

ユリの遠縁種間交雑に関する研究第4報

誌名	園藝學會雜誌
ISSN	00137626
著者	浅野, 義人
巻/号	49巻1号
掲載ページ	p. 114-118
発行年月	1980年6月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



ユリの遠縁種間交雑に関する研究 (第4報)

長さ 0.3~0.4 mm の微小交雑幼胚の培養

浅野 義人

(北海道大学農学部)

Studies on the Crosses between Distantly Related Species of Lilies IV. The Culture of Immature Hybrid Embryos 0.3~0.4 mm Long

Yoshito ASANO

Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo 060

Summary

1. Use of normal endosperm as nurse tissue.

Normal endosperm obtained from inter-clonal crossing was used as nurse tissue for the culture of immature hybrid embryos (0.3~0.4 mm in length).

About 60 percent of the immature embryos could be cultured by putting them on normal endosperm.

The growth pattern of the embryos was 'embryonic growth' similar to the normal pattern seen *in vivo*, and was different from the 'seedling growth' usually seen on artificial mediums; it appears that the endosperm contains a kind of 'embryo factor (s)' which was absent in the artificial medium.

2. Culture on artificial medium containing amino acids.

Free amino acids contained in the normally developing endosperm were analyzed qualitatively and quantitatively and an artificial medium of the same amino acid composition was prepared.

The survival percentage of hybrid embryos was somewhat increased on prepared medium as compared with on basic medium, but it appears that the prepared medium used here was still lacking the so-called 'embryo factor(s)' since the growth pattern of the embryos was similar to 'seedling growth'.

緒言

花柱切断受粉法によりユリの遠縁種間交雑を試みた場合、組合せによっては、通常の合成培地ではその培養可能な大きさに達しない微小な幼胚しか得られない場合も出てくる(2)。このような微小幼胚を培養すると通常枯死するが、たとえ一定期間生存しえても、わずかな異常発育を示す程度に終ることが多い。したがって、このようなステージにある胚の発育を更に継続させるためには、通常の培地に加えて何らかの培養条件が究明されなければならない。

本報では、本来の胚の滋養組織である胚乳をそのまま利用した胚培養法と、胚乳中の遊離アミノ酸を定性・定量し、これと等量を添加した合成培地上で培養を試みた結果とを報告する。

I. Nurse tissue としての胚乳の利用

nurse tissue として胚乳組織そのものを利用する方法として、培地上に置床した胚の周囲に胚乳を置く方法(11)と、直接、接触させる方法(9)が試みられているが、ユリ幼胚の場合、後者の方法のみ有効であった。

材料及び方法

L. longiflorum × *L. dauricum*, 及び *L. 'Shikayama'* × *L. henryi* の交配(花柱切断受粉)から得られた、長さ 0.3~0.4 mm (ほぼ球形; 第1図)の範囲の交雑幼胚を培養した。nurse tissue として、品種間交配により正常に発育中の胚乳(交配後 40 日:ゼリー状~交配後 60 日後:固化)を用いた。胚乳は胚珠から外部組織を丁寧にはいで取り出した。

培養方法は Murashige & Skoog 基本培地(5) (sucrose 30 g/l, pH: 5.0, 寒天固形)上に胚乳を置床し、その上に培養すべき交雑幼胚を乗せたが、一部は胚乳中の

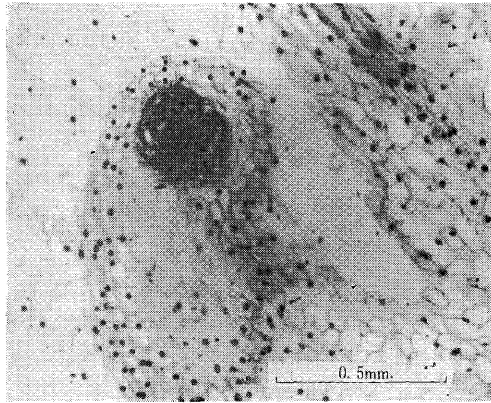


Fig. 1. The immature hybrid embryo used for culture, from *L. longiflorum* × *L. dauricum*, 35 days after pollination.

胚を摘出した跡に交雑幼胚を挿入する方法を取った。いずれも植付け後、25℃、暗所下で培養した。

結 果

培養胚を胚乳中に挿入、埋没させる方法では、胚乳内部で胚の発育が始まりながらも、やがて褐変を起した胚乳に封入され、そのまま枯死するに至り、不都合であった。

胚乳上に置いて培養した場合の幼胚の生育率は Table 1 のとおりで、交配後 40 日の正常の発育中の胚乳を利用した場合、培養 3 週間後で置床胚の約 60% が発育していた（第 2 図）。この時点で、胚乳はその半数以上が表面の大部分を褐変させていたが、発育中の培養胚に接している部分は褐変を起こさず、この部分を通じて胚への養分供給がなされているものと見られた（培地への yeast extract, casein hydrolysate, malt ext., coconut milk などの添加は胚乳の褐変の程度にほとんど影響を与えなかった）。

幼胚の発育パターンは embryonic growth(1) を示した。すなわち、より大きな幼胚を合成培地で培養した際に見られる seedling growth(3) と異なり、幼胚が胚の各器官を形成しながら成熟胚まで発育する過程を経た

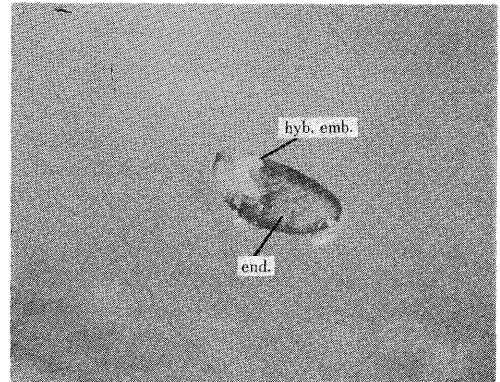


Fig. 2. The embryonic growth of immature hybrid embryo of *L. longiflorum* × *L. dauricum* on the endosperm from inter-clonal crossing of *L. × elegans* : 2 weeks after planting.
hyb. emb.: hybrid embryo
end : endosperm

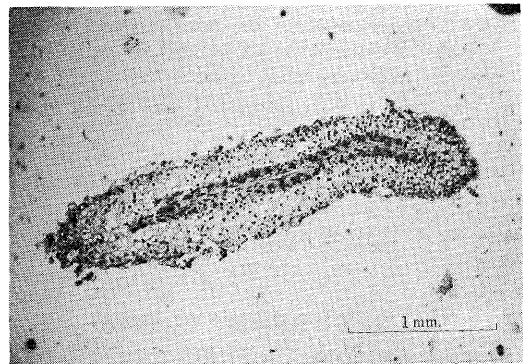


Fig. 3. 'Embryonic growth' of immature hybrid embryo of *L. longiflorum* × *L. dauricum* cultured on the endosperm from inter-clonal crossing of *L. × elegans* : 2 weeks after plating.

（第 3 図）。

また、これら胚乳上で培養された幼胚の発育速度は、親和組合せにより *in vivo* で正常に発育した胚のそれとほぼ同程度であった（第 4 図）。

Table 1. Growth of immature hybrid embryos (0.3~0.4mm long) on the endosperms which were maintained on Murashige & Skoog medium. After 3 weeks at 25°C in the dark.

Endosperms from (inter-clonal cross)		Embryos from	No. of embryos planted (A)	No. of growing embryos (B)	Percentage (B/A)
Species	Days after pollination				
Control*		<i>L. longiflorum</i> × <i>L. dauricum</i>	23	3	13.0
<i>L. × elegans</i>	40	〃	32	19	59.4
〃	60	〃	12	2	16.7
<i>L. longiflorum</i>	50	〃	18	6	33.3
<i>L. speciosum</i>	40	<i>L. 'Shikayama'</i> × <i>L. henryi</i>	23	15	65.2

* Cultured on MS medium supplemented with NAA 10⁻³mg/l.

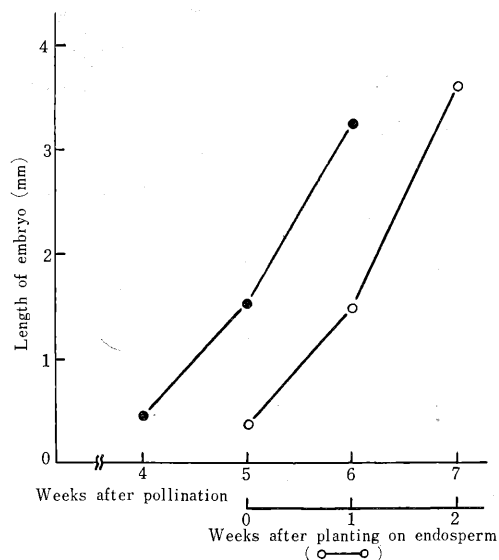


Fig. 4. Comparison of the growth of immature hybrid embryos cultured on the endosperms with embryos from inter-clonal cross *in vivo*.

- : embryos from inter-clonal cross of *L. longiflorum in vivo*.
- : embryos from *L. longiflorum* × *L. dauricum* : on the endosperms of *L. elegans* (40 days after pollination).

Average of 12 (inter-clonal) and 10 (×*L. dauricum*) embryos.

II. アミノ酸を含む合成培地上での培養

Stimart & Ascher は、大麦幼胚培養のための Norstog 培地 (1973) をユリの胚培養 (*L. longiflorum* の品種間交配による胚) に応用し、この培地がユリの微小幼胚の発育を促すことを認めた(10)。この培地の1つ特徴はN源として無機塩の代わりにアミノ酸を含むことである。筆者はこのことに注目し、胚の栄養源である胚乳中に含まれる遊離アミノ酸の定性・定量分析を行い、これらを胚乳中と同程度に含む合成培地を作成し、幼胚の培養を試みた。

材料及び方法

(A) アミノ酸分析

L. longiflorum 及び *L. ×elegans* それぞれの品種間交配後 40 日の、正常に発育中の胚乳を材料とした。健全に発育中の胚乳のみを選び、実体顕微鏡下で外部組織を完全にはがし取り、胚乳を取り出した (内部の胚はそのままとした)。

1 回の分析に胚乳 0.3 g を供試し、80% エタノールで抽出、クロロホルム添加後の上層を強酸性陽イオン交換樹脂 (Dowex 50) に通してアミノ酸類を吸着分離し、

分析用試料とした(7)。

ペーパークロマトグラフィー：東洋 No. 50, 40×40 cm のろ紙を用い、展開後、0.1% ニンヒドリン (95% エタノール溶液) を噴霧し、95~100℃ 下で呈色反応を行わしめた(8)。

アミノ酸分析計による分析：日立アミノ酸分析計 KLA-2 型を用い、クロマトグラムのピークの位置と吸光特性から定性を、面積から HW 法により各アミノ酸の定量を行った(4)。

(B) アミノ酸を含む合成培地による胚培養

Murashige & Skoog の処方から N 源 (NH_4NO_3 , KNO_3) を除き、 KCl 1400 mg/l を加えた処方に、定量した各アミノ酸をろ過滅菌により添加した。その他の培養条件は胚乳を使用した培養の場合と同様である。

結果

(A) アミノ酸分析

L. longiflorum 及び *L. ×elegans* 胚乳中の遊離アミノ酸の2次元ペーパークロマトグラムは第5図のとおりである。両種ともほぼ同様な様相を呈しているが、標準アミノ酸クロマトグラムの Rf 値、色調の照合、呈色反応、及びアミノ酸分析計による結果との対応により、図中のアミノ酸の他、計 17、及び 16 種のアミノ酸が同定された。同定されたもの以外に、タンパク構成アミノ酸以外のアミノ酸と思われるものが3つ生じた (115℃ の 6 N · HCl-24 hr. 加水分解処理で不消失)。

(B) アミノ酸を含む合成培地による胚培養

アミノ酸分析計による分析結果から算出した両種の各々のアミノ酸の量 (mg/1,000 g) を平均した値 (1 の位を4捨5入) を求め、これを 1 l の培地に添加するアミノ酸量とした (第2表)。これらのアミノ酸を添加した培地を用いて *L. longiflorum* × *L. dauricum* の交雑幼胚 (長さ 0.3~0.4 mm) を培養した結果が第3表である。アミノ酸添加培地においてある程度幼胚の生育率が高められたが、発育パターンは seedling growth 的、あるいは異常発育であった。

考察

球形、未分化のステージにある proembryo を通常の合成培地で培養すると大部分は枯死するか、時に未分化の callus-like body を形成する。この proembryo が分化した胚にまで発育するためには embryo factor の存在が必要で(12)、これはいろいろな胚乳、その他の組織中に含まれていることが認められている(11)。

ユリの胚乳上において幼胚が培養された場合にも、明らかに合成培地に欠けている何らかの embryo factor が胚乳より効果を及ぼし、embryonic growth が誘起され

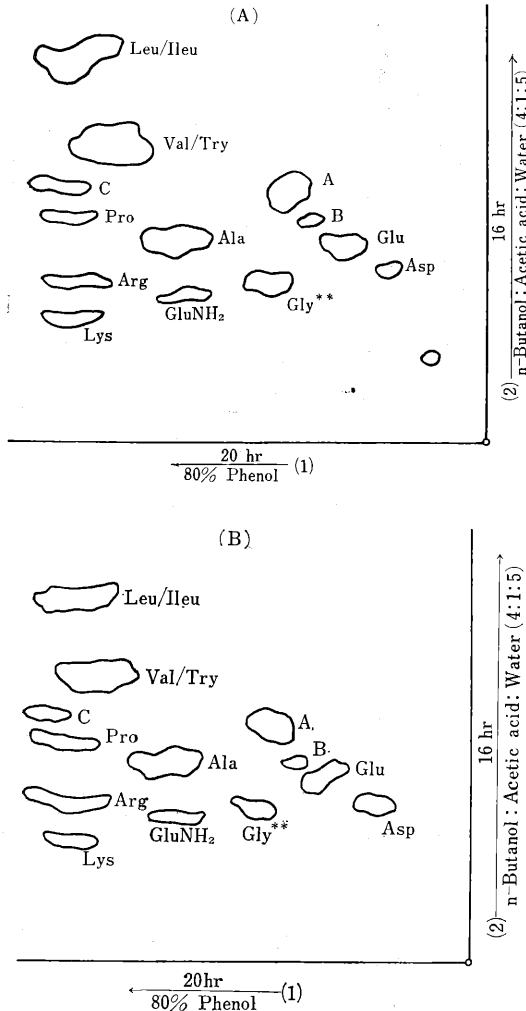


Fig. 5. Two-directional paper chromatogram of free amino acids in the endosperm* (including embryo) of *L. longiflorum*(A) and *L. x elegans*(B).

* 0.3g fresh weight, 40 days after pollination.

**-/Ser (?)

A, B (yellow), C: unidentified spots.

た.

embryo factor の実体として、アミノ酸、リン酸塩による栄養要因と高浸透圧による物理的要因の相互作用(13)、生長調節物質、カゼイン加水分解物に含まれる栄養分などの総合された効果(6)などが考えられており、アミノ酸は embryo factor の構成1要因をなすものと思われる。しかし、アミノ酸を含んだ合成培地上における培養結果は、生育率のある程度の改善を示しながらも胚は seedling growth 的な発育を示しており、これらアミノ酸類がユリ幼胚の発育を促す1要因ながら、embryo factor とは、これに加うる何らかの栄養的、物

Table 2. Amino acid compositions added in artificial medium*.

Amino acid	mg/l
Aspartic acid (Asp)	160
Glutamine (GluNH ₂)	530**
Glutamic acid (Glu)	780
Proline (Pro)	350
Glycine (Gly)	30
Alanine (Ala)	290
Valine (Val)	80
Isoleucine (Ileu)	110
Leucine (Leu)	50
Tyrosine (Tyr)	30
Phenylalanine (Phe)	20
Tryptophane (Try)	100
Lysine (Lys)	60
Histidine (His)	40
Arginine (Arg)	240

* Methionine was omitted.

** The amount of serine was included.

Table 3. Results of the culture of immature hybrid embryos on the medium containing amino acids: *L. longiflorum* × *L. dauricum*, 0.3~0.4mm long. Basic medium of Murashige & Skoog excluding NH₄NO₃ and KNO₃ and including KCl (1,400 mg/l) instead. Incubated at 25°C in the dark for 3 weeks.

medium	No. of embryos planted	nearly seedling growth	abnormally small growth	percentage survival
cont.*	28	2	3	17.9
amino acid medium**	25	3	6	36.0

* MS basic medium+NAA 10⁻³mg/l.

** See Table 2.

理的要因が複合されたものと考えなければならない。

品質間交配後 40 日の胚乳を用いた場合に比べて、交配後 50, 60 日の胚乳を用いた胚培養の場合、漸次その幼胚を發育せしめる能力が低下した(第1表)。 *L. longiflorum* で交配後 40 日と 62 日の胚乳中に含まれる遊離アミノ酸をペーパークロマトグラムで比べてみると、後者では前者に比べ lysine 及び不明スポットが消失し、新たな 1 スポットが生じた。第1表の結果は、種子が完熟に近づくにつれて、胚發育と対応して、これを取りまく胚乳が embryo factor 効果を弱めて行くことを示しているが、この現象は、胚乳中のこれらアミノ酸類の質的变化を含めた栄養的な変化や、固化に伴う物理的な変化などに伴うものと考えられる。

摘 要

I. Nurse tissue としての胚乳の利用

1. 通常の合成培地では培養困難な微小交雑幼胚(長

さ 0.3~0.4 mm) を、正常に発育中の胚乳を nurse tissue として利用し、培養を試みた。

2. 胚乳上に幼胚を置く方法により、培養胚数の約 60% が発育した。

3. 胚の発育パターンは embryonic growth を示し、合成培地上で通常見られる seedling growth と異なり、胚乳中に合成培地に欠けている何らかの embryo factor の存在が示唆された。

II. アミノ酸を含む合成培地上での培養

4. 胚乳中の遊離アミノ酸を定性・定量し、これらを胚乳中と同程度に含む合成培地を作成し、幼胚の培養を試みた。

5. ペーパークロマトグラフィー、アミノ酸分析計の併用により、品種間交配後 40 日の胚乳中に 16~17 種のタンパク構成アミノ酸が定性された。

6. 定量された各アミノ酸を含む合成培地上における培養で、幼胚の生育率はある程度改善されたが、発育パターンは seedling growth 的であり、embryo factor としては未だ他の要因が欠けているものと考えられた。

謝辞 本報告をまとめるにあたり、本学農学部明道博教授に懇切なるご指導を賜わり、同坂村貞雄教授には機器使用上の便宜を賜ったことを記し、深く感謝の意を表す。

引用文献

1. 雨宮 昭. 1964. 植物の胚培養に関する研究とその応用. 植物生理 4: 20—27.
2. 浅野義人・明道 博. 1977. ユリの遠縁種間交雑に関する研究 (第 1 報) 花柱切断授粉法による交配. 園学雑. 46(1): 59—65.
3. 浅野義人・明道 博. 1977. ユリの遠縁種間交雑に関する研究 (第 2 報) 交雑幼胚の培養. 園学雑. 46(2): 267—273.
4. 波田野博行. 1964. アミノ酸自動分析法. 化学同人.
5. MURASHIGE, T. and F. SKOOG. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473—497.
6. 中島哲夫. 1958. 植物の胚培養に関する研究 I. 生長素と embryo factor の関係について. 育種学雑誌 7(3): 161—168.
7. 成田耕造・村上孝天. 1969. クロマトグラフィーの実際 I. 廣川書店.
8. 日本分析化学会北海道支部. 1971. 分析化学実験. 化学同人.
9. PIECZUR, E. A. 1952. Effect of tissue cultures of maize endosperm on the growth of excised maize embryo. *Nature* 170: 241—242.
10. STIMART, D. and P. D. ASCHER. 1974. Culture medium suitable for growing small excised lily embryo. *Lily Yb., N. Am. Lily Soc.* 27: 77—84.
11. 竹内正幸・石原愛也・古谷 力(編). 1972. 植物組織培養. 朝倉書店.
12. VAN OVERBEEK, J. 1942. Hormonal control of embryo and seedling. *Cold Spring Harbor Sym. Quant. Biol.* 10: 126—134.
13. ZIEBUR, N. K., R. A. BRINK, L. H. GROF and M. A. STAHLMAN. 1950. The effect of casein hydrolysate on the growth in vitro of immature *Hordeum* embryos. *Amer. J. Bot.* 37: 144—148.