



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	園芸作物のやく培養に関する研究：（第3報）アスパラガスのやくからのカルス誘導について（2）
Author(s)	稲垣, 昇; INAGAKI, Noboru; 原田, 隆 他
Citation	北海道大学農学部邦文紀要, 11(4), 386-392
Issue Date	1979-11-12
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/11934
Type	departmental bulletin paper
File Information	11(4)_p386-392.pdf



園芸作物のやく培養に関する研究

(第3報) アスパラガスのやくからのカルス誘導について (2)

稲垣 昇・原田 隆・八鍬利郎

(北海道大学農学部果樹蔬菜園芸学講座)

(昭和54年8月25日受理)

Studies on the Anther Culture of Horticultural Crops

(III) Callus formation from the anthers of asparagus (2)

Noboru INAGAKI, Takashi HARADA
and Toshiro YAKUWA

(Laboratory of Horticultural, Faculty of Agriculture,
Hokkaido University, Sapporo, Japan)

緒 言

やく培養により、花粉から半数体植物および半数体植物の倍化した純系二倍体植物を得る経路として、(1)花粉が直接不定胚を形成し植物体に生長する場合と、(2)花粉がカルス化し、これらのカルスから器官分化がおり、植物体に生長する場合の二つが知られているが、アスパラガスにおいては現在のところ後者の経路が知られているのみである。

前報(10)において、筆者らは、やくからのカルス形成に影響をおよぼす培養条件について検討した結果を報告した。

本研究では、前報で得られた実験結果をもとに、やくの発育度とカルス形成との関係およびカルス形成における品種間の比較について検討を加えるとともに、培養初期の花粉の形態的变化について観察し、若干の知見が得られたのでその結果について報告する。

実験材料および方法

北海道大学農学部附属農場(実験I, II, IV)および農林水産省北海道農業試験場(実験III)に栽植してあるアスパラガスのつぼみから取ったやくを用いた。つぼみの表面殺菌は、70%エタノールに3~5分間浸漬処理したのち、滅菌水で数回洗浄して行なった。その後無菌的に取り出したやくを100 ml容三角フラスコに25 ml分注した寒天培養基上に5個ずつ置床した。各実験に用いた組織片数は一区当たり50個とした。培地はMurashige

Skoog (MS) の処方による無機塩類に塩類チアミン0.1 mg/l, ニコチン酸0.5 mg/l, 塩酸ピリドキシン0.5 mg/l, グリシン2.0 mg/l, ミオ・イノシトール100 mg/lおよび寒天6.0 g/l添加したものをを用い、糖はグルコース20 g/lを添加した。pHは寒天を添加する前に5.5に調整した。培養基の殺菌は120°C, 1 kg/cm²の条件下で5分間行なった。培養は25~27°C, 4,000 lux(白色蛍光灯使用), 16時間照明8時間暗黒下で行なった。やくから形成されたカルスの大きさはつぎに示す指数で表わした。

0:カルス形成なし, 0.1:わずかにカルス形成を認む, 0.5:やくとほぼ同じ大きさ, 1.0:ナタネ粒大, 1.5:コム粒大, 2.0:アズキ粒大, 3.0:ダイズ粒大, 3.0以上の場合は同様の増大率で指数を定めた(例; 4.0:ダイズ粒の2倍の大きさ, 5.0:ダイズ粒の3倍の大きさ)。

実験はつぎの4項目について行なった。

実験I: つぼみおよびやくの大きさと花粉の発育度

'Mary Washington 500'を用いて、つぼみおよびやくの縦径を解剖顕微鏡下で経時的に測定した後、やく内の花粉の発育度を観察し、その関係を調べた。花粉の観察はカルノアの酢酸・アルコール液(3:1)で12時間固定後、酢酸オルセイン染色液で染色して行なった。また花粉およびやく組織中のデンプン粒の検出はヨード・ヨードカリ反応およびPAS反応によって調べた。

実験II: やくの発育度とカルスの形成

'瑞洋', 'Viking', 'Grüne Krone'および'KBF×3-9'の3品種, 1系統の1~5 mmのつぼみを1~1.5 mm, 2~2.5 mm, 3~3.5 mmおよび4~5 mmの4段階に分けて

採取し、それぞれのつぼみから取り出したやくを BA 1.0 mg/l および NAA 3.0 mg/l を含む培養基上で培養し、やくの発育度とカルス形成との関係調べた。

実験 III：やくからのカルス形成における品種間比較

1975 年および 1976 年の 2 年間に亘り 'Eden', 'Gold-schatz', 'Grüne Krone', 'MW 500' 'MW 500 W', 'Ruhm von Braunschweig', 'Viking', '瑞洋' の 8 品種および '#873', 'KBF×3-9' 'N・J264', 'N・J322' の 4 系統を用いて各々のカルス形成能について調べた。培養したやくは花粉四分子期から一核期にあたる時期のものでつぼみの大きさは各品種とも 2 mm である。このほか、上記の品種について行なった他の実験結果も参考にし、各品種のカルス形成能について比較検討した。

実験 IV：培養やくの組織学的観察

培養中のやくおよびやく由来カルスを押しつぶし法の場合、固定はカルノアの酢酸・アルコール (3:1) 液で 12 時間処理を行ない、フェールゲン染色を行なった。パラフィン切片法の場合の固定は、ホルマリン、酢酸・アルコール (ホルマリン 5: 酢酸 5: 70% エタノール 90) で 24~48 時間処理を行ない、常法によりパラフィン切片を作製し、マイヤーの酸性ヘマラウン染色液を用いて染色した。

実験結果

実験 I：つぼみおよびやくの大きさと花粉の発育度

Fig. 1 に示すとおり花粉母細胞期のつぼみの長さは 0.7~0.8 mm、やくの長さは 0.4~0.5 mm で開花前 12~13 日にあたり、やくは緑色で水分に富んでいる。つぼみおよびやくの発育肥大は花粉一核期ごろまで平行に進み、その後つぼみの長さは等比級数的に増加するが、やくの伸長は花粉一核期初期~花粉一核期後期および花粉二核期~成熟期の時期に盛んで、他の時期はゆるやかである。なお、一核期後期ごろから花糸が著しく伸長する。花粉の生長 (花粉核の分裂、花粉の容積増大) が盛んな時期はやくの伸長も盛んであった。花粉内のでん粉は花粉一核期の中ごろではみられず、その後観察されたが開花前日から減少し、開花当日には消滅した。やく組織におけるでん粉粒の蓄積は胞原母細胞期に観察されそれ、以後は観察されなかった。やくの裂開はつぼみの長さが 5 mm に達して開花したときにおこり、この時期の花粉では生殖核の分裂が観察された。

実験 II：やくの発育度とカルスの形成

Fig. 1 から、実験に用いた 1~1.5 mm, 2~2.5 mm,

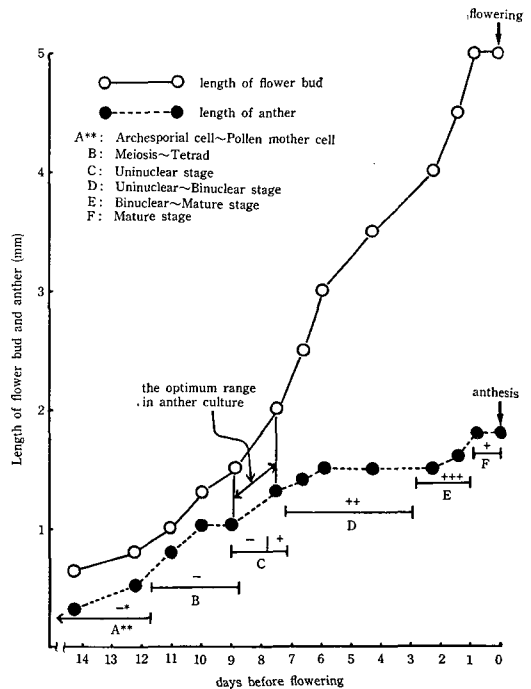


Fig. 1. Changes in length of flower bud and anther, developmental stage of pollen and existence of starch in pollen

*The degree of starch accumulation was shown as following

- : no starch accumulation
- + : a trace accumulation
- ++ : fairly accumulation
- ### : good accumulation

3~3.5 mm および 4~5 mm の長さのつぼみはそれぞれ減数分裂期~花粉四分子期、花粉一核期、花粉一核期~花粉二核期および花粉成熟期の発育度に相当するやくであることがわかる。やくの発育度とカルス形成率との関係は Fig. 2-1~4 に示すとおりで、用いた 4 品種すべてにおいて、花粉四分子期から花粉一核期のやくのカルス形成率が最も良好で、花粉の発育が進むに従って形成率が低下し、花粉成熟期のやくが最も低かった。やくからのカルス形成率および形成されたカルスの生長には品種による差が見られ 'KBF×3-9' が最も劣っていた。また、やくから形成されたカルスにおける品種間および各発育度の間での肉眼的な観察による形態的な差異はほとんど見られなかった。なお、カルスを形成しなかったやくのうち、花粉成熟期のやくはすべて退色したが、他の発育度のやくは 'Viking' の 3~3.5 mm のつぼみのやく

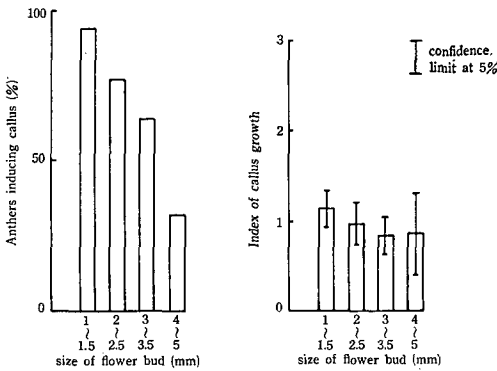


Fig. 2-1. Callus induction and its growth in anthers at various developmental stages. (incubated 6 weeks at 25-27°C, cz: Zuiyo)

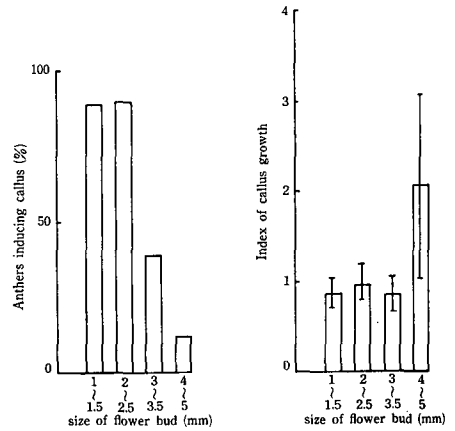


Fig. 2-3. Callus induction and its growth in anthers at various developmental stages. (incubated 6 weeks at 25-27°C, cv: Grüne Krone)

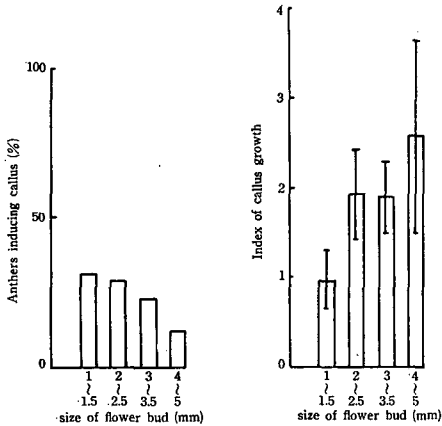


Fig. 2-2. Callus induction and its growth in anthers at various developmental stages. (incubated 6 weeks at 25-27°C, cv: Viking)

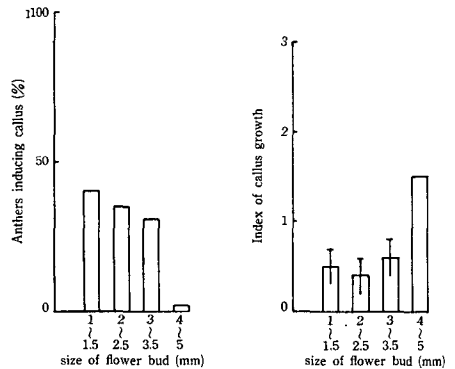


Fig. 2-4. Callus induction and its growth in anthers at various developmental stages. (incubated 6 weeks at 25-27°C, strain: KBFx3-9)

が退色したほかはすべて褐変した。これらの褐変したやくはカルス形成の有無にかかわらず、置床後1~2日目に黄緑色となり1週間後ころから褐変しはじめた。

実験 III: やくからのカルス形成における品種間比較

1975年および1976年に行なった8品種4系統についての品種比較試験の結果および上記品種を用いた他の実験結果も加えてカルス形成に関する成績を一つの表にまとめたのが Table 1 である。この表をみると、カルスがまったく形成されなかった品種、系統はみられないことから、各品種、系統がやくからのカルス形成能を持っていることがわかる。また、カルス形成率は年により、実験によって同一品種でもかなりの幅がみられ、同

一実験内でみるときは品種間にも差がみられるが、その傾向は年によって異なる品種もあるので、1回の結果のみでその品種の特性を判断するのは適当ではない。Table 1 の成績の範囲で比較すると、'Goldschatz', 'Grüne Krone' '瑞洋' などは各実験とも形成率が高く、'KBFx3-9', 'N-J322' などは各実験とも形成率が低く、また 'Viking', 'MW 500', 'Ruhm von Braunschweig' などは実験により形成率が大きく異なった。

形成されたカルスの生長については、品種によって生長速度に若干の差がみられたが、いずれの品種のカルスも分化用培地に移植するに十分な大きさにまで生長した。

Table 1. Callus induction and it's growth in anthers of various varieties (I) or strains (II)

Variety (I) or Strain (II)	Experiment I		Exp. 2		Exp. 3		Exp. 4	
	Anthers inducing callus (%) (A)	the degree of callus growth (B)	(A)	(B)	(A)	(B)	(A)	(B)
Ruhm von Braunschweig	0	—	76 (38/50)	##				
Goldschatz	95 (20/21)	##	77 (30/39)	##				
MW 500	48.7 (19/39)	++	31 (14/45)	##	69 (45/65)	##		
(I) MW 500 w	17 (7/41)	++	86.5 (45/52)	##				
Zuiyo	6.12 (3/49)	+	83.3 (35/42)	##	76 (33/43)	##	90 (45/50)	##
Eden	30.5 (11/36)	##	28.5 (10/35)	##				
Grüne Krone			90.7 (49/54)	##	90.2 (46/51)	##	62.5 (15/24)	
Viking	95 (38/40)	##			39 (13/33)	##		
(II) KBFX 3-9	11.5 (3/26)	##	10 (5/50)	++	35 (14/40)	+		
NJ 264	70.4 (31/44)	##	52 (26/50)	##				
NJ 322	22.5 (7/31)	++	40 (14/35)	+				
# 873	77 (20/26)	++	2 (1/50)	++				

Sign means the degree of callus growth.

— : no callus growth, + : a trace, ++ : good, ## : Excellent

実験 IV： 培養やくの組織学的観察

やくからのカルス形成は肉眼的には、やく置床後1週間ごろから始まり、ほぼ3~4週間ではほとんど完了する。しかし、なかには数か月を経てからカルスを形成するやくもある。培養1週間ほどでカルス形成を行なうやくは、やく組織全体をつつむようにカルスが生長する(Plate I-1)。このようなカルスを形成したやくの内内部を観察するとやく組織がカルス化している様子が認められたが、これらのカルスはその後褐変して生長を停止するものと、生長を続けるものとに分かれ、カルス生長を続けるものはやく内の花粉も脱分化しつつあった(Plate I-2)が、これらの花粉がカルス化していく様子は本実験では追跡できなかった。また2~3週間前後でカルス形成を行なうやくでは培養条件の如何にかかわらずやく組織は褐変し、やくの側部(Plate I-3-5)またはやくの上部中央部(plate I-6-8)からカルス形成が行なわれた。これらのタイプに属するカルスの中で最も花粉起源の可能性のあるのはやくの側部から形成されたカルスで、これらのカルスの内部を調べるとやく室内でカルス化していることが認められた(Plate II-1-4)。このようなやくの内内部ではタベート組織は完全に崩壊しているため、タベート組織はカルス形成には関与しないものと考

えられる。また、やく壁組織の細胞は培養時は2層の細胞で構成されているが、カルス形成時には数層の細胞になっていて、明らかに数回分裂をくり返したものと思われる。しかし褐変したやくはそれ以上の分裂は認められなかった。これらのカルス形成が認められる前のやくの内部を観察すると、やく置床後すでに2~3日で花粉の脱分化が認められる。四分子期から一核期のやく内内部では、一核期の花粉核の等分裂が認められ、これらが2核細胞または2細胞に脱分化しているのが観察された(Plate I-2)。さらにこれらの細胞が多核化または多細胞化していることも観察された(Plate II-5-6)。また、なかには不定胚形成の初期段階の球状胚に似た形態の花粉も観察された(Plate II-7)。現在のところ、これらの花粉がどの程度カルス化するのか、また肉眼的に観察されたカルスはこれらの花粉が脱分化して形成されたものか否かは速断できないが、その可能性は充分考えられる。また、カルス細胞の染色体数を調べると、半数性の細胞はほとんど認められず、2n以上の染色体数をもった細胞が大部分であり、カルス形成の非常に早い時期から3n, 4nあるいはそれ以上の染色体数をもった細胞が数多く観察された。これらの事実はカルス形成の早い時期に染色体の倍化や核の融合が行なわれていることを示し、半数性

細胞の確認を一層困難にしているものと考えられる。

考 察

実験 I, II および III において, アスパラガスは各品種ともやくからのカルス形成能を有することが確認された。また, イネ・トマト・タバコ・ジャガイモなど (2, 3, 5, 6, 7) と同様に花粉四分子期から花粉一核期にかけての発育度のやくが最も高いカルス形成率を示した。この結果は第1報 (9) の成績とも一致する。実験 IV の組織的観察によると, この時期にはやくのタペート組織が充実しており, 花粉への養分供給が盛んに行なわれている時期である。そしてこの時期の花粉にはでん粉粒も見られず代謝活性の高い時期にあたるものと思われる。培養やくのタペート組織はやく置床後1週間以内ですでに崩壊しており, タペート組織からのカルス形成は認められなかった。したがってこの発育度において花粉以外のやく組織からのカルス形成の可能性としては, 花糸と連絡しているやく組織の維管束部位が考えられ, 左右のやく室の間から形成されたカルスはその可能性がある。しかしやくの側部から形成されたカルスは明らかにやく室内の花粉がカルス化して露出してきたものと考えられ, PELLETIER らのアスパラガスのやく培養の実験においてもこれらのカルスを花粉起源とみている (8)。今後は, 形成部位を異にしたカルスをそれぞれ分離して検討することが重要である。また従来, 培養が困難であるとされてきた花粉成熟期のやくでも, ほとんどの品種, 系統でカルス形成が可能であった。この時期のやくは開やく直前でやく室内の水分も低くやく組織からの花粉への養分の供給はほとんどないものと考えられる。この時期の花粉は非常に薄く染色される栄養細胞と, 分裂中の染色体数の確認が容易な生殖細胞が観察され, またデンプン粒の蓄積も観察された。この時期の培養中のやくにおいて, カルスを形成する場合やくは様に褐変するが, カルスを形成しないやくはすべて退色し, カルスを形成しないやくも褐変する花粉一核期のやくと異なっていた。開花直前のやくはやく組織の分裂活性が非常に低いことから考えて, 花粉成熟期のやく培養によって花粉起源のカルスが形成される可能性が高いものと考えられるので今後この時期のやくを培養するとともに, これらを花粉四分子期から花粉一核期にかけての培養やくと比較検討することが必要である。

やくから形成されたカルスの性状についてみると, 光の強さによって差がみられ, 光の強い条件下では水分の乏しい compact な緑色のカルスが見られ, 光の弱い条

件下ではクロロフィルの乏しい水分の豊富な黄色～黄白色の compact なカルスと Friable なカルスがみられるが, これらのカルスを組織学的にみると, compact なカルスはカルスの生長部位が表面付近に限られ, 内部は肥大した細胞群からなり, 分裂中の細胞はみられなかったが一部に木部の分化が観察された。一方, Friable なカルスはカルス内に高い分裂能をもった細胞群が多数存在し, これらの細胞群は容易に分離することが可能であった。しかし compact なカルスと Friable なカルスは分割して培養条件を変えて培養することによって相互に変わりうるものが観察された。

やくからのカルス形成において品種および系統間で差が認められたが, 同じアスパラガスを用いた Dore (1) らの5品種を用いたやく培養によっても品種・系統間で差が認められたことを報告している。またこのような品種間差はイネ (5) やタバコ (7) やジャガイモ (2)・トマト (3) など他の作物でも認められ, カルス形成に遺伝的要因が関与している可能性を示唆している。アスパラガスの各品種・系統のやくから形成されたカルスの性状には明瞭な違いは認められず, カルスの性状の違いは培養条件 (光・温度・培地の硬さなど) に依存しているものと思われる。

本実験で供試したすべての品種・系統でカルスが形成されたことから, アスパラガスにおいてはやく培養によって多くの品種から植物体を得ることが可能であると考えられる。

摘 要

アスパラガスのやくからのカルス形成率およびカルスの生長におよぼすやくの発育度の影響について調べ, さらにやくからのカルス形成についていろいろな品種を用いて検討した。また培養初期のやくの組織学的観察を行ない, カルスの起源について検討した。

(1): つばみおよびやくの大きさと花粉の発育度

やくの大きさは花粉母細胞期から花粉四分子期ごろまではつばみの中の大部分を占め花糸は非常に短いが, 花粉が発育するに従いやくの伸長はゆるやかであるが, つばみの伸長および花糸の伸長は増加する。やくからのカルス形成に好適なつばみの長さは1.5~2 mmで, これは花粉四分子期から花粉一核期初期に相当する。

(2): やくの発育度とカルス形成

‘瑞洋’, ‘Viking’, ‘Grune Krone’ および #873 の品種1系統の発育度の異なるやくを BA 1.0 mg/l および NAA 3.0 mg/l を添加した M・S 培地で 25°C, 4,000 lux,

1日16時間照明下で培養した結果、各品種・系統とも4分子期から花粉一核期のやくが最も高いカルス形成率を示し、花粉成熟期のやくが最も低いカルス形成率を示した。

(3): やくからのカルス形成における品種間比較
 'Eden', 'Goldschatz' 'Grüne Krone', 'MW 500', 'MW 500 W', 'Ruhm von Braunschweig', 'Viking', '瑞洋', # 873, KBF×3-9, N・J 264, N・J 322 の8品種・4系統の花粉一核期のやくを BA 1.0 mg/ℓ および NAA 3.0 mg/ℓ を添加した M・S 培地を用いて 25°C, 4,000 lux, 1日16時間照明下で培養した結果、いずれにおいてもカルス形成が認められ、それぞれの間においてカルス形成率に差が認められた。

(4): 培養やく組織およびやくから形成されたカルスの組織学的観察
 やく置床後3~4日目でやく内の花粉の脱分化が観察された。また、培養1週間後にはやくからのカルス形成が認められた。培養初期のやく内の花粉には2細胞、4細胞および多細胞化した花粉や2核細胞、4核細胞および多核細胞化した花粉が観察され、これらの花粉がカルス細胞となってやく壁組織から露出したと考えられるカルスが観察された。やくから形成されたカルスの染色体数をみると、半数体はほとんどみあたらず、2倍体、4倍体およびそれ以上の倍数体や異数体が観察された。

引用文献

1. DORE, C.: Production de plantes homozygotes mâles et femelles à partir d'anthers d'asperge, cultivées in vitro (*Asparagus officinalis* L). *C. R. Acad., Sc. Paris*, 278. 2135-1238. 1974
2. DUNWELL, J. M. and SUNDERLAND, N.: Anther culture of *Solanum tuberosum* L. *Euphytica*. 22: 317-323. 1973
3. GRESSHOFF, P. M. and DOY, C. H.: Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum* (Tomato). *Planta*. 107: 161-170. 1972
4. 三位正洋: 花粉からの半数体育成に関する研究.
 1. タバコの幼植物形成と花粉のステージとの関係ならびに胚状体形成過程, 育種. 23: 27-34. 1973
5. NIIZEKI, H. and K. OONO: Induction of haploid rice plant from anther culture. *Proc. Japan Acad.* 44: 554-557. 1968
6. 新関宏夫・大野清春: イネの薬培養による半数体植物の育成. 育種, 18 (別冊): 57-58. 1968
7. NITSCH, J. P., NITSCH, C. et HANON, S.: Ré-

- alisation expérimentale de l' ((androgonèse)) chez divers *Nicotiana*. *C. R. Acad. Paris*, 162, 369. 1968
8. PELLETIER, G., RAQUIN, C. et SIMON, G.: La culture in vitro d'anthers d'Asperge (*Asparagus officinalis* L). *C. R. Acad. Sc. Paris*, 274, 848-851. 1972
9. 八敏利郎・原田 隆・稲垣 昇・志賀義彦: 園芸作物のやく培養に関する研究 (第1報). アスパラガスのやく培養におけるカルスの誘導と器官分化, 園学雑, 41: 272-280. 1972
10. 稲垣 昇・原田 隆・八敏利郎: 園芸作物のやく培養に関する研究 (第2報). アスパラガスのやくからのカルス誘導について (1), 園学雑 (投稿中)

Summary

The relationship between callus formation from anthers and developmental stages of anthers, and the varietal differences in callus formation were investigated. Also, in order to detect the origin of callus obtained from anther cultures, histological observation of cultured anthers and anther-derived callus was carried out.

The results obtained were summerized as follows:

1. Relationshis between sige of flower buds and anthers and developmental stages of pollens.
2. Relationship between callus formation and developmental stages of anthers.
 Anthers at various developmental stages were cultured on MS medium containing 1.0 mg/ℓ BA and 3.0 mg/ℓ NAA. Three varieties and a strain were used in this experiment. The percentage of anthers producing callus was the highest in anthers at the tetrad to the uninuclear stage and the lowest in anthers at the mature etage in all the varieties and strain used.
3. Varietal difference in callus formation from anthers.
 Anthers at uninuclear stages of 8 varietirs and 4 strains were cultured on MS medium containing 1.0 mg/ℓ BA and 3.0 mg/ℓ NAA. In all the varieties and strains used, callus fromation was done, and varietal difference in callus formation was observed.
4. Histological observation of cultured anthers and anther-derived callus.

Within 3 to 4 days after anthers were cultured, pollen differentiation was observed. After a week of incubation, callus formation from anthers was observed. In the early stage of the anther culture, pollens divided into 2 to 4 cells or 2 to 4 nucleate cells, and those cells grew to multicells or multinuclear cells respectively. Callus expos-

ured from anther loculus was considered to be pollen-derived callus according to above observation. Within callus cells obtained, haploid cells were hardly observed, and most of callus tissues were consisted of diploid cells. Tetraploid or more cells were also observed in callus tissues.

Explanation of Plates

- Plate I.**
1. Callus growing around the anther tissue.
 2. Pollens dedifferentiating inside the anther.
 3. Callus induced at the end of the anther tissue.
 4. Longitudinal section of the anther tissue shown in plate I-3.
 5. Callus induced at the side of the anther tissue.
 6. Callus induced at the end and the central part of the anther tissue.
 7. Callus induced at the central part of the anther tissue.
 8. Cross section of callus shown in plate I-7.
- Plate II.**
- 1-4. Callus produced inside the anther.
 - 5-7. Pollen dedifferentiation.
 5. Pollen growing to multicells.
 6. Pollen growing to multinucleate cells.
 7. Globular embryo like pollen observed in the early stage of the anther culture.

