

リンドウの葯培養による半数性植物体育成

誌名	長野県野菜花き試験場報告
ISSN	02861321
著者	丸田, 一成 松本, 悦夫
巻/号	5号
掲載ページ	p. 51-55
発行年月	1989年3月

リンドウの葯培養による半数性植物体育成

丸田一成・松本悦夫

Induction of Haploid Plants from Anther
Culture in *Gentiana* sp.

Issey MARUTA and Etsuo MATSUMOTO

Summary

We have investigated about anther culture technique in gentian to bring up the haploid plants via embryoid. After sorting the result of the microscopic observation of pollen growing stage in flower bud, the proper length of flower buds for anther culture were decided at the range from 6.0 to 11.0mm. It was found that more than 8.0% of sucrose concentration was necessary for embryoid formation. As the result of testing of some kind of fundamental medium. Nitsch's media (1967) was further fitted to use. A hormonal composition at 2.0mg/l of NAA and 0.5mg/l of Kinetin was more suitable to form embryoids from anthers, on this occasion the embryoid formation efficiency was 15.8%. Solid floating anther culture could improve the efficiency of anther culture.

緒 言

リンドウ (*Gentiana* sp.) は種類が多く (世界に500種以上)、各地で形態、生態型を異にする様々なタイプのものが栽培されているが、品種として固定されているものは極めて少ない。リンドウのF₁育種を遂行していく上で、形質にばらつきの少ない (固定した) 優良な純系母株の獲得が急務である。しかしながら、リンドウの場合、自殖による固定化は株の弱勢化を招くため困難な場面が多い。固定および育種年限の大幅な短縮には半数体の利用が非常に有効である。すなわち半数体の作出が可能となれば、これの染色体倍加により同型接合の二倍体が容易に得られ、自殖世代を省くことができ、さらに遺伝的分離があまり複雑ではないので目標の遺伝子組合せを単離するのに必要な集団を比較的小さくすることもできる。

半数体作出方法には種々の方法があるが、ここでは葯培養による花粉起源半数体の作出をめざした。葯培養による半数体誘導にはカルス経由と胚様体経由の方法があるが、変異が少ない、培養期間が短いなどの利点をもつ胚様体経由の誘導方法の開発を進めた。

材料及び方法

1. 材料

試験場内圃場および茅野市湖東地区の栽培農家圃場より採取した実生4年目の8月上旬咲きリンドウで、いずれも茎長104~108cm、着花段数4~5段のものであった。

2. 花蕾長と花粉ステージ

試験場内で採取したリンドウの花蕾の長さを測定後、それぞれの花蕾の葯内花粉の染色体をフーマー溶液で固定、酢酸カーミン溶液で染色し、顕微鏡下で花粉ステージを観察した。

3. 材料の消毒

開花前の蕾を摘出後、長さ6.0~11.0mmの蕾だけを選別。中性洗剤で洗浄、水道水で水洗後、7%エタノール溶液に2~3秒浸漬後ただちに、2%次亜塩素酸ナトリウム溶液に10分間浸漬した。消毒した蕾はクリーンベンチ内において滅菌水で2~3回すすいだ。

4. ショ糖濃度の影響

Lins maier & Skoog (LS) 基本培地3に0.1あるいは1.0mg/lのオーキシソと0.1mg/lカイネチン

を添加した寒天培地にシヨ糖濃度が3.0%と8.0%の区を設けてシヨ糖濃度について検討した。pHは5.5とした。試験管一本当り培地容量は7mlで、ここに5個の葯(蕾1個分)を置床した。

5. 培養条件

温度25°C、照度50lx、日長16時間に制御したグロースチェンバーで培養した。

6. 培地およびホルモン組成の影響

White (9)およびNitsch (5)の基本培地に10%シヨ糖、および0.1~2.0mg/lの1-naphthaleneacetic acid (略記NAA)と0.1~0.5mg/lのKinetin (KIN)とを組み合わせて添加したpH5.5の寒天培地に葯を置床した。

7. 液体静止葯培養

内径5.5cmのプラスチックシャーレにNitsch基本培地で上記6と同様の糖およびホルモンを添加し、寒天を含まない液体培地をいれた。ここに葯を静かに浮遊させて振とうせずに培養した。シャーレ1枚当り20個の葯(蕾4個分)を置いた。

8. 胚様体育成培地

発育・緑化した胚様体はホルモン無添加のLS培地へ移植した。

結 果

1. リンドウの花蕾長と花粉ステージ

葯培養による花粉起源半数体の作出には、置床する葯内花粉のステージが重要である。すなわち、葯培養に用いる葯は花粉の発育過程のある限られた範囲内でしか培養しても反応しない。どの段階でもよいのではなく通常は四分子期から花粉有糸分裂期直後頃までの花粉を含む葯が培養に適すると言われている(1, 7, 8)。したがって、培養に用いるリンドウの花粉の発育段階を調べておく必要がある。

未熟な葯内で、花粉母細胞は第一分裂・第二分裂(どちらか一方は減数分裂)を経て四分子期(母細胞の分裂は隔壁が不完全で4細胞は密着している)となる。次に4細胞はバラバラとなり一核期と呼ばれる半数性の細胞となる。これはしだいに大きく成長し、つづいて同細胞内で生殖核と花粉管核とに二極化する花粉有糸分裂期を迎え成熟花粉となる(2)。

これら花粉の発育ステージは核染色検鏡で容易に知ることができるので、採取したリンドウの花蕾長別に未熟葯を摘出、葯内花粉のステージを調べた(第1表)。その結果、花蕾長7mm以下では第二分裂後期あるいは、四分子期、8~11mmでは一核期であることがわかった。しかしながら、第二分裂後期と四分子期とは検鏡において判然としないことがあるので、最適置床サイズは花蕾

長6.0~11.0mmと判断した。

2. シヨ糖濃度の影響

細胞、組織の培養では多くの場合光合成を行わないか、行ってもわずかなことが多いので、生育に必要な炭素源を培地に添加しなければならない。最も一般に使用され、また効果のある炭素源はシヨ糖で、3.0%の濃度が普通であるが、葯培養や胚培養では4~15%という高濃度を用いることがある。また葯・花粉培養の場合、糖は炭素源というよりも浸透圧調整剤としての役割が考えられ、高糖濃度で培養するとカルシウムが抑制されて胚の発生が促進されるという報告もある。そこでLS培地にホルモンを種々の濃度で添加しながらシヨ糖濃度について検討した。

シヨ糖濃度3.0%では15%~39%の割合で葯がカルシウム化した。8.0%区では0%~13%の範囲でのカルシウム化するとどまつた。シヨ糖濃度8.0%でIAA 1.0mg/l + KIN 0.1mg/lとNAA 0.1mg/l + KIN 0.1mg/lの区では低率ながら胚様体の形成を観察することができた。リンドウの葯培養においてはシヨ糖濃度を8.0%以上で培養することによってカルシウム化を抑制し胚様体を誘導することが可能であることがわかった。

3. 胚様体形成に及ぼす基本培地とホルモン組成の影響

最適花蕾長とシヨ糖濃度が特定できたので、次にリンドウの葯培養に使用する基本培地およびホルモン組成について検討した。基本培地にはMS(4)、WhiteとNitsch、ホルモンについてはNAAを0.1~2.0mg/lの濃度範囲で、KINは0.1mg/lと0.5mg/lを組み合わせて添加した(第3表)。

MS(データは示さない)、White、Nitschのどのホルモン区においてもカルシウム形成は少なかった。Nitschの培地を基本培地としNAA濃度が高い区でややカルシウム形成率が高くなった。これらのカルシウムは葯壁または花糸(これらの器官は体細胞で染色体数は2n)由来のカルシウムと思われる。White、Nitschでは目的とする胚様体を形成するものが観察された。

胚様体は薄黄緑色で葯壁を突き破るように葯外へ突出してきた。胚様体形成葯数はWhiteよりNitschの培地を使用した場合の方が成績が良好であった。またNitschの培地ではひとつの葯から複数の胚様体を形成することも観察された。ホルモンとしてはNAA 2.0mg/lとKIN 0.5mg/lとを添加した区が胚様体形成率が15.8%と高かった。

4. 液体葯培養

葯培養による半数体作出では、大量の葯を適期に置床できることがその後の品種選抜・育成に重要となる。そのためには葯の置床能率の大幅な改善が必要と考え、葯の液体培養について検討した(第4表)。

通常、植物組織の液体培養では通気のため液体培地を振とうしなければならない。しかし、リンドウの薬は静かに置床すれば培地の表面張力で浮遊させることが可能であり、酸素不足の危険はないと思われるので、振とうはせずに培養することができた。

内径 5.5 cm の滅菌済みプラスチックシャーレに 10 ml 培地を入れ、シャーレ 1 枚当り 20 個の薬を置床することができた。したがって、液体培養は置床に要する時間と培地量を大幅に節約することが可能となった。

培地は Nitsch を使用し、ホルモンは 3 の試験と同様の区を設け、寒天による固体培養と比較した (第 4 表)。大量の薬を置床できたのでデータにバラツキが少なかった。胚様体形成はほとんどすべての区で観察できた。胚様体形成率は固体培地と同様に NAA 2.0 mg/l を添加した区が良く、11~12%であった。培地を固体から液体へ変更した場合、もっとも顕著に変化したのは胚様体数であった。液体培地の場合ひとつの薬から多くの胚様体が得られるようになり、最大で 7 個の胚様体を得た。

第 1 表 リンドウの花蕾長と花粉ステージ

花蕾長 (mm)	花粉ステージ						
	1	2	3	4	5	6	7
5	1 (コ)						
6	3						
7		2					
8	1	1	1	1			
9		1			2		
10			3	2	1		
11				1			
12					1	1	2

(注) 花粉ステージ

- 1: 第二分裂後期
- 2: 四分前期
- 3: 一核期初期
- 4: 一核期中期
- 5: 一核期後期
- 6: 花粉有糸分裂期
- 7: デンプン沈着開始 (硬質化)

第 2 表 胚様体形成に及ぼすショ糖濃度の影響

ホルモン濃度 (mg/l)			ショ糖濃度	置床薬数	カルス形成薬数	胚様体形成薬数	胚様体数	胚様体形成率
I AA	NAA	K IN						
0.1	0	0.1	3.0%	40	6	0	0	0%
0.1	0	0.1	8.0	40	0	0	0	0
1.0	0	0.1	3.0	35	8	0	0	0
1.0	0	0.1	8.0	40	3	1	3	2.5
0	0.1	0.1	3.0	35	11	0	0	0
0	0.1	0.1	8.0	45	2	1	1	2.2
0	1.0	0.1	3.0	51	20	0	0	0
0	1.0	0.1	8.0	45	6	0	0	0

第 3 表 ホルモン組成の胚様体形成に及ぼす影響

基 本 地	ホルモン濃度 (mg/l)		置床薬数	カルス形成薬数	胚様体形成薬数	胚様体数	胚様体形成率
	NAA	K IN					
White (寒天)	0.1	0.1	47	0	0	0	0%
	0.1	0.5	45	1	2	2	4.4
	0.5	0.1	43	0	0	0	0
	0.5	0.5	48	2	0	0	0
	1.0	0.1	48	3	1	1	2.1
	1.0	0.5	43	0	0	0	0
	1.5	0.1	48	0	1	1	2.1
	1.5	0.5	43	0	0	0	0
	2.0	0.1	49	1	0	0	0
	2.0	0.5	41	1	1	2	2.4
Nitsch (寒天)	0.1	0.1	47	1	0	0	0
	0.1	0.5	49	0	0	0	0
	0.5	0.1	47	0	0	0	0
	0.5	0.5	47	1	1	2	2.1
	1.0	0.1	45	3	1	1	2.2
	1.0	0.5	46	4	1	2	2.2
	1.5	0.1	46	4	2	3	4.3
	1.5	0.5	39	3	0	0	0
	2.0	0.1	49	6	3	6	6.1
	2.0	0.5	19	7	3	4	15.8

第4表 液体薬培養の胚様体形成に及ぼすホルモン組成の影響

基 本 地	ホルモン濃度 (mg/l)		置 床 薬 数	生 存 薬 数	胚 様 体 形 成 薬 数	胚 様 体 数	胚 様 体 形 成 率	平均胚 様 体 長
	N A A	K I N						
Nitsch (液 体)	0.1	0.1	100	29	3	8	3.0%	2.1 mm
	0.1	0.5	100	36	9	26	9.0	1.3
	0.5	0.1	100	19	6	20	6.0	1.7
	0.5	0.5	100	54	0	0	0	—
	1.0	0.1	100	27	2	9	2.0	2.3
	1.0	0.5	100	27	1	1	1.0	3.8
	1.5	0.1	100	28	3	13	3.0	0.5
	1.5	0.5	100	38	5	9	5.0	2.7
	2.0	0.1	100	45	12	26	12.0	1.9
Nitsch (寒 天)	2.0	0.5	100	37	11	29	11.3	2.7
	2.0	0.5	100	48	4	29	10.0	4.1

考 察

われわれは圃場において成群集団選抜および交配組み合わせの両方法により切花リンドウの新品種育成に努力している。さらに最近の細胞工学的育種法のいくつかをこれに導入し、いっそうの効率化を図っている。細胞工学的育種法のうち薬培養では花粉由来の半数体を作成することができ、半数体は薬剤処理により二倍体に倍加させることができる。このような人為倍加を経た植物体は遺伝子型においてホモ（同型接合）すなわち純系である。育種において純系を求めることは重要であるが、本来他殖性であるリンドウでは自殖による純系獲得が困難を極めている。リンドウ育種に薬培養を利用することは大いに価値ありと考えた。

薬培養はすでにいくつかの作物で成功例が報告されているが、リンドウ科では皆無であった。他作物の例を参考に試験を開始した。薬培養による半数体育成にはカルス経由と胚様体経由の二つの方法が知られている。カルス経由では誘導されたカルスが花粉 (n) 由来なのか葯壁 (2n) 由来なのかの区別が困難な場合が考えられ、またカルスから変異のない植物体への再分化培養系の開発が必要となる。一方、胚様体は一個の花粉が分裂し胚発生過程を経て幼植物となるので100%花粉細胞由来の半数体と考えられており、また再分化培養をすることなく植物体を得ることができる。さらにカルス経由に比較して胚様体経由の方が一般に培養期間が短いという利点もあり、試験にあたっては、胚様体形成率に注目した。

葯・花粉培養においては、培養開始時の花粉ステージが重要である。目的が半数体作出であるから葯内花粉はnでなければならない。ひとつの花粉母細胞 (2n) は2回 (このうちのどちらか1回が減数分裂) の細胞分裂により四分子期細胞 (n) となる。(2)。したがって、

四分子期以降の花粉細胞を培養しなければ意味がない。四分子期細胞はその後、四つの独立した細胞 (一核期) となり、発育を続け (一核期前期・中期・後期)、花粉有糸分裂 (生殖核と花粉管核とに分裂) の後、デンプン沈着し硬質の成熟花粉となる。花粉からの胚発生は花粉有糸分裂後に生殖核あるいは花粉管核のどちらか一方が連続分裂して半数胚を形成する (6)。したがって、花粉有糸分裂直後までの花粉を培養する必要がある。花粉のステージは蕾の大きさと密接な関係にあるので、どの範囲の大きさの蕾より摘出した葯が培養に適するかを決定することによって効率的に半数体を得ることができる。われわれは第1表の観察から置床最適葯は花蕾長が6.0~11.0 mmの時の葯と判断した。

培地のショ糖濃度は通常的大量増殖に用いられている濃度と同様の3.0%の濃度が他作物の薬培養系において使用されている。しかしアブラナでは10.0%、テッポウユリでは12.0%という高濃度のショ糖を添加することで高率で胚様体を誘導した例が知られている(1)。リンドウの薬培養系においてわれわれはショ糖濃度8.0%で良好な結果を得た。このショ糖濃度については、まだ試験していないがもう少し高くしてもよいと思われる。現在では10.0%のショ糖を添加して、よい成績をあげている。また、ショ糖は浸透圧調節剤として機能している可能性もあるので、今後、各種の浸透圧調節剤を供試する必要があると思われる。

薬培養の基本培地は半数性細胞に特有というわけではなく、多少の工夫はあるものの基本的には体細胞培養の培地と同様の組成である。薬培養には今回試験した三種類の基本培地のほかにハイボネックス、L S, Miller、Chu が多く用いられている。これらの基本培地を用い、Nitsch以上の成績が得られるかどうかの検討も今

後必要と思われる。

薬培養の培地においてカルス経路の場合、比較的高濃度のホルモンを添加し、胚様体経路の場合は比較的低濃度のホルモンを添加するかあるいは無添加の培地が使用されている(1)。他の作物における胚様体誘導に成功した培地をみると、オーキシンは0~2.0 mg/l、サイトカイニンは0~4.0 mg/lの濃度範囲で添加されている。リンドウにおけるわれわれの実験結果も他作物と同様の濃度範囲であった。

以上の方法で、確率は今のところ低い、発根・馴化に成功した十数個体について、その根端の巨大細胞の顕微鏡観察により染色体数の確認を試みた。リンドウの染色体は容易に染色できたが正確な計数には至っておらず、今回は発表を控えた。この点を早急に解決し、リンドウの薬培養個体の半数性を検討する必要がある。また、胚様体からの再分化、および植物体の馴化・育成にはいくつかの困難な過程があり、培養体を交配育種に組み込むには数量の面で大幅に不足しているのが現実である。

半数体育種には相当数の半数性植物体が必要であるので作業の効率を向上しなければならぬ。この点第4表で試行した液体培養は、作業時間短縮に寄与しており、有望である。さらに、この液体薬培養は花粉培養の可能性をも示唆しており、今後リンドウの花粉培養についても検討するつもりである。

摘 要

リンドウの胚様体経路半数体育成のために薬培養技術を検討した。花蕾の花粉発育段階の顕微鏡観察より薬置床適期は花蕾長が6.0~11.0 mmの時と定めた。胚様体形成には少なくとも8.0%以上の濃度のショ糖が必要であることが判明した。数種の基本培地を検討した結果、Nitsch(1967)の培地がもっとも適していた。NAA 2.0 mg/l、Kinetin 0.5 mg/lのホルモン組成が最適で、この時の胚様体形成率は15.8%であった。液体浮遊薬培養によって薬培養効率を向上させることが可能となった。

謝 辞

本研究を進めるに当たり、終始助言をいただいた野菜花き試験場の前花き部長成沢久氏、および、塚田晃久花

き部長、小林隆主任研究員に深く感謝申し上げる。

また貴重な御示唆をいただいた野菜花き試験場大谷英夫場長および農業大学校大塚文夫教授に厚く御礼申し上げます。

さらに、本研究の各実験において農業大学校指導学部専攻科の白鳥吉徳氏の協力を得ました。ここに深く感謝いたします。

引用文献

1. 原田宏・駒嶺穆, 1979. 植物組織培養, 理工学社, 東京
2. 岩波洋造, 1964. 花粉学大要, 風間書房, 東京
3. LINSMAIER, E. M., SKOOG, F. 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 18: 100~127
4. MURASHIGE, T., SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473~497
5. NITSCH, C., NITSCH, J. P. 1967. The introduction of flowering in vitro in stem segments of *Plumbago indica* L. I. The production of vegetative buds. *Planta*, 72, 355~37
6. REINERT, J., BAJAJ, Y. S. P. 1977. Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture. Springer-Verlag, Berlin, 251~267
7. SUNDERLAND, N. 1973. Plant tissue and cell culture. Street, H. E., ed., Blackwell Sci. Pub. Oxford, London, Edinburgh, Melbourne. 205~239
8. SUNDERLAND, N. 1974. Haploids in higher plants. Advanced and potential. Kasha, K. J., ed., Univ. Guelph, Guelph, 91~122
9. WHITE, P. R. 1963. The cultivation of animal and plant cells. New York, Ronald Press.