

論 説

薬培養によるコムギ属、エギロプス属および
カモジグサ属植物のカルス誘導と器官再分化

木俣美樹男・阪本 寧男

Callus induction and organ redifferentiation of *Triticum*,
Aegilops and *Agropyron* by anther culture.

Mikio KIMATA and Sadao SAKAMOTO*

緒 言

薬培養が高等植物の半数体育成の効果的な方法の1つであることは Guha and Maheshwari^{1,2)}(1964, 1966) による *Datura innoxia* の研究で最初に示された。この方法によって育成した半数体の染色体数を倍加することにより、能率よく遺伝的に純粋なホモ個体が得られると考えられる³⁾ので、多くの有用植物を用いて薬培養による半数体育成が、主として育種学的見地から試みられるようになった。現地までにイネ (Niizeki & Oono, 1968; Nishi & Mitsuoka, 1969)^{4,5)}、タバコ (中田・田中, 1968; Nitsch & Nitsch, 1969)^{6,7)}、ブラッカ (Kameya & Hinata, 1970)⁸⁾、およびアワ (伴・国分・宮司, 1971)⁹⁾においてこの方法で半数体の育成に成功している。

また一方、薬培養による半数体の育成は複雑な高次倍数性をふくむ植物群のゲノム分析の有力な手がかりを得る方法と考えられる。なぜならばこのようにして得られた倍数性半数体 (polyhaploid) の染色体接合の観察によって、その倍数種のゲノム構成に関する有力な知見が得られるからである。

そこでこのような高次倍数種を多数ふくむイネ科のコムギ族植物 (tribe Triticeae) にこの方法を適用する目的で、コムギ属、エギロプス属およびカモジグサ属植物を用いて本研究をおこなった。ここでは用いた属、種および系統間におけるカルス形成能ならびに器官再分化能の比較、再分化した器官の細胞学的研究、および再分化植物の特徴について報告する。なお本研究の一部はすでに報告した (Kimata & Sakamoto, 1972)¹⁰⁾。

実験材料および方法

用いた材料は下記のコムギ属 17 種 21 変種、エギロプス属 11 種およびカモジグサ属 8 種である。

コムギ属: *Triticum aegilopoides boeoticum*, *Tr. monococcum vulgare*, *Tr. monococcum flavescens*, *Tr. dicoccoides kotschyanum*, *Tr. dicoccum liguliforme*, *Tr. dicoccum georgicum*, *Tr. durum reichenbachii*, *Tr. durum melanopus*, *Tr. turgidum nigro-barbatum*, *Tr. orientale*, *Tr. pyramidale recognitum*, *Tr. polonicum vestitum*, *Tr. persicum stramineum*, *Tr. aestivum erythrospermum*, *Tr. aestivum Chinese Spring*, *Tr. spelta duhamelianum*, *Tr. macha subletschumicum*, *Tr. sphaerococcum rotundatum*, *Tr. compactum icterium*, *Tr. araraticum*, *Tr. timopheevi*.

エギロプス属: *Aegilops caudata polyathera*, *Ae. squarrosa*, *Ae. umbellulata*, *Ae. comosa thessalica*, *Ae. speltooides*, *Ae. cylindrica*, *Ae. triuncialis*, *Ae. ovata*, *Ae. variabilis intermedia*, *Ae. crassa macrothera*, C C^u C^u (*Ae. caudata* × *Ae. umbellulata*).

合成複二倍体)

カモジグサ属: *Agropyron campestre*, *Ag. elongatum*, *Ag. intermedium*, *Ag. junceum*, *Ag. littorale*, *Ag. repens*, *Ag. smithii*, *Ag. trichophorum*.

これらの材料の四分前期から一核期の花粉をもつとおもわれる穂を切りとり、約 200 個の葯をあらかじめ滅菌したピンセットを用いて摘出し、第 1 表に示す 3 種の試験管培地各々 8 本に 1 本あて約 25 個ずつ置床し、カルス誘導を試みた。3 種の培地は新関 (1968)¹¹⁾ によるが、本実験ではこれらを培地 (I)、(II) および (III) とよぶ。培地 (I) は Miller (1963)¹²⁾ の培地に 2.21

* 国立遺伝学研究所生理遺伝部

Department of Physiological Genetics, National Institute of Genetics, Misima, Japan.

第1表 培地の組成 (単位はmg/ℓ)*

成分	培地		
	(I)	(II)	(III)
NH ₄ NO ₃	1000.0	1650.0	
KNO ₃	1000.0	1900.0	80.0
H ₃ BO ₃	1.6	6.2	1.5
KH ₂ PO ₄	300.0	170.0	
KI	0.8	0.83	0.75
Na ₂ MO ₄ O ₂ · 2H ₂ O		0.25	
CoCl ₂ · 6H ₂ O		0.025	
CaCl ₂ · 2H ₂ O		400.0	
MgSO ₄ · 7H ₂ O	35.0	370.0	360.0
MnSO ₄ · 4H ₂ O	4.4	22.3	4.5
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	1.5	10.6	1.5
CuSO ₄ · 5H ₂ O		0.025	
Na-EDTA		74.6	
FeSO ₄ · 7H ₂ O		55.6	
Thiamine · HCl	0.1	1.0	1.0
KCl	65.0		65.0
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	347.0		200.0
Glycine	2.0	20.0	20.0
Nicotinic acid	0.5	5.0	5.0
Pyridoxin · HCl	0.1	5.0	5.0
Na-Fe-EDTA	32.0		
Myo-inositol		200.0	100.0
Na ₂ SO ₄			200.0
Na ₂ H ₂ SO ₄			16.5
Fe ₂ (SO ₄) ₃			2.5
NAA		20.0	20.0
2, 4-D	2.21		
Sucrose	30.0g/ℓ	30.0g/ℓ	30.0g/ℓ
Agar	10.0g/ℓ	9.0g/ℓ	9.0g/ℓ
pH	6.0	5.8	5.8

* 新聞(1968)¹¹⁾による。

mg/lの濃度の2, 4-D (2, 4-dichlorophenoxyacetic acid)を加えたものである。なお、カモジグサ属は培地(I)のみを用いた。

このようにして誘導されたカルスは、その生成部位より考えて花粉起源カルスと花糸起源カルスに分けられた。花粉起源カルスとは薬が裂開し内部から増殖してきたカルスをいう。一方、花糸起源カルスは薬についている花糸の切断面などより増殖してきたカルスを指す。

また、誘導されたカルスから器官を再分化させるためには、どの場合もカルス誘導率の良好だった培地(I)から2, 4-Dを除いたもの(再分化用培地)を用いた。なお、カルスの継代培養には培地(I)のみを用いた。

培養はすべて25℃恒温で約100ルクスの連続人工照明下でおこなった。

花粉起源カルスから再分化した器官は半数性(n)で、花糸起源カルスからのそれらは全数性(2n)と考えられる。それを確かめるために、再分化した根の染色体数の調査をアセトカーミン押しつぶし法により、分裂中期の根端細胞でおこなった。

実験結果

1) カルスの誘導

薬の培養によるカルス誘導の結果は第2表に示され

第2表 カルス誘導能の比較 (置床後80日目の観察)

系	系統数	培地		I		II		III	
		花粉	花糸	花粉	花糸	花粉	花糸		
コムギ属									
一粒系									
野生種	1	1	0	0	0	1	0		
栽培種	2	1	1	0	0	0	0		
二粒系									
野生種	1	0	1	0	0	0	0		
栽培種	9	1	9	0	0	0	0		
普通系									
栽培種	6	1?	4	0	0	0	0		
チモフェビー系									
野生種	1	0	1	0	0	0	0		
栽培種	1	0	1	0	0	0	0		
小計	21	3+1?	17	0	0	1	0		
エギロプス属									
二倍種	5	0	0	0	0	0	0		
四倍種	5	1?	0	0	0	0	0		
合成種	1	1	1	0	0	0	0		
小計	11	1+1?	1	0	0	0	0		
カモジグサ属									
8種	8	2	3	-	-	-	-		
小計	8	2	3	-	-	-	-		

るが、培地(I)でのみよく誘導された。培地(II)および(III)では後者で *Tr. aegilopoides* の花粉起源カルスが0.5%の率で誘導された以外はほとんどおこらなかった。培地(I)における花粉起源カルスの誘導率は第3表に示される。今までにコムギ属4種、エギロプス属

第3表 培地(I)における花粉起源カルス誘導率 (置床後80日目の観察)

種	薬置床数	誘導カルス数	誘導率(%)
<i>Triticum aegilopoides</i>	197	3	1.5
"	185*	1	0.5
<i>Tr. monococcum vulg.</i>	223	1	0.5
<i>Tr. durum reich.</i>	228	1	0.4
<i>Tr. compactum</i>	262	1?	0.4
<i>Aegilops variabilis</i>	206	1?	0.5
C C C ^u C ^u	206	2	1.0
<i>Agropyron elongatum</i>	294	4	1.4
<i>Ag. intermedium</i>	102	1	1.0

* 培地(III)による

2種、カモジグサ属2種でカルス誘導に成功した。カルス誘導率は0.4~1.5%であった。また、二粒系コムギの花糸起源カルスについては第4表に示される。

第4表 培地(I)における二粒系コムギの花糸起源カルスの誘導率 (置床後80日目の観察)

種	薬置床数	誘導カルス数	誘導率(%)
<i>Triticum dicoccoides</i>	193	36	13.4
<i>Tr. dicoccum ligul.</i>	187	36	14.0
<i>Tr. dicoccum georg.</i>	222	1	0.4
<i>Tr. durum reich.</i>	228	24	10.5
<i>Tr. durum melan.</i>	214	1	0.4
<i>Tr. turgidum</i>	231	14	6.0
<i>Tr. orientale</i>	208	33	15.8
<i>Tr. pyramidale</i>	212	26	12.2
<i>Tr. polonicum</i>	203	5	2.4
<i>Tr. persicum</i>	200	5	2.5

この群のカルス誘導率は比較的高く最高15.8%で、また用いた8種のいずれにおいてもカルス誘導に成功した。その他の系統の花糸起源カルスの誘導率は、コムギ属では一粒系栽培種0.5%、普通系栽培種は平均1.9%、チモフェビー系野生種6.5%、同じく栽培種7.2%であった。エギロプス属ではC C C^u C^u (*Ae. caudata* × *Ae. umbellulata* の人為複二倍体) で1.4%の割合で

誘導されたのみで、他の種ではまったく誘導されなかった。カモジグサ属では平均2.3%であった。

2) カルスからの器官再分化

カルスからの器官再分化をみるために、花粉・花糸両起源カルスの直径1~3mmに増殖したものを、培地(I)から2,4-Dを取り除いた再分化用培地に移植した。その結果は第5表に示される。なお、カルスの生長が

第5表 花粉起源および花糸起源カルスの再分化能の比較

種	花粉起源カルス	花糸起源カルス
コムギ属:		
一粒系		
<i>Tr. aegilopoides</i>	C	-
<i>Tr. monococcum vulg.</i>	R	-
<i>Tr. monococcum flav.</i>	-	C
二粒系		
<i>Tr. dicoccoides</i>	-	R
<i>Tr. dicoccum ligul.</i>	-	R
<i>Tr. durum reich.</i>	-	R
<i>Tr. durum melan.</i>	-	C
<i>Tr. turgidum</i>	-	C
<i>Tr. orientale</i>	-	R
<i>Tr. pyramidale</i>	-	C
<i>Tr. polonicum</i>	-	R
普通系		
<i>Tr. sphaerococcum</i>	-	C
チモフェビー系		
<i>Tr. araraticum</i>	-	R
<i>Tr. timopheevi</i>	-	R
エギロプス属:		
C C C ^u C ^u	R + S	R
カモジグサ属:		
<i>Ag. elongatum</i>	R	-
<i>Ag. junceum</i>	-	C
<i>Ag. littorale</i>	-	R

C: 再分化しないカルス

R: 根の再分化したもの

S: 茎葉の再分化したもの

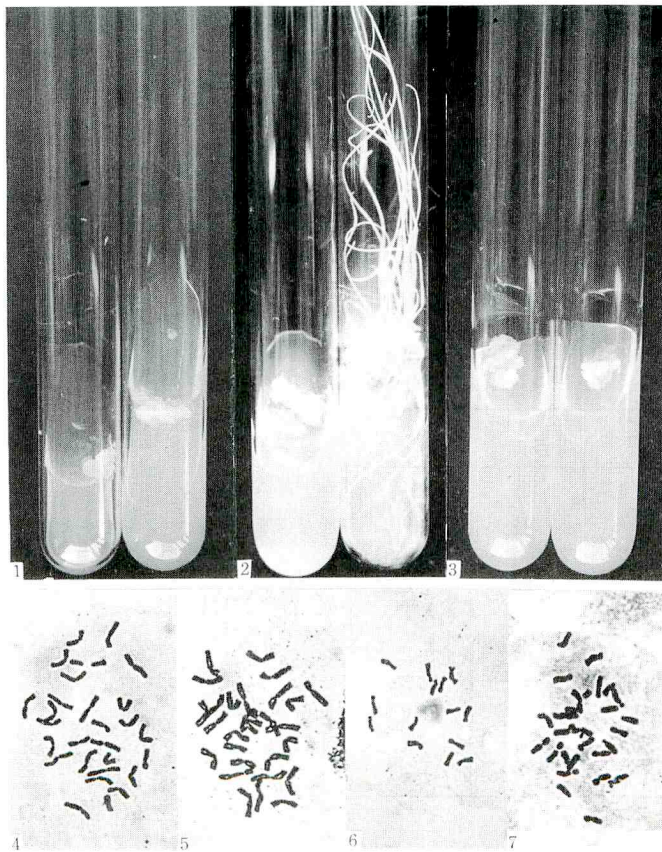
Tr. durum reichenbachii, *Tr. compactum icterium*, *Ae. variabilis intermedia* および *Ag. intermedium* の花粉起源カルス、*Tr. dicoccum georgicum*, *Tr. persicum stramineum*, *Tr. spelta duhamelianum*, *Tr. com-*

悪く直径1mmに満たない *pactum icterium*, *Tr. aestivum* Chinese Spring および *Ag. intermedium* の花糸起源カルスは器官再分化の観察から除外した。

根の分化は系統によって異なるが、再分化したカルスでは再分化用培地移植後10~40日で観察された(第1図)。花粉起源カルスの再分化をみると、コムギ属では一粒系の *Tr. monococcum vulgare*、カモジグサ属では *Ag. elongatum* において根のみが再分化した(第3図)。これに対してエギロプス属の人為合成種(CC C^uC^u)においては多数の根および茎葉をもった植物体の再分化が移植後約2週間でみられた。しかし、これらはすべてアルビノで子葉鞘や葉には葉緑素の形成は全然みられなかった(第2図)。そのうち本葉7枚を

つけた1個体は移植後117日目で出穂した。なお、これは穂がただ1小穂のみからなり、雌蕊および雄蕊は全然みあたらない不完全なものであった。

花糸起源カルスの再分化はコムギ属では二粒系5系統、*Tr. dicoccoides kotschyianum*, *Tr. dicoccum liguliforme*, *Tr. durum reichenbachii*, *Tr. orientale* および *Tr. polonicum vestitum*. とチモフェビー系2系統 *Tr. araraticum* および *Tr. timopheevi* において根のみが分化した。エギロプス属およびカモジグサ属ではそれぞれ CCC^uC^u および *Ag. littorale* において根が分化したのみであった。一般に再分化根は細く、部分的にカルス状を呈していた。



- 第1図 *Triticum orientale*の花糸起源カルス(左)と再分化根の出たカルス(右)
 第2図 CCC^uC^uの花糸起源カルス(左)と再分化植物(右)
 第3図 *Agropyron elongatum*の花糸起源カルス(左)と再分化根の出たカルス(右)
 第4図 *Tr. dicoccum ligul.*の花糸起源カルスより再分化した根の根端細胞染色体(2n=28)
 第5図 *Tr. durum reich.*の花糸起源カルスより再分化した根の根端細胞染色体(2n=28)
 第6図 CCC^uC^uの花糸起源カルスより再分化した植物の根端細胞染色体(2n=14)
 第7図 CCC^uC^uの花糸起源カルスより再分化した根の根端細胞染色体(2n=28)

3) 根端細胞による染色体数の調査

根が再分化したものについては、根端細胞を用いて染色体数を調査した。その結果は第6表に示される。

第6表 再分化根の根端細胞における染色体数

種	カルスの起源	染色体数 (2n)
<i>Triticum monococcum vulg.</i>	花粉	—
<i>Tr. dicocoides</i>	花系	28
<i>Tr. dicocum ligul</i>	花系	28
<i>Tr. durum reich.</i>	花系	28
<i>Tr. orientale</i>	花系	28
<i>Tr. polonicum</i>	花系	28
<i>Tr. araraticum</i>	花系	28
<i>Tr. timopheevi</i>	花系	—
CCC ^u C ^u	花粉	14
CCC ^u C ^u	花系	28
<i>Agropyron elongatum</i>	花粉	35
<i>Ag. littorale</i>	花系	—

根の形成は系統により遅速があり、根端細胞を採取したときにはすでに良好な根がないものがあつたり、分化した根の数がわずかですべての系統を調査しえなかつた。しかし、調査できた系統だけを見ると、花粉起源と考えられたカルスからの再分化した根は半数性であり(第6図)、花系起源のものは全数性であることがわかり(第4・5・7図)、カルス形成時の分類が正しかったことを確かめることができた。とくにエギロプス属の合成種である CCC^uC^u (2n=28) の花粉起源カルスより再分化した植物はアルビノであるが 2n=14 の半数性植物であることが確認され(第6図)、これに対して花系起源カルスより再分化した根は 2n=28 の全数性であることが確認された(第7図)。

考 察

本実験でカルス誘導率の高かつた培地(I)は Niizeki & Oono(1968)⁴⁾ がイネの薬培養用培地として用いたものであるが、コムギ属の薬培養をおこなつた Fujii (1970)¹³⁾ の用いた 2,4-D 20mg/l を含む改変 White 培地とほぼ同じ結果を得た。カルス誘導に必要なオーキシンについてはコムギおよびその近縁種では NAA (Naphtalene acetic acid) より 2,4-D の方が有効と考えられる。

属、種および系統間のカルス誘導能を比較すると、花粉起源カルスについては、コムギ属では一粒系でよ

く、二粒系および普通系では低い。エギロプス属では非常に低いが、カモジグサ属では比較的よい。花系起源カルスについては、コムギ属では二粒系およびチモフェビー系が比較的高く、一粒系および普通系は低い。エギロプス属ではほとんど誘導されず、カモジグサ属では低いと考えられる。

一般的にみて用いた3属のカルス誘導率は低く、とりわけ花粉起源カルスのそれは非常に低い。その原因は用いた花粉の発育時期にも関係があるかもしれないが、むしろ用いた培地ではコムギ属およびその近縁植物のカルス誘導率そのものが低いと考えられる。

根の再分化は比較的容易におこつたが、茎葉については非常におこりにくかつた。これは茎葉分化が根の分化に較べるとかなり複雑な器官分化と考えられるので、そのためにはカルスにも、培地にもかなり良好な、しかも安定した条件がととのわないとおこりにくいことを示唆している。

コムギ属の栽培種と野生種間のカルス誘導および再分化能には有意な差は認められなかつた。

CCC^uC^u は二倍種の *Ae. caudata* と *Ae. umbellulata* の人為合成複二倍体(近藤, 1941)¹⁴⁾ で 2n=28 の四倍体である。この植物の花粉起源カルスからアルビノであるが 2n=14 の半数性植物を再分化させることができたことは、薬培養によるコムギ族植物の半数性植物育成に可能性があることを示唆するものである。なお、アルビノ半数体はイネ¹⁵⁾ およびアワ⁹⁾ においても見出されている。

以上今までにえられた結果から考えて、今後とくに検討する必要があるのは、(1)用いた花粉の発育段階はタバコの例⁶⁾ にならつて四分子期から一核期のものを用いたが、本実験の3属についても適当であるかどうか、(2)培地の組成について、とりわけオーキシンの種類と濃度について、(3)カルスの再分化培地への移植時期と移植カルスの大きさについて考慮すること、の3点である。

要 約

1) コムギ属17種21変種、エギロプス属11種およびカモジグサ属8種を用いて薬培養をおこない、花粉起源ならびに花系起源カルスの誘導と器官再分化について研究した。

2) 用いた3種の培地のうち、Miller(1963)の培地に 2.21mg/l の 2,4-D を添加した培地(I)でとくに良

好な結果が得られた。

3) 花粉起源のカルス形成はコムギ属4種、エギロブス属2種、カモジグサ属2種でみられた。花糸起源カルスはとくに二粒系コムギで高率に形成された。

4) カルスより器官再分化をおこさせ、根を分化したのものについては染色体数を調査した。

5) *Ae. caudata* と *Ae. umbellulata* の複二倍体である CCC^uC^u においてのみアルビノであるが半数性植物

を得た。そのうち1個体が出穂したが、穂は不完全な1小穂のみからなっていた。

謝 辞

この研究を進めるにあたって、種々御教示をいただいた国立遺伝学研究所の藤井太郎・天野悦夫両博士に深く感謝の意を表する。

引 用 文 献

- 1) Guha, S. and S.C. Maheshwari (1964) *In vitro* production of embryos from anthers of *Datura*. Nature 204: 497.
- 2) Guha, S. and S.C. Maheshwari (1966) Cell division and differentiation of embryos in the pollen grains of *Datura in vitro*. Nature 212: 97-98.
- 3) Katayama, Y. and M. Tanaka (1969) Studies on the haploidy in relation to plant breeding. V. Further proposal of haploid method in plant breeding. Seiken Ziho 21: 37-44.
- 4) Niizeki, H. and S. Oono (1968) Induction of haploid rice plant from anther culture. Proc. Japan Acad. 44: 554-557.
- 5) Nishi, T. and S. Mitsuoka (1969) Occurrence of various ploidy plants from anther and ovary culture of rice plant. Japan. J. Genetics 44: 341-346.
- 6) 中田和男・田中正雄 (1968) 葯の組織培養による花粉からのタバコ幼植物の分化. 遺伝学雑誌 43: 65-71.
- 7) Nitsch, J. P. and C. Nitsch (1969) Haploid plants from pollen grains. Science 163: 85-87.
- 8) Kameya, T. and K. Hinata (1970) Induction of haploid plants from pollen grains of *Brassica*. Japan. J. Breeding 20: 82-87.
- 9) 伴 義之・国分禎二・宮司佑三 (1971) 葯培養による粟半数体の育成. 鹿児島大学農学部学術報告 21: 71-81.
- 10) Kimata, M. and S. Sakamoto (1972) Production of haploid albino plants of *Aegilops* by anther culture. Japan. J. Genetics 47: (in press)
- 11) 新関宏夫 (1968) 作物の組織培養の育種の利用に関する研究. 農業技術研究所生理遺伝部育種基礎試験成績書 (II): 16-23.
- 12) Miller, C. O. (1963) Kinetin and kinetin-like compounds. In "Moderne Methoden der Pflanzen-analyse" (H. F. Linskens und M. V. Tracey, ed.) Band 6: 194-202. Springer-Verlag, Berlin.
- 13) Fujii, T. (1970) Callus formation in wheat anthers. Wheat Information Service 31:1-2.
- 14) 近藤典生 (1941) コルヒチンによる *Secale*, *Haynaldia* および *Aegilops* の染色体倍加. 遺伝学雑誌 17: 46-54.
- 15) 新関宏夫 (1968) イネの組織培養. 化学と生物 6: 743-748.

Summary

1. Callus induction and organ redifferentiation were studied by the anther culture of 17 *Triticum*, 11 *Aegilops* and 8 *Agropyron* species.
2. Out of three different culture media used for callus induction, the best result was obtained by the Miller's

medium supplemented with 2.21mg/12,4-D.

3. Callus formation from pollen grains was observed in four *Triticum*, two *Aegilops* and two *Agropyron* species. On the contrary, a high frequency of callus formation from anther filaments was obtained in emmer wheats.
4. In order to induce organ redifferentiation, calluses were transferred to the same medium as mentioned above omitting 2, 4-D. Root formation was observed in several species.
5. Sprouting appeared only from calluses derived from pollen grains of C C C^u C^u, an artificially synthesized amphiploid (2n=28) between diploid *Ae. caudata* and *Ae. umbellulata*, and many plantlets took shape. However, all were haploid albino plants(2n=14).

研 究 メ モ

この頃、空中花粉の調査が各方面で行なわれている。花粉症のブタクサ花粉などは毎年話題になっている。それとは別に牧草地での採種でも空中花粉に悩まされている。

北海道十国種畜牧場（河東郡音更町）は農林省畜産局の牧場で3,600町のうち、1,200町は牧草地で、オーチャードグラス（カモガヤ）、チモシー（オオアワガエリ）・ライムギを70町作つけしている。ところが花粉が飛散して自然交配が行なわれる危険があり、これが対策と研究法に苦心している。つまり空中花粉の飛散状態について観測するにしても、三種の牧草の見分け分はどうしたらよいか。花粉の飛散距離を測って採種圃場の距離をどの位に離れたらよいか。花粉観測台の作製と取付の具体的な指導を上野まで連絡して来ている。

