploid cucumbers produce exclusively three germinal pores pollen. Abnormal one-and two-germinal pores pollens, however, were recognized temporarily at early flowering time. One induced plant showed a relatively high percentage (15%) of four-germinal pores pollen and ploidy level of the plant proved to be tetraploid. Other plants were diploid regardless of level of pollen fertility. The average of pollen grain diameter of induced diploid and tetraploid plants was 66 and 85 μm respectively, and no overlap of distribution of diameter was recognized between both ploidy levels. Small pollen grains stained partially contained starch at anthesis regardless of ploidy level. On plants showing low pollen fertility, only normal pollen grains stained densely germinated and those pollen tubes elongated well *in vitro*, and no germination of pollen grains stained partially was observed. Seed fertility as measured by percentage of full seed per fruit showed a relatively lower than that of plants showing high pollen fertility. Tetraploid plants selfed and crossed with diploid plants were extremely sterile. The reduced seed yields of plants showing low pollen fertility appeared to

be due to also reduced number of functional female gametes. On the next generation of self-pollination on one induced plant showing the lowest pollen fertility (34%), population produced 7 high pollen fertile (above 90%) : 4 low pollen fertile (39-62%) plants.

Abnormalities on pollen grains of the induced plants may be caused by physiological and genetical variability as a results of culture stress.

Key words : Pollen stainability, Low pollen fertility, Germinal pore number, Diploid pollen, Genetical sterility.

緒 言

Cucumis 属植物の種間や異なった倍数性間の交雑では、しばしば胚の早期退化や発育停止がみられるので、これを回避するための培養系の確立を目指して研究を続けている。その第一段階として、交雑和合な品種間交配による受精直後の胚からの植物誘導を、胎座切片培養の手法で試み、キュウリ⁽¹⁾とメロン⁽²⁾で成功し、目下同属の野生植物でも成果が上がりつつある。一方、各種培養系を通して、誘導された植物には変異が出易いと言われるが、培養という特殊環境のストレスによって、誘導植物の有用形質や稔性に異常が起きていては真の意味の成功とは言えない。花粉はその形成過程において、他の器官や組織に比べ、環境の影響を受け易い⁽³⁾ので、異常の起きていることが充分予想される。しかし、培養で誘導された植物やその後代の花粉を調査した研究⁽⁴⁾はわずかしかない。種子や果実を利用する作物、あるいは有性繁殖を通して栽培される植物では、種子稔性に影響を与える花粉稔性の低下を見落としてはなるまい。キュウリやメロンなどの *Cucumis* 属植物では、培養による誘導植物をはじめ普通の温室栽培植物に、自然発生的な4倍体がかかなり頻繁に出現している。4倍体植物の花粉は大型化し、2倍体植物の花粉の発芽孔数が3個であるにもかかわらず、それが4個に増加したものがかなりの頻度で混在しているのが常である。

ここでは、胎座切片培養により接合子・初期球状胚

から誘導されたキュウリについて、生殖能力と倍数性を推定するために、それらの花粉を観察したところ、種々の異常が認められたので報告する。なお、本論文の一部は1988年度の日本花粉学会大会で発表した。

材料及び方法

キュウリの受粉後2-6日目の接合子・初期球状胚から胎座切片培養により誘導された23個体について、試験管または順化容器内での培養・順化時から、果実収穫までの期間中に咲いた花ごとに、600粒内外の花粉を開花当日の午前中に検鏡した。aceto-carmines で染色し、発芽孔数とは無関係に花粉の細胞質が均質に濃染したものを充実花粉、細胞質が充満せず不均質に染色したものを充実不全花粉、細胞質が欠如し全く染色しなかったものを空虚花粉とした。また、一部の花粉については発芽孔数と直径も調査した。花粉稔性は花ごとに検鏡花粉総数に対する充実花粉数の百分率で示した。花粉粒内のデンプンの検出はヨード・ヨードカリ染色によった。花粉の発芽実験は矢野ら⁽⁵⁾によるウリ科植物の花粉管伸長培地を用いた。その処方はいすくろす 80 g/l, ホウ酸 100 mg/l, gelrite 2 g/l, Ca(NO₃)₂ 4 H₂O 600 mg/l, pH 7.3 である。開花当日の午前中に花粉を置床した後、10分おきに1時間後まで、一部は8時間後に cotton blue で染色して、発芽の様相を観察した。

実験結果

1. 充実不全及び空虚花粉

¹⁾現所属：住友化学工業宝塚総合研究所

〒665 宝塚市高司4丁目2-1

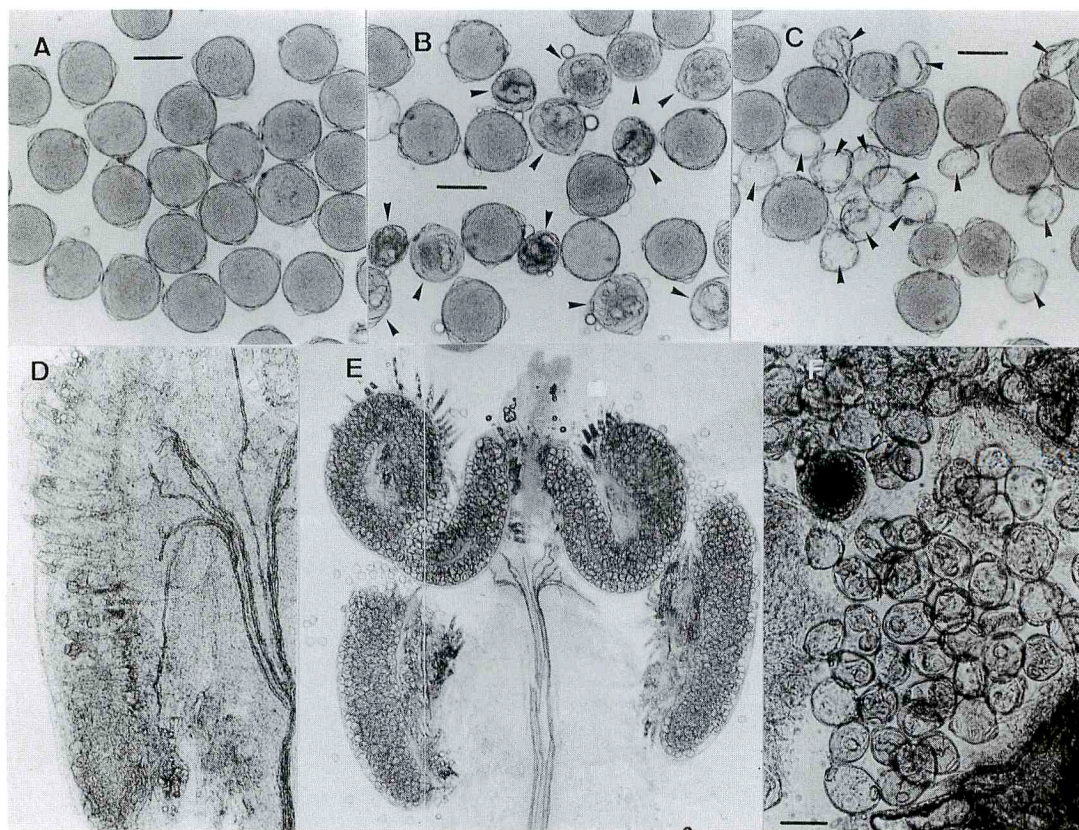


Fig. 1. Pollen grains and anthers of plants induced through the Placental Region Disk Culture. A : Normal pollen grains stained densely (87 OC-1). B : Abnormal pollen grains stained partially with shrivelled cytoplasm (arrow, 87 OC-3). C : Abnormal pollens unstained without cytoplasmic contents (arrow, 87 OC-2). D : Anther without pollen. E : Anther contained unstained pollen grains only. F : Anther contained one stained and many unstained pollens. A-C : Pollen grains of plants flowering in greenhouse. D-F : Anthers of plantlets flowering in test-tube and acclimating bottle. Bar=50 μ m

キュウリの正常花粉は3発芽孔を持ち、その細胞質はaceto-carminで均質に濃染され (Fig. 1-A)、異常花粉は①正常花粉に比べて小型で染色の不均質な充実不全花粉 (Fig. 1-B) と、②全く染色されない大きさは様々な空虚花粉 (Fig. 1-C) に大別された。遺伝的に異常のないキュウリを好適な条件で栽培した場合、このような異常花粉は数% - 10数%しか出現しない。しかし、今回の培養で誘導したキュウリでは、培養試験管や順化容器内で開いた花、あるいは定植直後に開

いた花 (Fig. 2) に、このような異常花粉の認められるものがあり、一部の個体ではその現象が採種用の成熟果の収穫期まで連続して認められた。培養試験管や順化容器内で開いた花には、開葯不能で葯を押しつぶして観察しても、葯壁のみで内容のないもの (Fig. 1-D)、葯室に空虚花粉のみがたまっているもの (Fig. 1-E)、ごくまれに充実花粉の混在するもの (Fig. 1-F) などがあった。花粉稔性の推移を順化過程から果実の収穫期までの期間、個々の誘導植物につ

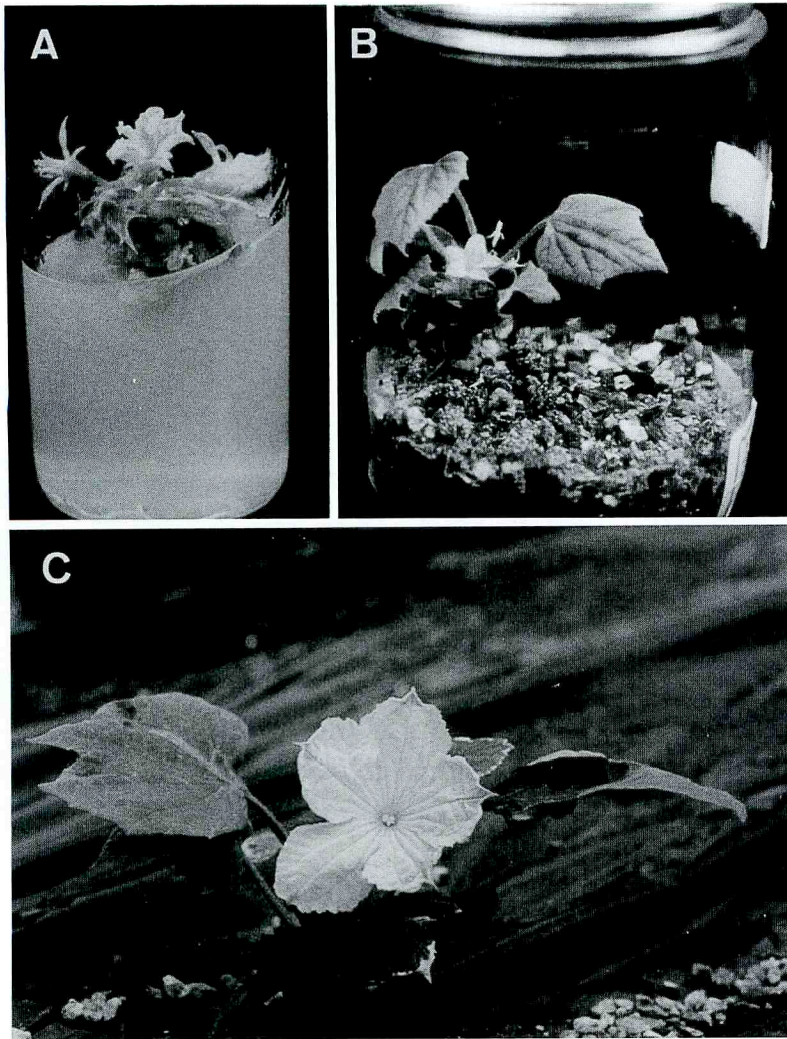


Fig. 2. Flowering at periods of culture in test-tube, acclimation in bottle and transplanting in greenhouse. Photographs taken at 236 (A. 87 OC-13), 194 (B. 87 OC-19) and 213 (C. 87 OC-9) days after inoculation. Figures in the parentheses indicate individual No. of induced plants.

いて追跡した。花粉稔性が終始 80% 以上と高かった稔性正常型が 16 個体，順化中から定植直後にかけて低かった稔性が，その後向上した稔性向上型が 3 個体，初期の花から最後の花まで終始稔性が 30-60% と低かった稔性異常型が 4 個体あった。異常型内の 1 個体は次の項で述べる 4 発芽孔花粉を多数含んでいた。稔性異常型の中にも，空虚花粉の多い個体 (87 OC-2, 87 OC-21)，充実不全花粉の多い個体 (87 OC-3)，それらと正常花粉とがそれぞれほぼ同率の 30%

前後ずつ混在している個体 (87 OC-8) があった (Table 1)。稔性向上型 87 OC-13，稔性異常型 87 OC-8，および 4 発芽孔花粉の多い 4 倍体 87 OC-21 のそれぞれについて，花粉稔性の推移を Fig. 3 に示した。雄性不稔性のメロンや 3 倍体のスイカ，あるいはトウガラシやナスの低温障害で見られる 4 分子花粉 (多集粒花粉) は認められなかった。

2. 4 発芽孔花粉

普通の 2 倍体のキュウリを好適条件下で栽培した場

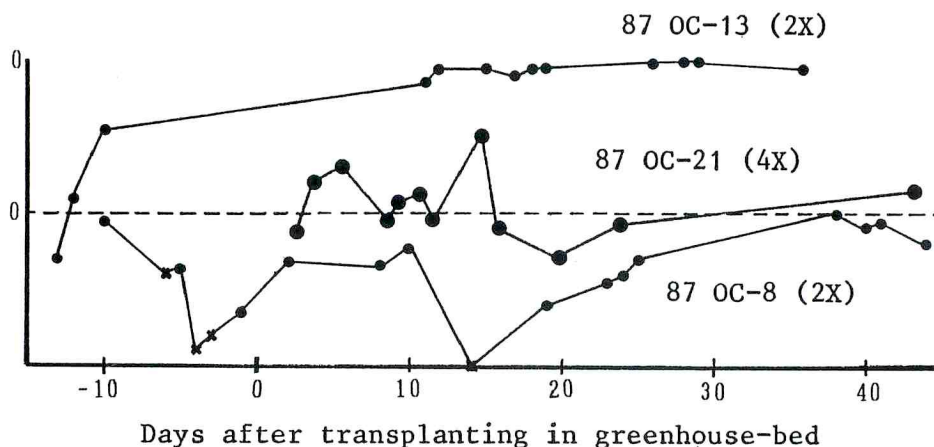


Fig. 3. Variations of pollen fertility of induced plants. Investigation of pollen was continued during culture in test-tube to harvest season of fruit. ×: undehisced anther

合、3発芽孔花粉が99%以上を占め、4発芽孔花粉の確認は極めてむずかしい。しかし、これが3、4倍体になると4発芽孔花粉 (Fig. 4-B) が増え、花粉自体も大型になる。今回の誘導植物の1個体 87 OC-21 では、4発芽孔花粉が終始15%程度 (Table 1)、さらに5発芽孔花粉も僅かであったが認められ、その花粉稔性は平均55%で、充実不全花粉を4%、空虚花粉を41%含んでいた (Table 1)。この個体の根端細胞の染色体数は28で、予想どおりの4倍体であった。稔性異常型個体内、他の3個体は花粉母細胞で7の2価染色体が、根端細胞で14の染色体がみられ、2倍体であることが確認できた。4倍体の87 OC-21と稔性正常型2倍体87 OC-20の3発芽孔花粉の直径について、それぞれ100粒を計測し比較した (Fig. 5)。2倍体植物の花粉の直径が平均66 μm であったのに対し、4倍体植物のそれは平均85 μm で、しかも最小と最大花粉は70–96 μm を示すように、大きさがかなり不揃いであった。4倍体の4発芽孔花粉の直径は93.3 μm あった。倍数性の中で花粉の大きさは重ならなかった (Fig. 5)。

3. 1・2発芽孔花粉

稔性向上型個体では、順化中から定植直後にかけて

開花した花の花粉の中に、発芽孔数が通常の3個より少ない1または2発芽孔花粉 (Fig. 4-C, D) が認められた (Table 2)。しかし、その出現は87 OC-13で見ると、定植日 (11月29日) 前後の11月19日–12月10日の間で、やがで正常な3発芽孔花粉のみとなった。発芽孔数は、スライドガラスとカバーガラスの間で花粉の向きやフォーカスの関係で、3個の内の1・2個を見落とす心配があるので、同一花の中で細胞質が全く染まらず、透視のきく空虚花粉 (Fig. 4-D) についても発芽孔数を調べた。その結果、1・2発芽孔花粉の比率は、充実花粉でも空虚花粉でも変わりなく15%程度で (Table 2)、花粉の大小とも無関係であった。

4. デンプン残存花粉

キュウリでは花粉の発育過程の内、蕾の花弁が黄色を帯び始めた長さ1.1mm、幅0.3mm大 (品種によって大きさは異なる) の、開花3日前ごろ、花粉粒内にデンプンが散在する。しかし、それも程なく糖化し、開花当日の花粉ではデンプンは全く検出されなくなる。しかし、稔性異常型個体では、開花当日の正常よりやや小型の花粉に、デンプン粒が残存していた (Fig. 6, Table 3)。

5. 花粉の発芽能力

花粉稔性が終始 50% 程度を示した稔性異常型個体 87 OC-3 の花粉の発芽試験を行ったところ、充実花粉はよく発芽したが (Fig. 7), やや小型の充実不全花粉は全く発芽しなかった。花粉発芽率を置床 40 分後の [発芽数 / (置床花粉数 - 空虚花粉数)] × 100 (%) で示すと、平均 43.1% となった。置床 8 時間後の花粉管長は 2-3 mm に達していた (Fig. 7)。4 発芽孔花粉では、しばしば 2 または 3 の発芽孔から同時に花粉管の出てくるのが認められた。1・2 発芽孔花粉の発芽能力は調査していない。

6. 花粉稔性と種子稔性

個々の誘導植物の自家受粉した果実について、種子稔性 [充実種子数 / (充実種子数 + しない数)] × 100 (%) を算出した。花粉稔性と種子稔性との関係を見たのが Fig. 8 である。稔性正常型個体で自家受粉した果実の種子稔性が 82.4% - 95.4% (平均 89.8%) であったのに対し、稔性異常型個体 87 OC-2, 87 OC-3, 87 OC-8 のそれはそれぞれ 51.2, 81.6, 53.9% で、花粉稔性異常型個体は種子稔性 (卵の機能) も低い傾向が見られた。4 倍体の 87 OC-21 の自家受粉した果実の種子稔性は 27.3% と非常に低く、稔性正常型 2 倍体と正逆交配をした場合、ともに発芽力のある充実種子は 1 粒も得られなかった。

7. 稔性異常型個体の自殖翌代の稔性

稔性異常が単なる培養という特殊な異常環境のストレスによる生理的な一過性のものであるのか、あるいは、ストレスによって生じた遺伝的変異によるものであるのか、それを確かめる必要がある。そこで 2 倍体のうち花粉稔性が平均で 33.5% と最も低かった 87 OC-8 (Table 1) の自殖 (自家受粉) 翌代の 11 個体について、花粉稔性を調査した。その結果、花粉稔性が 90% 以上の稔性正常型が 7 個体と、39-62% の異常型 4 個体が分離して出現した (Table 4)。翌代植物の内、稔性正常型では空虚花粉がわずか 2-7% 程度しかなかったのに対し、稔性異常型の 4 個体ではそれが 27-35% も認められた。翌代植物の内、稔性が 39% と最も低かった個体 No. 8 では、27% の空虚花粉のほかに充実不全花粉が 34% も見られた。

考 察

今回の胎座切片培養によって受精直後の接合子や初期球状胚から植物が誘導できたのを機会に、培養中から果実収穫までの期間中に開いた花について、培養ストレスの影響を見るため花粉の稔性を調査した。

花粉の稔性 (機能) を aceto-carmin に対する染色反応を主な指標にして調べ、発芽孔数やデンプン粒の残存程度も観察し、合わせて発芽試験も行った。そ

Table 1. Pollen fertility (stainability) of plants induced through the Placental Region Disk Culture

No. of individual	Ploidy level	Flowering time of the 1st flower ^{a)}	No. of		Percentage of pollen grain			Total No. of four pores pollen, (%)	Pollen fertility
			flower investigated	pollen investigated	stained densely ^{b)}	stained partially	unstained		
87 OC - 1	2	145	15	9109	93.1	1.3	5.6	10(0.1)	normal
87 OC - 12	2	185	17	11185	92.3	3.2	4.5	3(0.0)	normal
87 OC - 20	2	274	19	12881	97.8	0.2	2.0	1(0.0)	normal
87 OC - 22	2	244	16	9867	93.8	1.0	5.2	45(0.4)	normal
87 OC - 2	2	160	23	14861	60.7	6.5	32.8	18(0.4)	abnormal
87 OC - 3	2	167	20	13392	52.8	35.1	12.1	6(0.0)	abnormal
87 OC - 8	2	164	25	15971	33.5	36.9	29.6	6(0.0)	abnormal
87 OC - 21	4	270	22	15678	55.4	4.1	40.5	2164(15.0)	abnormal

These typical eight plants were extracted from twenty-two induced plants.

a) : Days after inoculation

b) : Pollen fertility

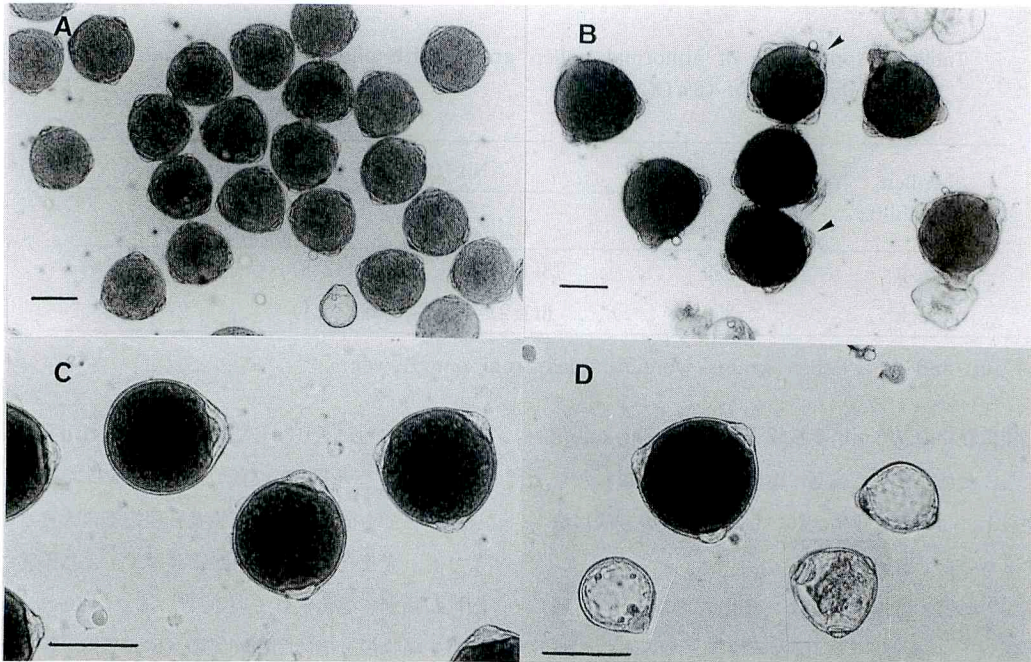


Fig. 4. Pollen grains with abnormal germinal pore number on induced plants. A : Normal three pores of diploid plant (87 OC-1). B : Four pores (arrow) of spontaneous tetraploid plant (87 OC-21). C, D : One or two pores pollens on stained and unstained pollens of diploid plant (87 OC-13). Bar = 50 μ m

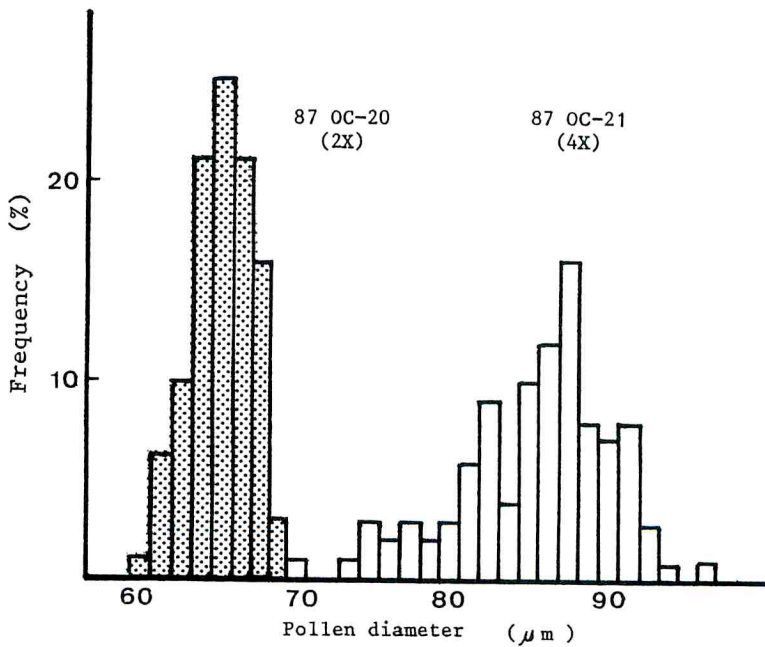


Fig. 5. Frequency distribution of diameter of three pores pollens of diploid (87 OC-20) and tetraploid (87 OC-21) plant. Averages of pollen diameter were 66 and 85 μ m respectively.

Table 2. Appearance of abnormal pollen grains with one or two germinal pore of induced plant (87 OC-13)

Pollen stainability	No. of pollen grains investigated	No. (%) of germinal pore		
		1	2	3 normal
Density ^{a)}	695	13(1.9)	89(12.8)	593(85.3)
Lack ^{b)}	330	6(1.9)	50(15.1)	274(83.0)

a) and b) : Pollen grains were sampled from one flower

の結果、花粉の異常が培養試験管や順化容器内で開花したものでなく、温室に定植後も長期間にわたり、予想以上に高い率で観察され、しかも培養の翌代に遺伝するものまで確認できた。

花粉の形態・機能の異常は、環境ストレス^(3,5) 種間雑種⁽⁷⁻⁹⁾ 倍数性⁽¹⁰⁻¹⁴⁾ 雄性不稔^(15,16) でみられ、減数分裂の異常やタバート細胞の異常消長などがその成因となっている。今回の稔性向上型の生理的な一過性の異常は、培養容器内の高湿度、弱光線、低ガス交換量、それに培地の高塩類濃度などが、ストレスとして花粉形成過程、なかでも減数分裂期から小孢子形成初期の若い蕾内の生殖細胞に直接、あるいは母体を通して間接的に悪影響を及ぼしたものであろう。それが温室定植後の好適条件によって、本来の正常な形態・機能を持つようになったものと思われる。培養試験管内で開いた花で、葯室に花粉の全く認められなかったものは、植物体のごく小さく、茎葉や根もまだ少ない、緩衝能力の弱い時期の葯に、前述の悪条件が作用して、花粉母細胞・小孢子の早期退化や消失を招いたものであろう。これはトマトの高温処理が強すぎた時の現象⁽³⁾ とよく似ている。一方、収穫期まで継続した稔性異常は、前述のようなストレスが胚形成の過程や plantlet のごく若い時期に、遺伝子や染色体に遺伝的変異を起こさせた結果と考えられた。

ウリ科の2倍体植物は通常3発芽孔花粉のみであるが、それが3・4・5倍体になると4発芽孔花粉が、スイカ⁽¹⁰⁾ メロン^(13,14,17) *Cucumis* 属の野生植物^(8,9)

でいずれも高頻度(80-83%)に認められ、発芽孔数が倍数性レベル推定の有効な指標となっている。クローバーでも従来の花粉や気孔孔辺細胞の大きさの差よりも、発芽孔数の差の方がより早く、より確実に倍数性が識別できるとしている⁽¹⁸⁾。また、*Cucumis* 属の野生植物の2倍体種間雑種(F₁)でも、組合せによって4発芽孔花粉が25%も出現しており、これは染色体数の還元していない復旧核の形成を暗示しているという⁽⁸⁾。今回誘導された稔性異常型4個体の内の1個体87 OC-21(花粉稔性55%)では、4発芽孔花粉が調査期間中5.8-25.6%確認されたので、根端細胞の染色体を調べたところ、予想どおり2n=28の4倍体で、全誘導植物23個体の内に4倍体が1個体実在したことになる。

Cucumis 属植物では染色体の倍加が自然に起きやすく、特に培養によって誘導された植物にその例が多い。キュウリでは、子葉外植体から再分化した2品種からの20個体の植物がすべて4倍体になっていた⁽¹⁹⁾。メロンでは、葉組織から直接形成された不定芽由来の植物中に4倍体と思われるものがあったという⁽²⁰⁾。筆者らのメロンの葯培養では、小孢子から直接形成されたembryoidを経て誘導された3個体の植物が、本来半数体であるべきところがすべて2倍体であり⁽²¹⁾、葯壁細胞のカルスからの誘導植物中にも4倍体が出現し⁽¹⁴⁾、メロンの胎座切片培養による誘導植物の1個体では、基部から分枝したツルが4倍体になっていた(未発表)。C. melo のコヒメウリでは、

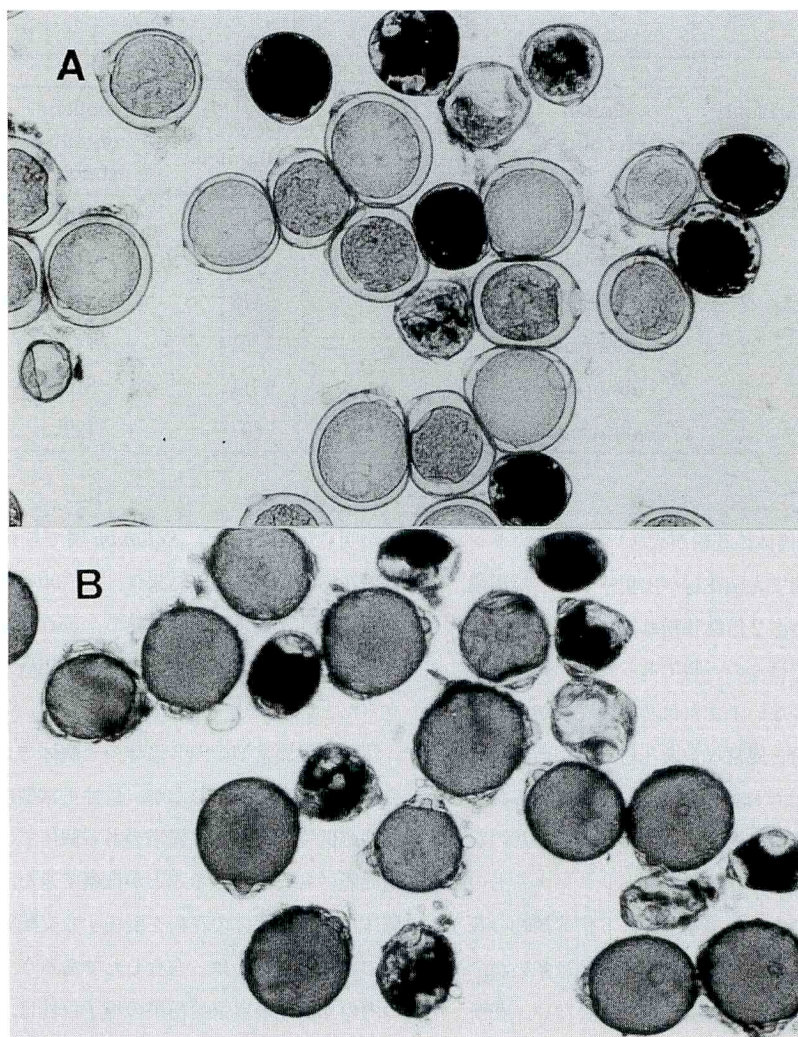


Fig. 6. Starch in small pollens at anthesis of induced plants showing low pollen fertility. A : Diploid plant (87 OC-8). B : Tetraploid plant (87 OC-21).

異なった種・属・科の植物の花粉の受粉や生長調節物質の柱頭処理で、アポミクシスによる傾母植物を得ているが、半数体でなくいずれも2倍体であった。⁽¹³⁾ また、温室栽培メロンでは、しばしば自然発生の4倍体が得られており、その成因は幼苗期の高温、乾燥、薬剤散布などの刺激によると考えられている。⁽¹⁷⁾ 今回の4倍体は、前述の培養ストレスがplantletの発育や胚形成の過程で染色体倍加の引き金になったのであろう。

4倍体植物の4発芽孔花粉は大型であるが、その3発芽孔花粉も一見して2倍体より大きい。そこで誘導植物の4倍体と稔性正常型の2倍体の3発芽孔花粉の径を計測したが、両者の大きさは重複せず、花粉の大きさでも4倍体と2倍体とが識別できた。キュウリではコルヒチンで倍加した4倍体が70-78 μm 、2倍体が54-60 μm で、両者の大きさはやはり重複していない。⁽¹²⁾ スイカでも4倍体と2倍体のそれは78 μm と64 μm で重複せず、⁽¹⁰⁾ メロンでも76 μm と59 μm

Table 3. Frequency of mature pollen grains contained starch

No. of individual	Ploidy level	Pollen fertility	No. of			b/a %
			flower investigated	pollen investigated ^{a)}	pollen contained starch ^{b)}	
87 OC - 1	2	normal	1	545	0	0
87 OC - 7	2	normal	2	1108	13	1.2
87 OC - 2	2	abnormal	2	1118	47	4.2
87 OC - 3	2	abnormal	2	1151	117	10.2
87 OC - 8	2	abnormal	2	1311	610	46.5
87 OC - 21	4	abnormal	1	607	192	24.0

で、⁽¹⁴⁾ いずれも4倍体の花粉が大きい。トウガラシやナスでは低温処理で大型花粉が出現するが、⁽³⁾ 環境ストレスによる場合も2倍性花粉は大きい。

稔性向上型個体ではほんの一時であったが、発芽孔数が通常のものより少ない1または2個の花粉が出現した。正常な充実花粉と異常な空虚花粉にかかわらず、1・2発芽孔花粉はほぼ同率の15%程度認められ、発芽孔数の減少と花粉の退化のいずれが先行したのかは明確ではないが、やはり培養のストレスによるものと思われた。前述のように、3、4、5倍体植物の花粉の発芽孔数が基本のものより増加する例は多いが、今回のように減少する報告例は知られていない。花粉分析時の植物種の同定では、発芽孔数が一つの大きな決め手になっているが、倍数性、種間雑種、環境ストレスなどによって、発芽孔数がかなり簡単に増減する事実は無視できない。

稔性異常個体の開花当日のやや小型の花粉にデンプンが残存していたが、これも培養のストレスがデンプンの完全な糖化を何らかの形で妨げたのであろう。

花粉発芽試験の結果からは稔性異常型個体であっても、50%程度含まれている充実花粉は発芽能力を充分持っており、それらの自家受粉果からは充実種子も得られている。これらの事実から、稔性異常型個体でも、形態的に正常な花粉は受精機能を具備していたこ

とが明らかになった。*Solanum* 属でも *in vitro* における花粉の発芽試験の結果は、*in vivo* における結実や種子稔性と有意な相関を持ち、carmine, fuchsin, peroxidase 反応よりも male fertility の評価に役立つという。⁽²²⁾

花粉稔性異常型の内2倍体の3個体で、それぞれ充分な量の自家受粉をしたが、稔性正常型に比べて種子稔性が低く、花粉側に異常のある個体では、卵側の受精機能にも異常のあることが推察できた。稔性異常型個体に正常型個体の花粉を受粉する交配実験を行えば、その事情はもっとはっきりしたであろう。稔性異常型の内4倍体の自家受粉果の種子稔性は、既報のメロン^(13, 17, 23)同様に27.3%と極端に低く、この個体と正常型の2倍体個体との正逆交配のそれは、既報のキュウリ⁽¹²⁾よりさらにわるく充実種子は得られなかった。

稔性異常型の1個体を自家受粉して翌代の稔性を調べたところ、正常型個体と異常型個体とははっきり分離した。供試親はすべて遺伝的純度が高く、稔性正常なものばかりであったから、誘導当代の果実収穫期まで花粉に異常が認められるような場合、これらは生理的な一過性のものではなく、培養ストレスによって遺伝的変異が誘発されたものと考えられよう。このような培養による遺伝的稔性低下は、本研究に供した誘導植物が受精胚から直接形成されたもので、変異の起き

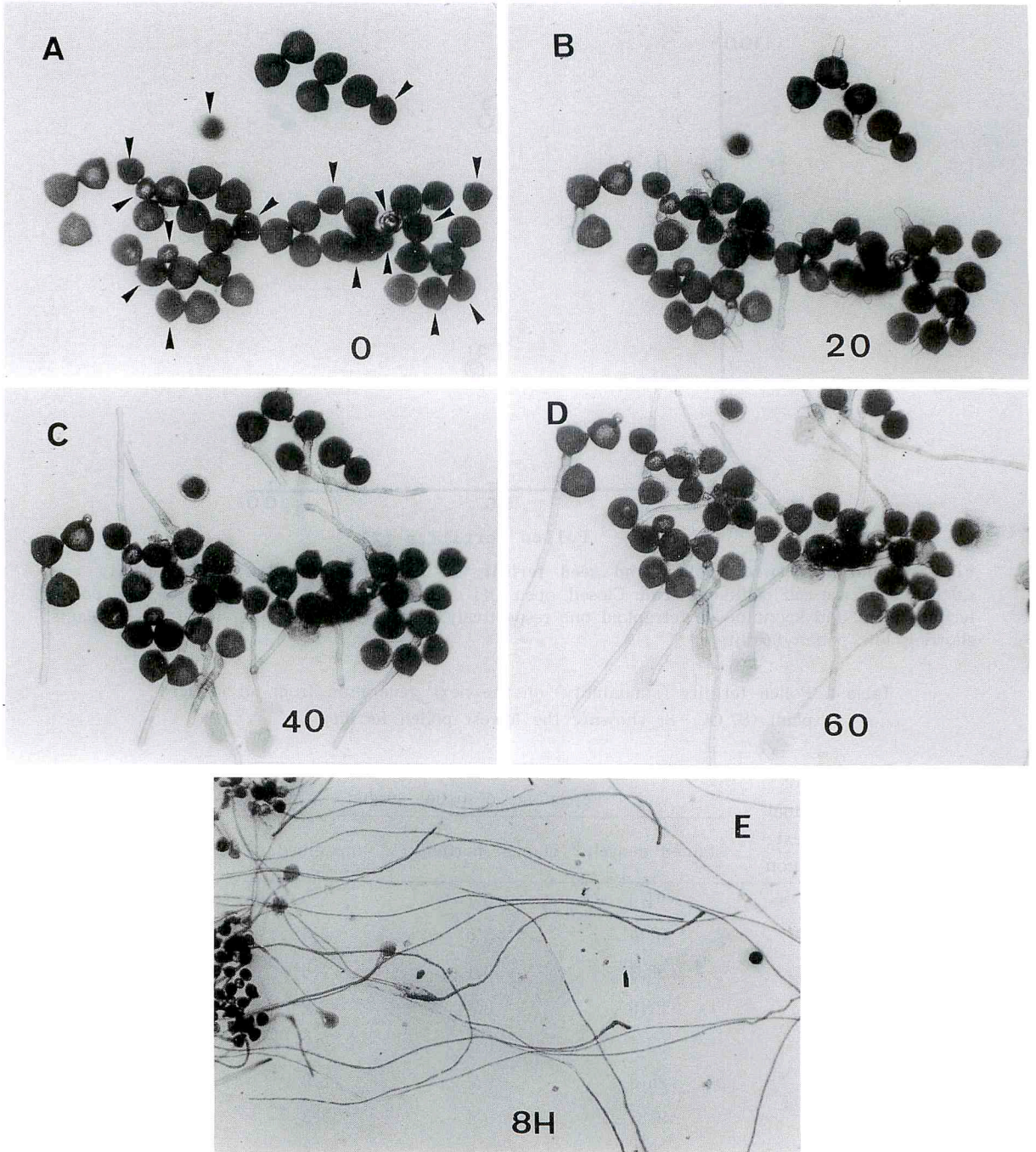


Fig. 7. Pollen germination of induced plant (87 OC-3) showing low pollen fertility. Abnormal small-sized pollen grains were distinguished by arrows in A. Elapsed times after inoculation were expressed in figures (A-D : minutes, E : hours).

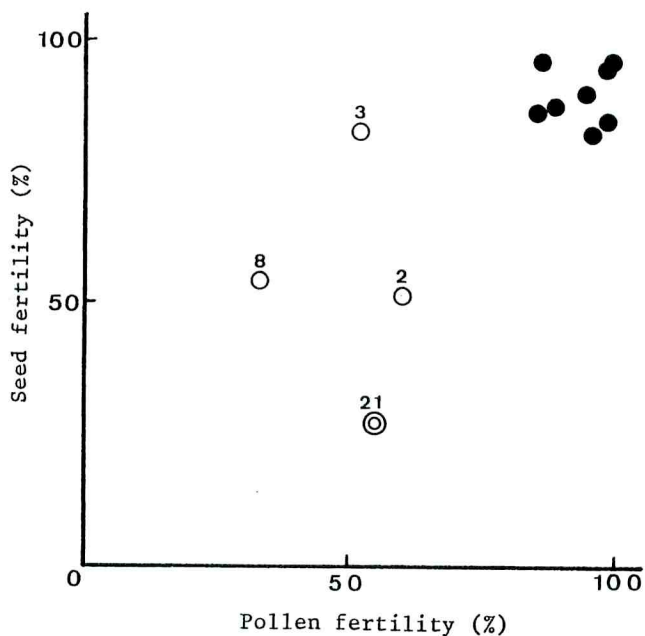


Fig. 8. Relation between pollen and seed fertility of each induced plant. Seed fertility was calculated on the self pollinated fruit. Closed, open and double open circle indicated high, low pollen fertility plant and spontaneous tetraploid one respectively. Figures indicated individual No. of plants showing low pollen fertility.

Table 4. Pollen fertility (stainability) on the next generation from an induced plant (87 OC-8) showing the lowest pollen fertility

No. of individual on next generation	Percentage of pollen grains		
	stained densely ^{a)}	stained partially	unstained
1	94.9	0.1	5.0
2*	61.6	5.0	33.4
3	98.3	0.1	1.6
4	97.6	0.2	2.2
5	97.4	0.4	2.2
6	96.8	0.2	3.0
7	91.3	0.4	8.3
8*	38.8	33.8	27.4
9*	58.9	7.9	33.2
10	92.4	0.6	7.0
11*	56.9	8.1	35.0

Plants of the next generation raised from seed obtained through the self pollination of 87 OC-8. a) : Pollen fertility

* Plant showing low pollen stainability

易いとされるカルス経由でないだけに、一つの警鐘ともなるであろう。果実や種子の生産を目標とする栽培植物では、花粉や種子稔性の低下は絶対回避しなければならない問題である。今回の誘導植物 23 個体内、4 個体では花粉稔性の異常が後代にまで遺伝する可能性が認められたことから、培養当代はもちろんのこと、その後代の稔性の追跡調査も、培養関係者にとっては必須のものといえよう。

要 約

培養によって受精直後の接合子や球状胚から誘導された 23 個体の植物の花粉に、培養のストレスの影響が及んでいないかどうかを調べた。初期に開花した花では開葯不能で葯室内に花粉の全くないものもあり、果実の収穫期まで、充実不全や空虚花粉が高い率で認められ、花粉稔性が終始 30-60% を示した異常型が 4 植物あった。異常型のうち 4 発芽孔花粉が常時 15% 程度観察された植物は 4 倍体、他の 3 植物は 2 倍体であった。4 倍体と正常型 2 倍体植物の花粉の直径は、それぞれ 85 μm と 66 μm で両者の大きさの変異は重ならなかった。順化中から定植後の一時期に、発芽孔数が通常の 3 から 2 または 1 に減少した花粉を 15% 程度含む花があった。異常型の小型の花粉には開花当日にもデンプンが残っていた。稔性異常型では、充実花粉は発芽し花粉管もよく伸長したが、充実不全花粉は発芽できず、自家受粉で得た果実の種子稔性も低い傾向があった。異常型植物の自殖翌代には、異常型と正常型が分離し、その稔性異常は培養中に誘発された遺伝的変異によるものと推察された。

引用文献

- (1) 藤下典之・斎藤清子：キュウリの胎座切片培養による接合子と初期球状胚からの植物誘導。植物組織培養 7 (1), 23-30 (1990).
- (2) 斎藤清子・藤下典之：メロン *Cucumis melo* の受精直後の胚珠からの植物誘導。育種 39 別刷 1, 18-19 (1989).
- (3) 藤下典之：各種蔬菜における低温、高温、暗黒、除雄剤などの処理にもとづく花粉退化とその機構に関する研究。大阪府立大学紀要 農学・生物学 22: 111-208 (1970).
- (4) 新関 稔・石川隆二・斎藤健一：マメ科植物パーズフレット・レイフォイルのプロトクローンに見られる染色体構造異常の発生。育種 40 別刷 1, 14-15 (1990).
- (5) 矢野優子・小寺孝治・鈴木千代吉・湯浅三男・大澤勝次：ウリ科野菜を用いた試験管内受精のための一手法。園学要旨。昭和 62 秋 224-225 (1987).
- (6) Ockendon, D. J. and P. J. Gates: Variation in pollen viability in the onion (*Allium cepa* L.). *Euphytica* 25, 753-759 (1976).
- (7) 藤下典之・前川輔良：*Cucumis* 属の種間交雑に関する研究 (第 2 報)。交雑親和性について。園学要旨。昭和 42 春 222-223 (1967).
- (8) Dane, F., D. W. Denna and T. Tuschiya: Evolutionary studies of wild species in the genus *Cucumis*. *Z. Pflanzenzuchtg.* 85, 89-109 (1980).
- (9) Nijs, A. P. M. Den and D. L. Visser: Relationships between African species of the genus *Cucumis* L. estimated by the production, vigour and fertility of F_1 hybrids. *Euphytica* 34, 279-290 (1985).
- (10) Lower, R. L. and K. W. Johnson: Observation on sterility of induced autotetraploid watermelons. *Amer. Soc. Hort. Sci.* 94, 367-369 (1969).
- (11) Nishi, T. and Mitsuoka: Occurrence of various ploidy plants from anther and ovary culture of rice plant. *Japan. J. Genetics* 44, 341-346 (1969).
- (12) Sumith O. S. and R. L. Lower: Effects of

- induced polyploidy in Cucumbers. *Amer. Soc. Hort. Sci.* **98**, 118-120 (1973).
- (13) 藤下典之・中川啓子：花粉及び生長調節物質による Apomixis 誘導の試み. *花粉* **6**, 34-36 (1974).
- (14) 藤下典之・古川 一：*Cucumis melo* L. の蒴培養に関する研究 (第1報). 培地組成及び再分化した植物の特性. *園学要旨*. 昭和 58 秋 162-163 (1983).
- (15) Bohn, G. W. and T. W. Whitaker: A gene for male sterility in the muskmelon. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* **53**, 309-314 (1949).
- (16) McCreight, J. D.: A third muskmelon male sterile gene. *HortScience* **19**, 268-270 (1984).
- (17) 鈴木英次郎：マスクメロンに関する研究 (第1報). 自然発生の4倍性個体について. *静岡大教育学部研究* **9**, 169-176 (1958).
- (18) Dijkstra, J. and G. J. Speckmann: Germinal pore number in pollen grains a selection basis in the production of tetraploid clover. *Euphytica* **14**, 244-248 (1965).
- (19) Kim, S-G., J-R. Chang, H-C. Cha and K-W. Lee: Callus growth and plant regeneration in diverse cultivars of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **12**, 67-74 (1988).
- (20) 末松信彦・大塚寿夫・戸田幹彦：メロンの組織培養 (第一報). 葉片からの植物体再生. *静岡農試研究報告* **31**, 31-37 (1986).
- (21) 藤下典之・柴田哲生：メロンの蒴培養による植物誘導. *育種* **40**, 別刷1, 142-143 (1990).
- (22) Janssen, A. W. B. and J. G. TH. Hermesen: Estimating pollen fertility in *Solanum* species and haploids. *Euphytica* **25**, 577-586 (1976).
- (23) 鈴木英治郎：マスクメロンに関する研究 (第3報). 三倍性交雑 $4x \times 2x$ について. *静岡大教育学部研究* **10**, 218-222 (1959).