



Title	植物の培養細胞に関する研究 : 第1報 Micromelilotus 亜属のカルスの誘導と育成に関する種間差異
Author(s)	前川, 雅彦; MAEKAWA, Masahiko; 上原, 由里 他
Citation	北海道大学農学部農場研究報告, 24, 53-61
Issue Date	1985-03-10
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/13380
Type	departmental bulletin paper
File Information	24_p53-61.pdf



植物の培養細胞に関する研究

第 1 報 *Micromelilotus* 亜属のカルスの誘導と生育に関する種間差異

前川 雅彦・上原 由里・喜多富美治

(北海道大学農学部附属農場)

緒 言

Melilotus 属は *Eumelilotus* と *Micromelilotus* 亜属からなり¹⁴⁾、各種間では生殖的隔離機構が発達し^{11,12)}、また染色体の構造的差異も大きい^{5,10,15)}。そのため通常の変種方法により近縁種あるいは遠縁種からの有用遺伝子の導入が困難となっている。染色体の構造的差異や生殖的隔離機構が発達している種間において種間交雑育種を行う場合、培養細胞を用いた育種が有効である。*Melilotus* 属の栽培種である *M. alba* の低クーマリン含有量品種の育成や sweetclover weevil 抵抗性品種の育成のため、これらの遺伝子源が *Micromelilotus* 亜属に求められた^{4,8)}。しかしながら、*Micromelilotus* 亜属から *Eumelilotus* 亜属の種への交雑育種による遺伝子導入は困難で、この場合、培養細胞を利用した遺伝子導入に可能性がある。

本研究では、培養細胞を用いて *Melilotus* 属の種間交雑育種を行う場合の基礎知見として、*Micromelilotus* 亜属の 10 種 41 系統からカルスを誘導し、カルス誘導と生育について種間差異を明らかにした。

材料及び方法

本実験で供試した *Micromelilotus* 亜属は Table 1 に示した 10 種 41 系統である。カルス誘導については種子をカルス誘導培地に置床してカルスを得ることはできなかった。そのため、硬実による不発芽を避けるため種皮に若干傷つけた種子を滅菌処理 (70% エタノールに数秒浸漬、次亜塩素酸ナトリウム 15% 水溶液に 15 分浸漬) 後、寒天のみ

Table 1. List of species and their strains used in the experiment.

Species	Tentative No.	Name of strain
<i>M. italica</i>	- 1	L. 389
	- 2	Bdn 58-256
	- 3	Bdn 60-29
	- 4	Bdn 852
	- 5	Bdn 978
	- 6	Bdn 58-254
<i>M. messanensis</i>	- 1	PI 227418
	- 2	PI 231233
	- 3	Bdn 58-195
	- 4	Bdn 859
	- 5	Bdn 60-34
<i>M. macrocarpa</i>	- 1	Bdn 61-97
<i>M. elegans</i>	- 1	AC377
	- 2	Bdn 61-134
<i>M. sulcata</i>	- 1	Bdn 1020
	- 2	Bdn 1019
	- 3	Bdn 58-4
	- 4	Bdn 58-194
	- 5	Bdn 862
<i>M. segetalis</i>	- 1	Bdn 863
	- 2	Bdn 535
	- 3	sulcata, segetalis 2159
	- 4	sulcata, segetalis LF
<i>M. infesta</i>	- 1	M 70
	- 2	62-9
	- 3	M 63
<i>M. speciosa</i>	- 1	Bdn 60-46
	- 2	Bdn 60-44
	- 3	FC 30391
	- 4	Bdn 536
<i>M. neapolitana</i>	- 1	Bdn 3225
	- 2	Bdn 58-245
	- 3	Bdn 3217
<i>M. indica</i>	- 1	PI 263498
	- 2	PI 287894
	- 3	Bdn 776
	- 4	Bdn 525
	- 5	Bdn 3661
	- 6	Bdn 58-5
	- 7	AC 77
	- 8	grassilis

の培地(8 g/l)に播種し、催芽(25°C, 24時間照明)後、伸長した胚軸をカルス誘導培地に置床しカルスを誘導した。カルス誘導および継代培養に用いた培地はMS基本培地⁹⁾に2, 4-D; 2 mg/l, ショ糖; 30 g/l, 寒天; 10 g/lを添加したものである。カルスの誘導は25°Cの暗黒と連続照明下で行い、胚軸を置床してから30日後の生重を測定した(5反復)。カルスの生育については、暗黒下で誘導したカルスを4分割し、これらを暗黒と連続照明下に置き、30日後の生重の増加で比較した(2反復)。なお、照明下で生育したカルスからメチルアルコールで葉緑素を粗抽出し、分光光度計(日立分光光度計101)で664 nmの波長における吸光度を測定し、カルス生重1 gあたりの吸光度で相対的な葉緑素量の比較とした。

予備的に行った植物体再分化については、連続照明下で誘導し、1回継代培養したカルスを用いた。再分化培地としては、ショ糖; 30 g/lを含むMS基本培地⁹⁾にNAA; 0.5 mg/l, 6BAP; 3 mg/l(A培地)とNAA; 0.9 mg/l, 6BAP; 4 mg/l(B培地)を添加したものをを用いた。

実験結果

胚軸からカルスを暗黒下と連続照明下で誘導したところ(Table 2)、カルス誘導に関して光の効果はなかった。これはTable 4に示した分散分析の結果からも明らかであった。しかし、暗黒下で誘導した時に有意に重くなる系統があった。特に、*M. messanensis*では系統1以外、すべてが暗黒下で有意に重くなった。カルス誘導に関して、胚軸の両端からカルスができ、旺盛に生育するもの(*M. italica*)から、胚軸自体が膨潤してカルスの生育の非常に悪いもの(*M. indica*)までの顕著な種間差異があった。Table 4の分散分析の結果からも種間差異は有意であった。Table 2からは、カルス誘導の大きいもの(*M. italica*); 中程度(*M. messanensis*, *M. macrocarpa*, *M. elegans*, *M. sulcata*, *M. segetalis*, *M. infesta*, *M. speciosa*)と貧弱なもの(*M. neapolitana*, *M. indica*)の3群に分かれるようであった。また、種内の系統間差については、*M. italica*にあった以外は有意差はなかった。さ

らに、連続照明下で誘導したカルスで緑色を呈するものがあり、特に、最も生育の旺盛だった*M. italica*は濃い緑色を呈していた。一方、*M. elegans*と*M. infesta*は薄い緑色であった。

次に、暗黒下で誘導したカルスを分割して暗黒と連続照明下で継代培養したところ(Table 3)、光による生育に関する有意差はなかった(Table 4)が、カルス誘導の場合と同様に種間に大きな差異があった。この場合、カルス誘導時に旺盛な生育を示した*M. italica*と*M. messanensis*は、やはり旺盛な生育を示した。しかし、他の8種は顕著な生育を示さなかった。また、*M. italica*の系統間差が有意になったのは、*M. italica*-5が極端に生育が悪かったためであった。カルス誘導の時には、他の*M. italica*の系統と変らないようであったが、継代培養に移して極端に生育しなくなった原因については不明である。

Table 2に示したように*Micromelilotus* 亜属の種では、照明下でカルスが緑色となるものがあった。そこで、カルスが緑色となる*M. italica*-2 (Bdn 58-256)の緑葉とカルスからメチルアルコールで抽出した粗抽出液について分光光度計で可視部(340 nm~700 nm)の吸収曲線を調べた。対照に、カルスが緑色とならない*M. segetalis*-3 (*sulcata*, *segetalis* 2159)のカルスと緑葉からの粗抽出液の吸収曲線を調べた(Fig. 1)。*M. italica*と*M. segetalis*の緑葉から抽出したものは同じ波長で吸収極大を示していた。また、*M. italica*の緑色のカルスから抽出した粗抽出液も緑葉と同じ吸収極大を示した。一方、*M. segetalis*の白色のカルスからの粗抽出液には可視部で吸収極大がなかった。すなわち、連続照明下で緑色となったカルスは、緑葉の構成成分と可視部においては全く同じであった。MACKINNEY⁷⁾に拠れば、メタノールで抽出した時の全クロロフィル量は25.2×650 nmでの吸光度+4.0×665 nmでの吸光度であらわされるから、相対的なクロロフィル含量の指標としてFig. 1で吸収極大を示した664 nmの吸光度を用いた(Table 5)。カルス誘導の時に濃い緑色を示した*M. italica*はやはり高い吸光度を示し、クロロフィル含量の高いことを示唆していた。また、

Table 2. Callus induction from hypocotyl of *Melilotus* species in dark and light conditions, and the color of callus induced in light condition.

Species	Strain	Fresh weight (mg)		D-L	Color of callus	
		Dark ¹⁾ (D)	Light ¹⁾ (L)		in light	
<i>M. itlica</i>	- 1	612.4(179.45) ²⁾	515.6(130.79)	96.8	Green	(3.5) ³⁾
	- 2	553.2(83.21)	405.8(136.10)	147.4	Green	(2.4)
	- 3	636.0(189.29)	540.8(47.18)	95.2	Green	(3.2)
	- 4	370.0(23.42)	514.0(157.17)	- 144.0	Green	(3.2)
	- 5	386.2(172.19)	250.8(69.47)	135.4	Green	(2.0)
	- 6	360.0(128.39)	387.2(165.44)	-26.6	Green	(3.4)
<i>M. messanensis</i>	- 1	238.0(116.30)	147.2(40.22)	90.8	White	
	- 2	401.4(168.25)	132.2(45.29)	269.2**	Green	(0.4)
	- 3	362.2(131.55)	182.0(84.17)	180.2*	White	
	- 4	298.8(66.09)	104.0(38.36)	194.8**	White	
	- 5	195.6(76.16)	87.4(30.15)	108.2*	White	
<i>M. macrocarpa</i>	- 1	218.6(102.77)	101.2(30.38)	117.4*	White	
<i>M. elegans</i>	- 1	198.8(54.46)	98.2(28.80)	100.6**	Green	(1.0)
	- 2	105.8(39.28)	131.0(41.25)	-25.2	Green	(1.0)
<i>M. sulcata</i>	- 1	118.6(24.87)	61.8(14.01)	56.8**	Almost	light brown
	- 2	88.0(24.62)	54.8(21.92)	33.2	White	
	- 3	167.4(26.91)	158.8(44.76)	8.6	White	
	- 4	61.4(22.77)	143.4(37.25)	-82.0**	Green	(2.0)
	- 5	56.6(25.87)	-	-		
<i>M. segetalis</i>	- 1	148.2(25.01)	150.2(31.19)	- 2.0	White	
	- 2	77.2(47.61)	108.0(32.38)	-30.8	White	
	- 3	-	109.4(11.67)	-	White	
	- 4	-	67.0(36.37)	-	White	
<i>M. infesta</i>	- 1	125.8(87.81)	72.3(20.65)	53.5	Green	(0.3)
	- 2	82.2(30.67)	67.2(9.68)	15.0	Green	(0.9)
	- 3	107.4(8.05)	116.0(52.46)	- 8.6	White	
<i>M. speciosa</i>	- 1	78.2(28.99)	92.4(21.16)	-14.2	Light brown	
	- 2	90.0(32.69)	124.0(15.28)	-34.0	Light brown	
	- 3	79.6(23.86)	88.6(32.90)	- 9.0	White	
	- 4	84.0(52.33)	190.4(63.14)	-106.4	Almost white	
<i>M. neapolitana</i>	- 1	51.5(16.52)	52.0(3.16)	- 0.4	White	
	- 2	43.8(11.28)	46.0(10.27)	- 2.2	White	
	- 3	55.6(17.39)	53.4(11.01)	2.2	White	
<i>M. indica</i>	- 1	30.8(5.93)	23.2(3.77)	7.6*	White	
	- 2	-	34.2(12.15)	-	White	
	- 3	72.4(4.28)	43.6(8.50)	28.8**	White	
	- 4	24.0(2.00)	19.8(1.92)	4.2**	Almost white	
	- 5	36.8(5.54)	34.6(5.59)	2.2	White	
	- 6	-	35.6(3.65)	-	Almost brown	
	- 7	46.2(7.40)	50.4(8.96)	- 4.2	White	
	- 8	64.4(9.45)	41.8(14.69)	22.6*	White	

1) ; Culture condition. 2) ; Standard deviation was given in parenthesis.

3) ; Mean of degree of green of five replications.

0.5-almost white, 1-slightly light green, 2-light green, 3-green, 4-dark green.

*, **; Significant at 5% and 1% levels, respectively.

カルス誘導時に緑色が薄かった *M. elegans*-1, *M. infesta* は吸光度も低かった。*M. sulcata*-1, 2 はカルス誘導時に緑色ではなかったが, 継代培養した時に緑色となり 664 nm での吸光度が高くなった。逆に, 継代培養したことにより緑色から白色になり, 664 nm での吸光度が 0 であった系統

Table 3. Effect of the light on the growth of callus (cultured 30 days) derived from callus induced in dark condition.

Species	Strain	Fresh weight (mg)		
		Dark (D) ¹⁾	Light (L)	L-D
<i>M. italica</i>	-1	944.6(266.97) ²⁾	647.5(81.39)	-297.1*
	-2	145.2(56.61)	213.7(112.36)	68.5
	-3	701.9(100.04)	429.0(162.65)	-272.9*
	-4	552.1(167.29)	656.3(107.96)	104.2
	-5	3.5(9.60)	0.6(7.25)	-2.9
	-6	312.2(40.47)	502.2(264.41)	190.0
<i>M. messanensis</i>	-1	62.5(48.64)	65.8(59.08)	3.3
	-2	247.9(237.04)	75.6(21.35)	-172.3
	-3	555.9(213.96)	362.7(235.80)	-193.2
	-4	117.5(111.23)	53.8(93.79)	-63.7
	-5	90.4(67.66)	64.4(76.74)	-26.0
<i>M. macrocarpa</i>	-1	44.6(55.97)	32.6(32.34)	-12.0
<i>M. elegans</i>	-1	0.9(3.25)	10.9(13.00)	10.0
	-2	16.5(32.27)	5.8(12.71)	-10.7
<i>M. sulcata</i>	-1	31.4(30.14)	47.5(32.36)	16.1
	-2	30.4(15.63)	26.9(19.71)	-3.5
	-3	11.8(21.64)	6.6(11.30)	-5.2
	-4	-4.6(4.25)	-1.9(5.40)	2.7
	-5	5.4(2.10)	5.5(3.18)	0.1
<i>M. segetalis</i>	-1	16.2(8.36)	11.7(5.53)	-4.5
	-2	11.1(8.64)	10.6(8.04)	-0.5
<i>M. infesta</i>	-1	35.6(16.45)	43.5(44.53)	7.9
	-2	4.4(5.94)	7.0(9.92)	2.6
	-3	12.5(12.10)	18.3(13.10)	5.8
<i>M. speciosa</i>	-1	0.8(2.97)	-2.2(1.26)	-3.0
	-2	-0.5(3.00)	0.9(1.29)	1.4
	-3	5.4(4.56)	0.6(1.64)	-4.8
	-4	10.8(3.18)	8.8(1.77)	-2.0
<i>M. neapolitana</i>	-1	6.8(1.64)	2.8(0.84)	-4.0**
	-2	13.5(2.35)	11.0(6.90)	-2.5
	-3	9.9(3.25)	9.1(4.77)	-0.8
<i>M. indica</i>	-1	-	5.9(3.44)	-
	-3	7.7(2.77)	9.4(3.49)	1.7
	-4	3.8(3.03)	2.9(4.75)	-0.9
	-5	5.8(3.40)	7.9(3.68)	2.1
	-7	5.2(2.61)	11.6(2.38)	6.4**
	-8	16.3(4.18)	15.2(3.78)	-1.1

1) ; Culture condition.

2) ; Standard deviation was given in parenthesis.

*, ** ; Significant at 5% and 1% levels, respectively.

Table 4. Analysis of variance for callus induction and callus growth.

Source of variation	Mean square			
	Callus induction		Callus growth	
	df	Fresh wt.	df	Fresh wt.
Treatment (T)	1	15820.25	1	2399.05
Among species (S)	9	160134.57**	9	184339.41**
Within species (L)	26	6115.05	24	36388.31**
<i>M. italica</i>	5	22174.26**	5	171604.83**
<i>M. messanensis</i>	4	6868.45	2	5605.42
<i>M. elegans</i>	1	906.01	1	27.56
<i>M. sulcata</i>	3	3145.18	4	618.99
<i>M. segetalis</i>	1	2926.81	1	9.61
<i>M. infesta</i>	2	707.45	2	607.71
<i>M. speciosa</i>	3	1237.00	3	45.17
<i>M. neapolitana</i>	2	49.02	2	28.39
<i>M. indica</i>	5	430.77	4	40.89
Interactions	35	201859.03**	33	322364.14**
T x S	9	139979.61**	9	151474.92**
T x L	26	223278.81**	24	386447.60**
Error	283	4962.31	264	5110.16

** ; Significant at 1% level.

もあった(*M. elegans*-2)。

予備的にカルスからの植物体再分化について試験する目的で、2種の再分化用培地(A, B)にカルスを置床した。置床後、2ヵ月後に*M. indica*-1 (PI 263498), -5 (Bdn 3661)が発根したが、前者はA, B両培地で、後者はB培地でのみ、根の形成があった。また、芽の形成は何れの種でもなかった。置床した10種のうち*M. italica*, *M. messanensis*, *M. sulcata*と*M. indica*は旺盛な生育を示し、かつこれらの種のカルスは全て緑色となり葉緑素の形成があった。*M. italica*では2, 4-Dを含む培地の時よりも緑色が薄くなった。

考 察

Melilotus 属の中で栽培種は、*M. alba*と*M. officinalis*で、どちらも*Eumelilotus* 亜属である。

しかしながら、これらの種は sweetclover weevil に非抵抗性であり、またクーマリン含量が高い欠点があり、これらの欠点の改善にあたり、*Micromelilotus* 亜属に遺伝子源が求められた¹⁶⁾。多くの検定の結果、*Micromelilotus* 亜属の*M. infesta*だけが sweetclover weevil 抵抗性遺伝子を有しており⁸⁾、またクーマリン含量も低いことが判明した⁴⁾。しかし、*Micromelilotus* 亜属から*Eumelilotus* 亜属への遺伝子導入は、染色対の構造的差異が障壁となり、通常の間交雑育種では不可能である。そこで培養細胞を用いた育種が有効なわけであるが、この前提としてプロトプラストの分離から細胞融合、カルス化、植物体再分化に至る一連の実験系の確立が必要であるが、*Melilotus* 属ではまだ実験系が確立されていない。本研究では、有用遺伝子を有する*M. infesta*を含む*Micro-*

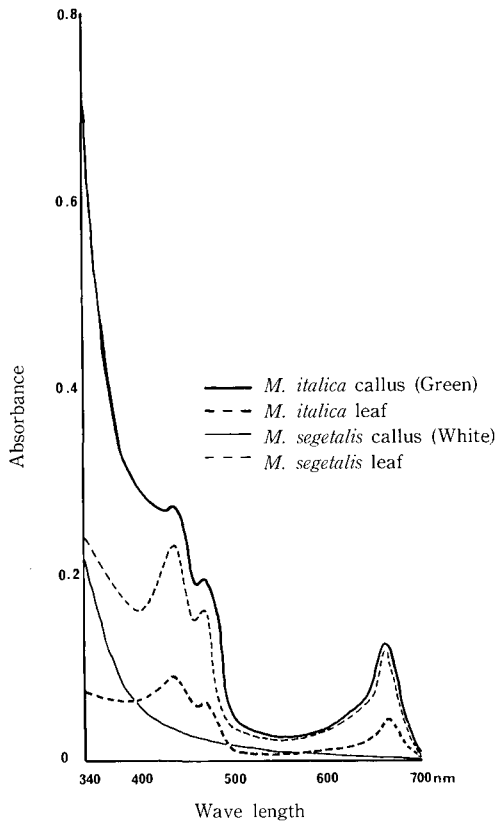


Fig. 1. UV spectra of the crude extracts with MeOH from callus and leaves of *M. italica* (Bdn 58-256) and *M. segetalis* (sulcata, segetalis 2159).

melilotus 亜属 10 種について、プロトプラスト分離に必要なカルスの誘導、生育に関する種間差異ならびにカルスの特徴を明らかにした。胚軸をカルス誘導培地に置床して、30 日後の生重の増加を調べたところ、旺盛な生育するもの (*M. italica*)、中程度と生育が貧弱なもの (*M. neapolitana*, *M. indica*) の 3 種類に分類できるようであった。この分類は、KITA^{5,6)} によって提示された体細胞染色体の形態に基づく分類、すなわち Type C (*M. italica*)、Type B-1、Type B-2 (*M. indica*, *M. neapolitana*, *M. elegans*) によく似ていた。ただし、*M. elegans* は中程度のカルスの生育を示し、カルスの誘導時の生育に関しては *M. indica*, *M. neapolitana* とは別の群に属していた。また、SHLARBAUM *et al.*¹³⁾ は、*M. italica* が大きな

Table 5. Absorbance at 664nm of the extracts with MeOH from callus of *Melilotus* species cultured in light condition.

Species	Stain	Absorbance at 664nm(/g)
<i>M. italica</i>	-1	4.44 ± 0.55*
	-2	3.48 ± 0.38
	-3	3.44 ± 1.16
	-4	3.11 ± 1.02
	-5	2.10 ± 3.04
	-6	6.84 ± 6.42
<i>M. messanensis</i>	-2	3.93 ± 1.14
	-5	1.63 ± 2.08
<i>M. macrocarpa</i>	-1	0.50 ± 1.12
<i>M. elegans</i>	-1	0.67 ± 1.49
	-2	0.00 ± 0.00
<i>M. sulcata</i>	-1	2.41 ± 1.70
	-2	6.90 ± 2.90
	-3	0.13 ± 0.28
	-4	1.54 ± 3.44
	-5	0.00 ± 0.00
<i>M. segetalis</i>	-1	0.00 ± 0.00
	-2	0.00 ± 0.00
<i>M. infesta</i>	-1	0.99 ± 1.09
	-2	0.65 ± 0.97
	-3	0.24 ± 0.55
<i>M. speciosa</i>	-1	0.80 ± 1.79
	-2	0.00 ± 0.00
	-3	0.00 ± 0.00
	-4	0.00 ± 0.00
<i>M. neapolitana</i>	-1	0.00 ± 0.00
	-2	2.59 ± 2.37
	-3	0.00 ± 0.00
<i>M. indica</i>	-1	0.00 ± 0.00
	-3	0.00 ± 0.00
	-4	0.00 ± 0.00
	-5	0.00 ± 0.00
	-7	0.53 ± 0.74
	-8	0.00 ± 0.00

*; Mean ± Standard deviation.

染色体を有している、*Melilotus* 属の祖先型であることを示唆したが、この染色体の大きいことが *M. italica* のカルスの旺盛な生育に関連しているかは不明である。しかし、カルスの誘導・生育においても *M. italica* は特異的な種であると言える。次に、継代培養したところ、誘導時に旺盛な生育を示した *M. italica* と *M. messanensis* はやはり旺盛な生育を続けたが、他の 8 種は貧弱だった。また、誘導時に旺盛な生育を示した *M. italica* -5 (Bdn 978) は、継代培養に移してほとんど生育しなかった。佐野¹⁰⁾ の 68 形質によるクラスター分析に拠れば、*M. italica* 内でもやはり *M. italica* Bdn 978 だけ特異的で、他の 5 種とはクラスターしなかった。カルス誘導時の生育量による分類と佐野¹⁰⁾ のクラスター分析による分類とは

必ずしも一致しなかった。ただし、クラスター分析においても、*M. italica*, *M. neapolitana* と *M. indica* は *Micromelilotus* 亜属内で特異的な種であるようであった。カルス誘導時と継代培養におけるカルスの生育について光の影響を調べたが、ほとんど光の影響はなかった³⁾。しかし、*M. messanensis* だけはカルス誘導時に光のない方が生育はよかった。また、*M. italica*, *M. elegans* と *M. infesta* は連続照明下でカルスが緑色となった。ただし、*M. elegans* と *M. infesta* は *M. italica* のカルスよりかなり緑色が薄かった。これは 664 nm で調べた吸光度とも一致していた。しかしながら、6BAP を含む再分化培地に移植した時、誘導時にカルスが緑色とならなかった *M. messanensis* や *M. indica* が緑色となったことから、カルス誘導時にカルスが緑色となるかどうかは、EL HINNAWY²⁾ の *M. alba* の実験からも、生長調節物質やショ糖濃度に影響されている可能性がある。

予備的に再分化について調べたが、*Melilotus* 属で再分化に成功したのは BAJAJ and GOSAL¹⁾ の *M. parviflora* の 1 例しかなく、*Micromelilotus* 亜属では根の形成はあったが芽の形成はなかった。これは TAIRA *et al.*¹⁷⁾ が報告した *M. alba* の場合と同じであった。

摘 要

Micromelilotus 亜属の 10 種 41 系統について、胚軸からカルスを誘導し、1 回継代培養を行い、カルス誘導と生育に関して種間差異を調べた。カルス誘導については、旺盛なもの (*M. italica*)、中程度 (*M. messanensis*, *M. macrocarpa*, *M. elegans*, *M. sulcata*, *M. segetalis*, *M. infesta*, *M. speciosa*) と貧弱なもの (*M. neapolitana*, *M. indica*) に分かれるようであった。1 回継代培養したところ、カルス誘導時に生育が旺盛なものはやはり生育が旺盛だったが、他はいずれも貧弱であった。カルス誘導と継代培養について光の影響を調べたが、特に、カルス誘導において *M. messanensis* で暗黒がよかった以外は、光の影響はなかった。連続照明下で誘導・継代培養した時、*M. italica*, *M.*

elegans, *M. infesta* はカルスが緑色となった。*M. italica* が最も濃い緑色を呈し、これは 664 nm の吸光度からクロフィル含量の最も高いことを示唆していた。

引用文献

- 1) BAJAJ, Y.P.S. and GOSAL, S.S. : Regeneration of plants from callus cultures of a forage legume, sweetclover (*Melilotus parviflora* Desf.). *SABRAO J.* **13** : 176-179. 1981
- 2) EL HINNAWY, E. : Effect of some growth regulating substances and carbohydrates on chlorophyll production in *Melilotus alba* (Desr.). *Z. Pflanzenphysiol.* **74** : 95-105. 1974
- 3) GAMBORG, O.L. and SHYLUK, J.P. : Nutrition, Media and Characteristics of plant cell and tissue culture. In "Plant Tissue Culture" (T.A. THORPE, ed.), 21-44. Academic Press, New York. 1981
- 4) GORZ, H.J. and HASKINS, F.A. : Occurrence of o-hydroxycinnamic acid in species of *Melilotus* and *Trigonella*. *Crop Sci.* **4** : 193-196. 1964
- 5) KITA, F. : Studies on the genus *Melilotus* (sweetclover) with special reference to interrelationships among species from a cytological point of view. *J. Fac. Agr. Hokkaido Univ., Sapporo.* **54** : 23-122. 1965
- 6) KITA, F. : Studies on the morphology of the somatic chromosomes of the genus *Melilotus* (sweetclover). *Jap. J. Bot.* **19** : 149-174. 1966
- 7) MACKINNEY, G. : Absorption of light by chlorophyll solution. *J. Biol. Chem.* **140** : 315-322. 1941
- 8) MANGLITZ, G.R. and GORZ, H.J. : Host-range studies with the sweet clover weevil and the sweet clover aphid. *J. Econ. Entomol.* **57** : 683-687. 1964
- 9) MURASHIGE, T. and SKOOG, F. : A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **15** : 473-497. 1962
- 10) 佐野芳雄 : *Melilotus* 属における系統発生に関する研究, 北大農・学位論文 p.166, 1976
- 11) SANO, Y. and KITA, F. : Reproductive varriers distributed in *Melilotus* species and their genetic bases. *Can. J. Genet. Cytol.* **20** : 275-289. 1978
- 12) SANO, Y. and KITA, F. : Genes for reproductive isolation located on rearranged chromosomes. *Hered.* **41** : 377-383. 1978
- 13) SCHLARBAUM, S.E., JOHNSON, L.B., GORZ, H.J. and HASKINS, F.A. : Identification of chromosomes with secondary constrictions in *Melilotus* species. *J. Hered.* **75** : 23-26. 1984

- 14) SCHULZ, O.E. : Monographie der Gattung *Melilotus*.
Bot. Jahrb. **29** : 660-753. 1901
- 15) SMITH, W.K. and GORZ, H.J. : Sweetclover improvement. *Advan. Agron.* **17** : 164-231. 1965
- 16) STEVENSON, G.A. : An agronomic and taxonomic review of the genus *Melilotus* Mill., *Can. J. Plant Sci.* **49** : 1-20. 1969
- 17) TAIRA, T., HASKINS, F.A. and GORZ, H.J. : Callus and suspension cultures of *Melilotus alba* tissues and cells. *Crop Sci.* **17** : 407-411. 1977

Studies on cultured cells in plants,

I. Differences in callus induction and growth among species in the subgenus *Micromelilotus*

Masahiko MAEKAWA, Yuri UEHARA and Fumiji KITA

(Experiment Farms, Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo, Japan)

Summary

The objective of this study was to elucidate the differences in callus induction and growth among species in the subgenus *Micromelilotus*.

Callus was derived from the hypocotyls of aseptically germinated seeds of ten species including a total of 41 strains. Callus induction was evaluated according to the amount of callus growth in 30 days from hypocotyl inoculation onto MS medium with 2 mg/l ; 2, 4-D. A considerable variation in the extent of callus induction was observed among species. However, ten species appeared to be divided into three groups with respect to callus induction, namely, high (*M. italica*), moderate (*M. messanensis*, *M. macrocarpa*, *M. elegans*, *M. sulcata*, *M. segetalis*, *M. infesta*, *M. speciosa*) and poor callus induction group (*M. neapolitana*, *M. indica*). After 30 days of subculture, *M. italica* and *M. messanensis* showed good callus growth, while the other species showed poor callus growth. Although it was found that light was not essential for callus induction and growth, callus induction of *M. messanensis* was stimulated by dark condition.

M. italica, *M. elegans* and *M. infesta* produced characteristic green callus in light condition. From the spectrophotometrical analysis, it was suggested that callus of *M. italica* had the highest amount of chlorophyll among the three species.