

Aloe bellatura の雄ずいの組織培養

小西達夫*・天野 実**

KONISHI Tatsuo* & Minoru AMANO**: Callus Formation
in Stamens of *Aloe bellatura*

最近、植物組織培養の進歩はめざましく、その手法は生理学、生化学、病理学、薬学、農学、遺伝学および育種学など諸分野で有効な研究方法として用いられている。

植物の雄性生殖器官の一部である葯を培養して、花粉起原の半数体植物が得られることが、Guha ら (1964, 1966, 1967) によって、*Datura innoxia* で報告されて以来、タバコ (Bourgin ら 1967, 中田 ら 1978)、イネ (Niizeki ら 1969, Harn 1969) など種々の植物で花粉起原の半数体および半数性細胞からなるカルスを得た多くの報告がある。

花粉起原の半数体は、花粉から embryoid (胚様体) が形成される場合 (Guha 1967, Bourgin ら 1967 など) と、花粉からカルスが形成され、そのカルスから半数体を得られる場合 (Niizeki ら 1968 など) の二通りが報告されている。

アロエ属 (*Aloe*) はユリ科 (Liliaceae)、アロエ連 (Aloineae) 中最大の属で約330種が知られ、アラビア半島を含むアフリカ大陸およびマダガスカル島ならびにそれらに隣接する諸島に自生する多肉植物である (Reynolds 1966)。組織培養法によるアロエ属の研究は皆無の状態であり、これに近縁な *Haworthia* 属について行われているにすぎない (Majumdar ら 1968, 1970, Kaul ら 1972, Konishi ら 1982 など)。

本報告ではマダガスカル産 *Aloe bellatura* Reynolds ($2n=14$) について、花粉細胞の発育段階の異なる雄ずいを種々の条件で組織培養を行い、その結果を報告するものである。

材料および方法

材料は東京農業大学育種学研究室のファイロン室内で栽培され、出穂した *A. bellatura* の雄ずいを用いた。*A. bellatura* はマダガスカル島特産で、東京農業大学第2次マダガスカル動植物学術調査隊 (1968) によって採集されたもので、1%アセトカーミン染色法による花粉稔性が平均95%以上の個体である。

培養に供する試料は開花前の花序を切り取り、薄く希釈した中性洗剤で洗った後に滅菌水で良く洗い流し、10%アンチホルミン液に約10分間漬し殺菌し、再び滅菌水で洗い、その後ピンセットを用い花被を取り除き雄ずいを取り出した。

葯は花粉細胞の発育程度によって花粉四分子形成期、花粉1核期、花粉2核期のものをそれぞれ用いた。花粉細胞の発育程度は、1蕾内の外列と内列の雄ずいにより異なるので、それぞれ各1個の葯について、ファーマー液 (アルコール3: 酢酸1) で固定し、常法のアセトカーミンおしつぶ

* 国立科学博物館 筑波実験植物園 Tsukuba Botanical Garden, National Science Museum, Ibaraki Prefecture 305.

** 東京農業大学農学部育種学研究室, 〒156 東京都世田谷区桜ヶ丘 1-1 Department of Agriculture, Tokyo University of Agriculture, Sakuragaoka 1-1, Setagaya-ku, Tokyo 156.

し法で観察を行い確認した。また、培養に供する葯は、①葯から花糸を取り除かないもの、②葯から花糸を取り除いたもの、および③葯から花糸を取り除き、葯を半截したものをを用いた。

基本培地は Linsmaier & Skoog (1965) による RM-1965 を用い、蔗糖濃度は 3% または 6% とし、寒天濃度は 1% とした。添加物としては NAA (α -naphthalenacetic acid) 0.5, 1.0, 2.0 ppm, KIN (Kinetin, 6-furylamino-purine) 0, 0.05, 1.0 ppm, YE (yeast extract) 100 ppm, CA (casamino acids) 0.2%, MYO (myoinositol) 100 ppm などを使用した。培地の pH は寒天添加時に 1 N-HCl あるいは 1 N-NaOH を用いて 5.8 に調製し、試験管 (直径 20 mm × 長さ 150 mm) に 15 ml ずつ分注し、アルミホイルで栓をし、120°C で 15 分間加圧滅菌した。培養は傾斜培地を用い、1 試験管に 1 個の材料を置床し、暗所で 28°C ± 1°C で行なった。培養物の観察は肉眼又は実体顕微鏡下で行った。

カルス細胞およびカルスから再分化した根の染色体観察のために、8-hydroxyquinolin (0.002 M) で約 2 時間前処理した後、フェーマー液あるいは 45% 酢酸液で固定し、1 N-HCl (60°C) で約 6 分間加水分解を行い、フォイルゲン染色し、常法のおしつぶし法に従い標本作製した。

実験結果

実験1. 花糸を除いた葯の培養

基本培地に NAA (0.5, 1.0, 2.0 ppm) と KIN (0, 0.05, 1.0 ppm) を各種濃度の組み合わせで添加した 9 種類の培地を用い、花粉細胞の発育期の各期の葯を培養し、77 日目にカルスの形成ならびにカルスからの発根を調査した結果を Table 1 に示した。

カルスが得られたのは、2.0 ppm NAA 単独添加培地で花粉 2 核期のものを培養した 2 例中の 1 例だけで、花粉四分分子期、花粉 1 核期のものを培養してもカルスは得られなかった。基本培地に NAA と KIN を組み合わせ添加した場合、あるいは NAA を 0.5 ppm, 1.0 ppm の濃度で単独に添加して培養した場合も、花粉細胞の発育期の違いにかかわらず総てにカルスは得られなかった。また、カルスからの根や茎葉の再分化は認められなかった。

実験2. 葯を半分にしたものの培養

基本培地に NAA (2.0 ppm) および KIN (1.0 ppm) を添加し、蔗糖濃度を 3% 又は 6% とした培地を用い、花粉細胞の発育期の各期の葯を半截したものを置床し、99 日目に調査した結果を Table 2 に示した。

Table 1. Effects of NAA and kinetin callus formation in anthers without filaments.

Constituents of medium		No. of inoculated anthers			No. of anthers from which calli formed			No. of calli from which roots formed		
NAA (ppm)	KIN (ppm)	Tet*	1-n**	2-n***	Tet*	1-n**	2-n***	Tet*	1-n**	2-n***
0.5	0	0	6	3	—	0	0	—	—	—
1.0	0	4	2	2	0	0	0	—	—	—
2.0	0	0	5	2	—	0	1	—	—	0
0.5	0.05	0	12	4	—	0	0	—	—	—
1.0	0.05	8	4	4	0	0	0	—	—	—
2.0	0.05	0	9	4	—	0	0	—	—	—
0.5	1.0	0	12	3	—	0	0	—	—	—
1.0	1.0	8	4	4	0	0	0	—	—	—
2.0	1.0	0	10	4	—	0	0	—	—	—

* pollen tetrad stage, ** uninucleate stage, *** binucleate stage.

The same abbreviations are also used in Tables 2-4.

Table 2. Effect of sucrose on callus formation in a half piece of anther (vertically cut in two).

Sucrose concentration	No. of inoculated anthers			No. of anthers from which calli formed			No. of calli from which roots formed		
	Tet*	1-n*	2-n*	Tet*	1-n*	2-n*	Tet*	1-n*	2-n*
3%	4	6	4	0	0	0	—	—	—
6%	4	5	4	1	0	0	0	—	—

* See Table 1.

カルスが得られたのは、蔗糖濃度 6% の培地で、花粉四分子期のものを培養した 4 例中の 1 例 (25%) だけで、カルスは半断面より形成されゆっくり生長した (Fig. 1)。しかし、花粉 1 核期、花粉 2 核期のものを培養してもカルスは得られなかった。蔗糖濃度 3% の培地では、花粉細胞の発育期の違いにかかわらず、いずれの時期のものからもカルスは得られなかった。また、カルスからの根や茎葉の再分化は認められなかった。

実験 3. 花糸をつけた葯の培養

花糸をつけたままの葯を実験 2 と同じ培地条件で培養し、108 日目に調査した結果を Table 3 に示した。

葯からカルスが得られたものは、花粉四分子期ならびに花粉 1 核期のもののみで、花粉 2 核期のものからは得られなかった。

葯から最も高い比率でカルスが形成されたのは、花粉四分子期のものを 6% 蔗糖濃度培地で培養した 36 例中の 8 例 (22.2%)、次いで花粉 1 核期のものを培養した両培地の 31 例中の 5 例 (16.1%) ずつで、花粉四分子期のものを培養した 37 例中 3 例 (8.1%) の順であった。すなわち、葯からのカルスの形成は、葯の花粉細胞の発育時期が花粉四分子期ならびに花粉 1 核期のもので高い比率で認められ、特に 6% 蔗糖濃度培地で花粉四分子期の葯を培養した場合に最も高い 22.2% を示した。

葯からカルスが形成される場合のうち、葯のみに形成された場合は花粉四分子期のものを培養した 6% 蔗糖濃度培地の 3 例のみで、他は総て培養後約 40 日までに花糸にカルス形成が起っており、その後葯にカルス形成が認められたものである (Fig. 2)。また、花粉四分子期と花粉 1 核期では葯からカルスが形成されるまでの日数が異なり、前者は約 74 日、後者は約 60 日を要し、両者間に 2 週間の差があった。

花糸からのカルス形成は両培地のいずれの花粉細胞の時期の雄ずいを培養した場合にも得られた。最も高い比率でカルスを得たのは、花粉 1 核期のものを 3% の蔗糖濃度培地で培養した 6 例中の 5 例 (83.3%)、最も比率の低かったのは花粉四分子期のものを 6% 蔗糖濃度培地で培養した 36 例中の 5 例 (13.9%) であった。

花糸からのカルス形成の比率は葯の花粉細胞の発育時期の違いにより異なっていた。すなわち、3% 蔗糖濃度培地では花粉 2 核期 (83.3%)、花粉 1 核期 (61.1%)、花粉四分子期 (40.5%) の順であった。これに対し 6% の蔗糖濃度培地では花粉 1 核期 (74.2%)、花粉 2 核期 (16.7%)、花粉四分子期 (13.9%) の順であった。両者共に花粉四分子期のものが花糸からのカルスが得られる比率が低い値を示した。

カルスよりの再分化は花糸から得られたカルスからの根の形成が認められるだけで、葯から得ら

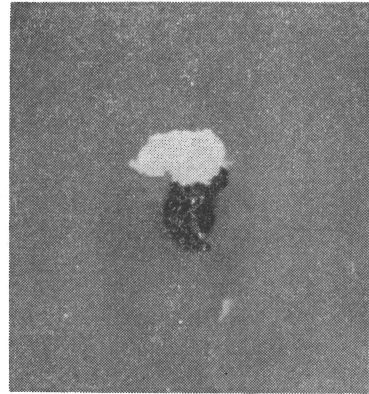


Fig. 1. Callus derived from one half of anther (129 days after inoculation).

Table 3. Callus formation in stamens.

Sucrose concentration	No. of inoculation anthers				No. of filament and anther from which calli formed, with % in parenthesis				No. of calli which roots formed, with % in parenthesis						
	Tet*		2-n*		Tet*		1-n*		Tet*		1-n*		2-n*		
	F	A	F	A	F	A	F	A	F	A	F	A	F	A	
3%	37	31	6	6	15 (40.5)	3 (8.1)	19 (61.3)	5 (16.1)	5 (83.3)	0 (0)	0 (0)	5 (33.3)	4 (21.0)	0 (0)	1 (20.0)
6%	36	31	6	6	5 (13.9)	8 (22.2)	23 (74.2)	5 (16.1)	1 (16.7)	0 (0)	0 (0)	1 (2.0)	8 (34.8)	0 (0)	0 (0)

* See Table 1.

F : filament, A : anther.

Table 4. Effects of yeast extract, casamino acid and myoinositol on callus formation in stamens (anthers with filaments).

Constituents of medium		No. of inoculated stamens				No. of filaments and anthers from which calli formed, with % in parenthesis				No. of calli from which roots formed				
YE (ppm)	CA (%)	MYO (%)	Tet*	1-n*	2-n*	Tet*	1-n*	2-n*	F	A	F	A	F	A
0	0	0	4	15	0	2 (50.0)	0 (0)	8 (53.0)	0 (0)	0 (0)	2 (100.0)	0 (0)	2 (100.0)	0 (0)
100	0	0	3	7	0	2 (66.7)	0 (0)	4 (57.1)	2 (28.6)	0 (0)	2 (1)**	0 (0)	2 (1)**	0 (0)
0	0.2	0	2	8	0	2 (100.0)	0 (0)	2 (25.0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (1)**	0 (0)
0	0	100	1	0	9	1 (100.0)	0 (0)	—	—	—	0 (0)	3 (33.3)	—	0 (0)

* See Table 1.

** number of calli from which root-like structure were formed are shown in parenthesis.

れたカルスでは認められなかった。花糸から得られたカルスにおける根の形成が最も高い比率で認められたのは花粉1核期のものを6%蔗糖濃度培地で培養して得られた23例のカルスのうち8例(34.8%)で、最も比率の低かったのは花粉四分子期のものを6%蔗糖濃度培地で培養した5例のカルスのうち1例(20%)であった。

実験4. YE, CA, MYO の影響

YE, CA, MYO のカルス形成に対する影響を調査するために NAA (2.0 ppm) および KIN (1.0 ppm) を一定にし、YE 100 ppm, CA 0.2%, MYO 100 ppm をそれぞれ単独に添加した培地を用い、実験3と同様に花粉細胞の発達段階の各期の葯に花糸をつけたまま培養を行った。その結果を Table 4 に示した。

葯からカルスが得られたのは花粉1核期のものを100 ppm の YE 添加培地で培養した7例中2例(28.6%)だけで、他の培地や花粉細胞の発育期のものでは総てカルスは形成されなかった。葯からカルスが得られる過程は実験3の場合とほぼ同様な経過をたどり形成された。

花糸からのカルスはいずれの培地で培養した場合にも得られた。最も高い比率を示したのは花粉四分子期のものを CA あるいは MYO を添加した培地で、2例中の2例および1例中の1例であり、最も比率の低かったのは花粉1核期のものを CA 添加培地で培養した8例中の2例(25%)であった。

YE, CA, MYO の添加培地で花粉四分子期のものを培養した場合に無添加培地より高い比率でカルスが得られた。花粉1核期ものでは YE 添加培地(57.1%)は無添加培地(53.3%)より高い比率であった。しかし MYO または CA 添加培地(100%)より低かった。

根の再分化は、YE, CA および MYO 無添加培地、YE 添加培地、CA 添加培地で形成されたカルスでみられた。また、YE および CA 添加培地ではほとんどカルス形成なしに、花糸の切口から直接発根するように不定根が得られ多くの根のかたまりに生長した。

実験5. カルス細胞の染色体

実験3 (Table 3) で花粉1核期のものを培養した3%蔗糖添加培地で葯から得られたカルスと花糸から得られたカルスについて染色体を観察することができた。カルス細胞の中期分裂像は極めて少なく、多いもので1プレパレート中3~4核板が見られる程度であった。花糸から得られたカルスから再分化した根では中期分裂像は観察できなかった。

葯から得られたカルスでは15核板中 $2n=14$ が6核板、 $2n=28$ が9核板、花糸から得られたカルスでは6核板中 $2n=14$ が2核板、 $2n=28$ が4核板であった。Aloe bellatura の染色体数は $2n=14$ とされているので、カルス細胞の染色体数はこれと同じか、あるいはその正倍数の $2n=28$ であった。また、染色体構成(x)は $4L+3S$ (天野ら1972) で表わされ、カルス細胞でもその構成比は変わらず、 $2n=14$ では $8L+6S$ 、 $2n=28$ では $16L+12S$ であった。

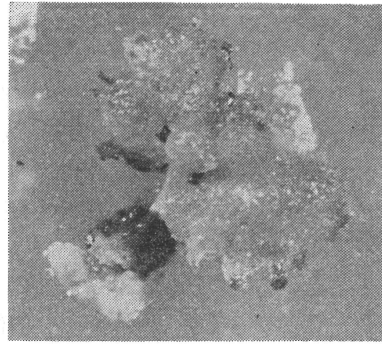


Fig. 2. Callus derived from anther and filament (110 days after inoculation).

考 察

葯培養により半数体植物が得られている場合の葯に含まれている花粉細胞の發育段階について、Guha ら (1964, 1966, 1967) は *Datura innoxia* で花粉1核期から2核期、中田 ら (1968) はタバコで花粉1核期終期 (花粉核分裂期の直前)、Niizeki ら (1968) はイネで花粉1核期などの報告がある。また、上記の著者らは半数体植物が得られた過程について、*Datura innoxia*、タバコなどでは花粉細胞より直接 embryoid を経て得られ、イネでは花粉細胞起原のカルスあるいは embryoid を経て得られる場合があることを報告している。

本実験では、花粉細胞起原であるか、その他の組織起原であるかを確かめられなかったが、葯からカルスが得られた。置床した葯の花粉細胞の發育段階の時期は培地条件により差異を示すが、花粉四分子期と花粉1核期のものが花粉2核期のものより高い比率で得られる傾向を示した。一方、置床する葯の状態はカルス形成に大きな影響を与えているように思われる。すなわち、葯を半分に切断したものや花糸を取り除いた葯だけの場合においても差異が認められる。また、花糸をつけたままの葯を培養した場合に花糸のカルス形成が起こり、その後、葯にカルスを形成する場合が多かったのは花糸におけるカルス形成がこれに接続する葯のカルス形成を促進する要因の一つとなつたと思われる。

花糸を取り除いた葯を基本培地に NAA (0.5, 1.0, 2.0 ppm), KIN (0, 0.05, 1.0 ppm) などを単独あるいは組み合わせて培養したが、葯からカルスが形成されたのは 2.0 ppm の NAA を単独に添加した場合だけで、NAA, KIN の著しい効果があったとは思えない。

培地中の蔗糖濃度の効果を検討するために実施した実験3 (Table 3) では、花粉1核期の花粉母細胞を含む葯からのカルス形成が見られなかった。これに対して花粉四分子期、花粉2核期のものを培養した場合はカルスが得られ、蔗糖濃度により形成率に明らかな差異が認められた。つまり、葯からのカルス形成は花粉四分子期のものは、蔗糖3%の培地より6%の培地で培養した場合の方が高率にカルスが得られた。それに対して、花粉1核期のものを培養した場合、蔗糖濃度と無関係に葯からのカルス形成率を示した。また、花糸からのカルス形成は花粉四分子期、花粉2核期のいずれも6%濃度培地より3%濃度培地で高率に得られた。このことは花粉細胞の發育段階に応じて蔗糖濃度が葯および花糸のカルス形成に影響を与えたと考えられた。

また、6%蔗糖添加培地に花粉四分子期の花粉を含む葯を半截して置床した場合 (Table 2) にカルスが得られている。この実験だけからは6%蔗糖添加がカルス形成に対して効果があったとは言いがたいが、実験3で花粉四分子期のものを同濃度の蔗糖添加培地で培養した場合に効果が認められるのでこの場合も同じと考えられる。YE, CA, MYO などの添加物などが葯からのカルス形成に対して効果は実験4から認められなかった。しかし、花糸からのカルス形成は花粉四分子期のものを培養した場合に YE, CA, MYO とも効果があると考えられた。

葯および花糸から得られたカルス細胞の染色体調査により、半数体カルス細胞は観察されず、2x, 4x のみであった。葯培養において半数体の他に倍数体などが得られる起原としては、葯壁などの体細胞から由来する場合 (Niizeki ら 1971, Hirabayashi ら 1976)、あるいは embryoid 形成の初期に花粉の生殖核と栄養核に endoreduplication (核内倍加) や融合が起って 2x, 3x, 4x の植物体得られる場合 (Sunderland ら 1974) などが報告されている。本実験で得られた観察結果から花粉細胞起原であるか、葯壁などの他の組織起原であるか断定できなかった。また、染色体数ばかりか、その構造に変異が起こる例 (Sacrista'n 1971) が報告されているが、今回の観察結果で、アロエ属の基本染色体構成 (x) 4L+3S の構成比からなる 2x, 4x が認められ、染色体数が正倍数に変化しているのみで、明らかな構造変化は認められなかった。

謝 辞

本実験の遂行にあたり、終始貴重な御助言を賜った東京農業大学農学部教授近藤典生博士、千葉短期大学校角田昌一氏、ならびに原稿を御校閲下さった国立科学博物館筑波実験植物園園長黒川道博士に深く感謝いたします。また、実験に協力して下さった東京農業大学農学部育種学研究室の諸氏ならびに卒業生淡輪俊氏に謝意を表します。

Summary

Calli formations from stamens of *Aloe bellatura* Reynolds ($2n=14$) were observed under various culture conditions. When anthers without filaments and one halves of anthers transversely cut in two, both taken from flowers at different stage of pollen formation, tetrad stage, uninucleate stage and binucleate stage, were cultured on RM-1965 (Linsmaier & Skoog 1965) added with NAA or Kinetin, calli were scarcely formed (Tables 1 and 2). However, stamens taken from flowers at different stages of pollen formation formed calli rather often. Induction of calli in filaments of stamens cultured on RM-1965 added with 2.0 ppm NAA, 1.0 ppm Kinetin, and 3% sucrose showed the highest percentage (83.3%). However, the concentration of sucrose and additions of yeast extract, casamino acids and myoinositol to the substratum showed no distinct effects on calli formation in stamens of *Aloe bellatura*.

Chromosome numbers were counted in roots formed on the callus induced from an anther and filament taken from a flower at binucleate stage of pollen formation. Chromosome numbers were $2n=14$ or 28, and chromosomal structure $4L+3S$ was not changed.

引用文献

- 天野 実・高橋祐弘・近藤典生, 1972. マダガスカル産 *Aloe* の染色体. 東京農業大学育種学研究所研究報告書 (3) 別冊: 7-12.
- Bourgin, J.P. and J.P. Nitsch, 1967. Obtention de *Nicotiana* haploides à partir d'étamines cultivées *in vitro*. Ann. Physiol. Végétale, 9: 377-382.
- D'amato, F., 1977. Cytogenetics of differentiation in tissue and cell culture, 343-357. In J. Reinert and Y.P.S. Bajaj (ed.), Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue, and Organ Culture. Springer-Verlag, Berlin.
- Guha, S. and S.C. Maheshwari, 1964. *In vitro* production of embryos from anthers of *Datura*. Nature 204: 497.
- and ——, 1966. Cell division and differentiation of embryos in the pollen grains of *Datura in vitro*. Nature 212: 97-98.
- and ——, 1967. Development of embryoids from pollen grains of *Datura in vitro*. Phytomorphology 17: 454-461.
- Harn, C., 1969. Studies on the anther culture of rice. Korean J. Breeding. 1: 1-11.
- 原田 広, 駒嶺穆編. 1979. 植物組織培養, 理工学社.
- Hirabayashi, T., I. Kosaki and T. Akihama, 1976. *In vitro* differentiation of shoots from anther callus in *Vitis*. Hort. Science. 11: 511-512.
- Karl, K. and P.S. Sabharwal, 1972. Morphogenecis studies on *Haworthia* tissue culture and control of differentiation. Amer. J. Bot. 59: 377-385.
- Konishi, T., M. Hayashi and M. Ikami, 1982. Induction of flower buds in tissue culture of perianth of *Haworthia arachnoidea* and *H. cymbiformis*. Proc. 5th Intl. Plant Tissue & Cell Culture Plant 145-146.

- Majumdar, S.K. and P.S. Sabharwal, 1970. Culture of *Haworthia* inflorescence *in vitro*. Jour. S. Afr. Bot. 36(2) : 63-68.
- Linsmaier, E.M. and F. Skoog, 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. Physiologia of plantarum 18 : 100-127.
- 中田和男・田中正男, 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.
- Niizeki, H. and K. Oono, 1968. Inducation of haploid rice plant from anther culture. Proc. Japan Acad., 44 : 554-557.
- Niizeki, M. and W.F. Grant, 1971. Callus, plantlet formation, and polyploidy from cultured anthers of *Lotus* and *Nicotiana*. Can. J. Bot., 49 : 2041-2051.
- Nishi, T. and S. Mitsuoka, 1969. Occurrence of various ploidy plants from anther culture and ovary culture of rice plant. Japan J. Genetics 44 : 341-346.
- 大野青春, 1975. イネの葯培養による半数体の作出とその育種の利用. 農業技術研究所報告 26 : 139-222.
- Reynolds, G.W., 1966. The aloes of tropical Africa and Madagascar. The Aloes Book Fund., Swaziland.
- Sacrista'n, M.D., 1971. Karyotypic changes in callus cultures from haploid and diploid plants of *Crepis capillaris* (L.) Wallr. Chromosome (Berl.) 33 : 273-283.
- Sunderland, N., G.B. Collins and J.M. Bunwell, 1974. The role of nuclear fusion in pollen embryogenesis of *Datura innoxia* Mill. Planta, 117 : 227-241.
- 竹内正幸・中島哲夫・古屋力編, 新植物組織培養, 朝倉書店, 1979.