

# 薬培養によるトウモロコシの半数体植物の育成 I

## カルスの形成と根の分化について

村上道夫・高橋信夫・原田賢之

MICHIO MURAKAMI, NOBUO TAKAHASHI and KENSHI HARADA :  
Induction of haploid plant by anther culture in maize I  
On the callus formation and root differentiation

要旨：トウモロコシの薬培養による半数体植物育成の可能性を検討するために、1核期の花粉をふくむ薬を用いて、変更 Miller および変更 White の基本培地に auxins ならびに cytokinins を種々の割合に添加した培地に培養し、培養初期における薬の形態的变化、カルス形成さらに器官分化の様相について追跡調査した。

培養初期における薬形態の変化中、変色枯死する薬は Miller 培地で多く20~40%である。逆に開裂薬は White 培地で多く50~64%に達し、薬の肥大化は Miller 培地上で10~20%に達し、これらよりはいずれもカルス形成は認められない。培養後20日を経過した無変化の薬より、後にカルス形成が認められる。カルス形成率は0.04%できわめて低い。カルスの形態は均一でなく、肥大速度にも差異が認められるが概して緩慢である。カルスの移植培養によって根の分化が認められたが、発根程度ならびにその速度は培養条件によって著しく影響されるが、一般に伸長速度はおそい。半数性カルスならびに根の存在を確認することが出来ず、また茎葉分化が認められなかったが、本実験の結果、トウモロコシのカルス形成ならびに根の分化は可能であり、半数体植物育成の可能性を類推させた。

## I 緒 言

植物の組織培養に関する研究は、White (1934), Skoog (1944), Steward ら (1952) などが各種の作物で成功して以来急速に進展し、今日の組織培養法の基礎が確立されるに至った。組織とくに器官培養に属する薬の培養に関しても、Tulecke (1953) がイチョウの花粉培養から未分化の半数性カルスの作出に成功したが、Guha ら (1964) は *Datura innoxia* を用いて始めて被子植物の薬培養に成功したことを報告した。それ以来、薬培養に関する試験は多くの植物に対して試みられ、花粉分裂ないしは胚の分化機作の解明という生理学的分野はもとより、さらに半数性カルスの形成および半数体植物の育成を目的とした育種上への利用に対しても大きく貢献するようになって来た。

薬培養による半数体育成の研究は、とくにわが国において著しい進展をとげ、現在までに育成された半数体植物も多い。すなわち、タバコ *Nicotiana tabacum* (田中ら1967, '69, 中田ら1968, 中田1969, Bourgin

ら1967, Nitsch ら1968, '69), イネ *Oryza sativa* (Niizekiら1968, 新関ら1968), ブロッコリー-*Brassica oleracea* (西ら1968), アワ *Setaria itarica* (伴ら1970) および *Brassica oleracea* × *Brassica alboglabra* F<sub>1</sub> (亀谷1969, 亀谷ら1969) などで成功事例が報告され、またチャ *Thea sinensis* (勝尾ら1939, 岡野ら1969) を始め、*Datura*, *Solanum*, *Capsicum*, *Brassica*, *Triticum* その他多くの植物で薬よりのカルス形成が認められている。

薬培養による半数体の育成と育種への利用の有効性については、すでに村上 (1967) により指摘され、さらに新関 (1970) は、薬培養は半数性培養細胞系の確立に対して有力な手がかりを与える一方、半数体利用の育種の効果としては、純系の早期育成による育種年限の短縮上きわめて有効であると述べている。さらに雑種花粉より作出した半数体より、後代に目的個体を獲得する選抜効率はかなり高いと考えられるなど、薬培養法による半数体育成の育種学的意義はきわめて大きいと考えられる。しかしながら、現在、本研究は漸

京都府立大学農学部作物学育種学研究室

Laboratory of Crop Science and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Kyoto Prefectural University, Kyoto, Japan.

要旨は昭和46年日本育種学会第39回講演会にて発表

昭和47年7月27日受理

くその緒についたばかりであり、未だ解明されていない問題点があまにも多い。一方、作出された半数体植物も、上述の諸例を除いては不成功に終る場合も多く、本法の育種の利用が普遍的かつ容易に実用化されるためにはなお多くの研究結果にまたなければならぬ。

本実験は上述の見地より、供試植物としてトウモロコシ *Zea mays* L. をとり上げ、薬培養による半数性カルスの形成および半数体植物育成の可能性について検討を加えたものである。トウモロコシは食用ならびに飼料作物としてきわめて重要作物であるが、現在までに薬培養による器官形成を認めたという報告に接していない。本作物の半数体ならびに純系が薬培養によって作出されれば、遺伝子分析上はもとより育種上貢献するところがきわめて大きいことは論をまたない。本実験は、後述するごとく、基本培地組成ならびに添加物質濃度を種々に変化させることによって、トウモロコシ薬よりのカルス形成ならびに器官分化の可能性を追究したものであるが、供試培養薬中、きわめて少数の薬よりカルス形成と根の分化を認め、トウモロコシの半数体育成の可能性を認めることが出来たので、ここにその培養の経過と結果について報告する。

## II 実験材料および実験方法

本実験の供試作物であるトウモロコシ *Zea mays* L. は yellow dent corn (長野1号) と sweet corn (ゴールドエンクロスバンダム) の2品種であり、いずれも1969年より1971年の3年間、本学園場において育成中のものより薬を採集した。開花の7~10日前の雄穂より穎花を摘出し70~80%エチルアルコールで約5秒間浸漬殺菌後、ただちに薬を摘出して培養基上に置床した。予め花粉粒を検鏡し、発育程度が一核期の状態にあるものを供試した。

実験に使用した培地は、変更 Miller および変更 White の基本培地であり、それぞれ第1表に示すとおり培地組成を有している。これらの基本培地にインドール酢酸 (IAA), 2,4-D, カイネチン (KIN) などの植物生長調節物質を、第2表に示すような割合で添加して10種類の培地を作成した。培地は予め IN-HCl および NaOH によって pH5.8に調節し、寒天1%を加え試験管に約 10ml ずつ分注した後、オートクレーブにより1気圧15分の殺菌を行ない、斜面培地を作成した。置床薬は試験管当たり3~5個であり、培養は27°Cの恒温器内で暗黒条件下で行なった。カルス形成ならびに発根の認められた区については後述のごとく培地条件を変化させて継代培養し、カルスの増大ならびに発根の促進をはかった。

Table 1. Composition of basic medium for the anther culture of maize as used in the present experiments

Constituents	White's medium (modified) mg/l	Miller's medium (modified) mg/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	16.5	300.
KNO <sub>3</sub>	80.	1000.
KH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>		1000.
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	290.	374.
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	360.	35.
KCl	65.	65.
KI	0.75	0.8
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1.5	1.5
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1.5	1.6
MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O		4.4
Na-Fe-EDTA		32.
Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	2.	
Glycine	3.	2.
Pyridoxine-HCl	0.1	0.1
Thiamine-HCl	0.1	0.1
Nicotinic acid	0.5	0.5
Saccharose	20000.	30000.

Table 2. Kinds of media supplement with some auxins and cytokinin

No. of media	Basic medium plus		
	2,4-D	IAA	Kinetin (mg/l)
1	1		
2	2		
3	5		
4	1	1	
5	2	1	
6	2	2	
7	5	5	
8	1		1
9	2		2
10	5		5
11	1	0.1	0.1
12	2	0.2	0.2
13	3	0.3	0.3
14	4	0.4	0.4
15	5	0.5	0.5
16	6	0.6	0.6
17	7	0.7	0.7
18	8	0.8	0.8
19	9	0.9	0.9
20	10	1.0	1.0

Basic media are modified White and Miller medium.

### III 実験結果

#### 1. 培養初期における葯の形態的变化

培養葯数は yellow dent corn が1969~'71年の3年間で合計16,132個, sweet corn は1969~'70年の2年間で合計1,740個, 総葯数17,872個である。置床葯は培養3~7日後に次の4種類の形態変化を認めることが出来た。

##### a) 変色葯

葯の形態的变化は認められないが、置床後葯色が褐変し、以後すべて枯死するものである。変色葯の出現頻度は供試品種間に差異は認められないが、Miller 培地は White 培地よりもやや変色率が高い。ただし、同一基本培地では添加物質濃度の差異による影響はほとんど認められない。一方、培養時期によっては著しい差異を示し、9月培養では10%前後の変色率にとどまったが、7月培養のそれは20~40%と高い値を示している。これはおそらく培養時の温度ならびに環境条件の差異にもとづくものであろう。

##### b) 開裂葯

置床後2~3日で葯が開裂し、花粉粒および内容物さらに葯内組織の流出を認めるものである。これは変色葯および次項の肥大葯よりは全く認められない。流出した花粉粒内には多量のデンプン粒が蓄積されるがすべて発芽機能を失っている。開裂葯の出現頻度は供試品種間に差異は認められないが、概して White 培地上の開裂率は Miller 培地上におけるよりも高く、又培養時期によってもかなり様相を異にし、とくに White 培地を用いた9月培養においては、各培地間の開裂率は50~64%の範囲にあってかなり高いが、7月培養のそれは10~36%と低い値を示している。この開裂現象は、葯の開裂部位が培地と接触する直上部より生起し、ことごとく葯が縦裂していることよりみて、培養による葯壁細胞の不均衡肥大によって起こるものと推察される。

##### c) 肥大葯

培養開始後数日で葯が2~3倍に肥大し、その後扁平に変化する葯である。開裂葯の中にも多少肥大するものが認められる。肥大葯内の花粉にはデンプン蓄積が認められるが開裂葯に比べてその量は少ない。肥大率に関して品種間に有意差が認められ。概して yellow dent corn の肥大率は高い。また基本培地間では Miller が、培養時期間では7月培養区が有意に高くあらわれるが、全体として置床葯総数の10~20%が肥大し、肥大葯出現率は比較的低い。これらの葯の変化は開裂葯と同様に auxins および

kinetin の作用によるものと考えられるが、肥大細胞はほとんど培地に接する部位に集中している。肥大葯中の花粉粒の形状には変化は認められない。

##### d) 無変葯

置床後10~15日を経過すれば、ほとんどすべての葯は褐色に変化するが、この頃において、なお置床時の形態を保持する葯のことをいう。この無変葯より隆起した塊状の部分が発生してくるが、後にその一部よりカルス形成が観察される。すなわち、後のカルス形成のためには、葯置床後2週間以上を経過してなお培地上で正常な形態を示す葯においてのみ出現することから、この培養初期の期間を、上述の諸変化を起さしめずに葯を維持することがトウモロコシのカルス形成の前提条件であると考えられる。

#### 2. 培養葯よりのカルス形成

葯置床後、約20日を経過した yellow dent corn の無変葯の中央部あるいは葯の両端部にカルスの形成が開始されてくる。その初期形状は半透明の粘質あるいは白色の小突起状である。カルスの肥大速度はおそく1mm<sup>3</sup>の大きさになるのにさらに15~20日を必要とし、この間に変色枯死するものも多い。この時期における生存カルスによるカルス形成状態は第3表に示すとおりである。生存カルスはきわめて少なく表示する5種の培地に発生するにすぎない。したがってカルス形成率はきわめて低く、全置床葯に対し0.04%にすぎない。この結果からカルス形成に対する有効基本培地ならびに添加物質濃度を決定することは出来ないが、形成されたカルスはいずれも2,4-D をかなり高濃度(3~5mg/l)に含有する培地であり、該濃度における2,4-D はカルス形成に対してかなり有効に作用するものと推察される。

Table 3. Percentages of callus formation from anthers on 5 kinds of media

Kind of media	White (modified)		Miller (modified)		
	D3+I0.3+K0.3	D5	D5+I0.5+K0.5	D5	D5+I1
No. of anthers cultured	301	246	365	191	286
No. of anthers formed callus	1	1	2	1	1
Percentages of callus formation	0.33	0.41	0.55	0.52	0.35
Mark of callus	a	b	c, c'	d	e

D, I and K in the table show 2,4-D, IAA and kinetin respectively, and the figure show concentration (mg/l).

In other media except one in the table were not recognized callus formation.

形成されたカルスは培地条件によってその形態を異にしている。表中に示すカルス a は白色かつ乾燥状態で増殖速度はもっともおそく、 $1\text{ mm}^3$  に達するのに2.5か月を必要とし、カルス基部に褐変が認められる。また b は白色粘質状であり、形成後1か月で増殖を停止し褐変枯死するに至る。これに対してカルス c は、淡黄色かつ粘質で増殖速度がもっともすぐれ、形成1か月後には $5\text{ mm}^3$  の大きさに達し、さらに1か月後には約3倍に増殖する。この場合新生カルスは古いカルス上にこぶ状に生起して塊状カルスを次々と形成する。この第3次新生カルスが $5\text{ mm}^3$  に達した時に後述するごとく根状器官の分化が認められた。一方同一培地の他のカルス c' は、c のように円滑かつ粘質状を呈せず不均一な塊状を示し、初期の増殖状態は c に類似する傾向を示すが形成1か月後に褐変枯死するに至る。この状態はカルス d および e の場合にも全く同様である。なお上述の試験区以外にも微少のカルス形成を認めたが、いずれも枯死するに至った。これらの形成されたカルスが果して花粉粒に起源するか、あるいは他の葯壁細胞に由来するかは現段階では明らかにすることは出来なかった。一方、おそらく花糸の切口より由来すると思われるカルスが、White培地+2, 4-D 3mg/l+IAA0.3mg/l+KIN0.3mg/l区に認められた。カルスの形状は、同一培地で形成された上述のカルス a とよく類似するが、その増殖速度はきわめて大である。カルス形成後は1.5か月ですでに $10\text{ mm}^3$  の大きさに達し、この頃より根状の器官が多数分化するのが認められ、さらに2か月後には根毛の発生が観察された。

以上のように、トウモロコシのカルス形成頻度は、現在までに成功した多くの作物のそれと比べてきわめて低く、カルス形成の困難な作物と考えられるが、カルス形成が器官分化促進の前提条件であると考えられるならば、トウモロコシのもつ本来的な性質によることも勿論であるが、カルス形成機作に関する促進要因の研究は、今後に残された重要な問題点であると考えられる。

### 3. カルスよりの器官分化

カルス a および c を第4表に示すような培地に移植した。移植時のカルスは、表に示すようにほぼ同程度の大きさに分かつし、基本培地および添加物質濃度を種々に変化させてその影響を観察した。移植後の培養も $27^\circ\text{C}$ の暗黒条件下で行なった。移植後大部分のカルスは増殖を開始するが、とくに移植番号 5, 6, 8, 9, 10, 11および13の増殖速度は著しい。この中、5, 6, および13はカルスの増殖がとくに顕著で、根状体の分化はかなりおくれる傾向にあるが、これ以外のカルスは、カ

Table 4. Kinds of media used in second culture and the size of callus

No. of callus in second culture	Mark of callus as used in anther culture	Medium in second culture	Size of callus divided
1	a	M	$3 \times 3\text{ mm}$
2	〃	2M	$2 \times 2$
3	〃	〃	$4 \times 4$
4	〃	I1+K2	$3 \times 2$
5	c	M	$4 \times 4$
6	〃	〃	$4 \times 3$
7	〃	D2	$3 \times 3$
8	〃	〃	〃
9	〃	〃	〃
10	〃	〃	〃
11	〃	〃	〃
12	〃	2M	$3 \times 2$
13	〃	〃	$3 \times 3$
14	〃	〃	$2 \times 2$

a and c of callus show the same mark of callus in table 3.

M and 2M show modified Miller's medium and two times concentration in the medium respectively. D, I and K show 2, 4-D, IAA and kinetin respectively and the figures show concentration (mg/l).

ルス増殖を比較的早期に停止し、根の分化開始が早くあらわれてくるようである。また6区のカルスは、前培養のカルス c に類似した形状ならびに増殖速度をもつに比し、5区のカルス増殖速度はきわめて大で、移植4週間後には5倍以上に増大する。一方13区のカルス増殖は移植後2週間で急速に増殖を停止する。これらの変異は、移植後のカルス増殖に対しては明らかに培地条件の影響が強いことを示すものである。

移植後のカルスより根状体を分化する傾向は第5表に示すとおりである。発根程度ならびにその速度にはかなりの差異が認められるとしても、移植後4週間を経過すればすべてのカルスにおいて根の分化が観察されるようになる。とくに1および4のカルスよりの発根は早く、移植後わずか5日で分化を開始する。発根は、まずカルスの一部に突起を生じ、その部位が伸長して根状体を形成するが、培地に接する部分の発根よりもむしろ上部カルスより多数(約5倍)の分化が認められ上部の発根開始もまた早い。この根は概して極性が認められず任意に伸長をつづけ、培地内に入った根は後に培地外に出る傾向が認められる。ただしいずれの根も培地表面にそって伸びる根が最も長く、1において最長50mmを測定した。根の太さも種々あるが概して細根の伸長量が大きい。

Table 5. Degree of increased callus in second culture and differentiation of young root from callus obtained by anther culture

No. of callus	Degree of increased callus				Intensity of rooting			
	1	2	3	4*	1	2	3	4*
1	—	±	+	+	±	++	+++	+++
2	±	±	±	+	—	±	±	+
3	—	±	+	+	—	±	±	+++
4	—	±	±	±	±	±	±	±
5	—	+	+++	+++	—	±	±	+++
6	—	±	+	++	—	—	—	±
7	+	+	+	+	—	+	+	++
8	+	+	++	++	—	++	+++	+++
9	+	++	++	++	—	±	+	++
10	+	+	++	++	—	±	±	++
11	—	±	++	++	—	±	+	+
12	—	+	+	+	—	±	±	±
13	—	+	++	++	—	±	+	+
14	—	±	—	—	—	±	+	+

\*Figures show weeks after inoculation.

—, ±, +, ++ and +++ in degree of increased callus and intensity of rooting in the table show no increased, just a little increased, 1.5~2 times, about 2 times, above 3 times as much as former size of callus and no rooting, about 5 roots, 10 roots, 20 roots and above 30 roots respectively.

根毛の発生は、根の太さならびに伸長量に関係なく、いずれも発根後3~7日の間に、とくにおそいものも15日以内に発生するが、培地内の根には根毛の発生が認められない。なお9および10のカルスにおいて、培地外に伸長した根が培地表面に接する場合に、その部分が肥大して再びカルス化する現象が観察された。発根後15日以後の根には明らかに通導組織の形成が観察され、根の組織が完成されるものと考えられる。さらに移植後2.5か月後にこれらのカルスおよび根を摘出して再移植を行なったが、暫時増殖と伸長の傾向を示すにとどまり、その後すべて変色枯死し、再移植の効果は認められなかった。

なお表中1, 2および5のように基本培地のみへの移植においても、カルス増殖および発根が認められたが、これはおそらく薬培養時の auxins ならびに kinetin の残留効果にもとづくものであると思われる。

以上の実験で明らかかなように、カルスを同程度に分かつ移植したにもかかわらず、とくに発根状態にかなり顕著な差異が認められ、移植後の培地条件の変化はかなり発根ならびに伸長程度を左右するものと考えられる。しかし、これらの諸区のいずれにおいても分化は発根に止まり、地上部すなわち、茎葉の分化は全

く観察されなかった。この点に関しては、根と地上部との分化機構の間に本質的な差異が存在するためか、あるいは技術的に移植時期や回数の調節により、または培地条件の変化によって地上部分化を促進することが出来るかは、本実験で明らかにすることは出来ないが、今後この点に関する原因追究がなされる必要があると考える。

分化した根の根端部を摘出し、通常のアセトカーミンの押しつぶし法によって核ならびに染色体の観察を行なった。通常根と異なり、生長速度が緩慢であるために、すべての根端細胞で染色体分裂像を観察することは出来ず、多くの区ではほとんど静止核の状態であったが、7区においては明らかに $2n=20$ を観察し2倍体であることが判明した。他の区においては $2n=10$ の半数体を観察することは出来なかったが、核ならびに細胞の大きさより、7区のものに比べて著しく小さい場合(1, 3および8区)と、さらに種々の中間型の存在も認められたことより、半数体あるいは異数体が存在することを推定させるが、本実験では明らかに半数染色体数を同定しえなかったため、上述のカルスが半数性の花粉起源のものであると決定することは出来なかった。

#### IV 考 察

現在までに報告されている薬培養の事例はきわめて多いが、カルスならびに器官形成に対する最適培養条件は植物の種類によってかなり異なり、容易かつ確実に半数体を作成する共通の方法は未だ確立されていない。しかし基本培地の添加物質とくに auxins 濃度に関しては、例えばタバコでは Nitsch ら(1969)は、IAA0.2mg/l+KIN0.2mg/lを、中田ら(1968)は IAA 1.5mg/l+KIN1.5mg/l+ADE10mg/lを必要とするなど、双子葉植物ではかなり低濃度で効果の認められることを報告しているが、これに反してイネでは新関ら(1968)は2,4-D 1~4 mg/lを、トウモロコシでは内宮ら(1971)は NAA4mg/lを必要すると報告し、単子葉植物でのカルス誘導には概して高濃度を必要とするものと思われる、このことは本実験においても2,4-D 2~5 mg/l+IAA0.3~0.5mg/lを要したことよりしても明らかである。また、現在 auxins, cytokinins 以外にココナットミルク(CM)や酵母抽出物(YE)の添加がカルスならびに胚形成に有効である場合(Guha ら:1960, '67)や、活性炭の添加が胚形成を向上させる場合(田中:1971)なども報告されているので、添加物質の種類ならびにその効果もかなり多岐にわたるものと考えられる。一方、基本培地の種類に関しては、単子葉植物ではイネ(新関ら:1970)、ア

ワ (伴ら:1970) にみられるように変更 Miller の使用が多く、他に White や Murashige & Skooh 培地を用いる場合もあるが、本実験においては、変更 Miller および変更 White 培地間に明らかな差異は認められないが、やや前者の方がトウモロコシのカルス誘導に有効である傾向が認められた。

カルスまたは胚形成に有効であると考えられる花粉粒の発育程度に関しては、新関 (1970) が既往の諸成績から指摘しているように、多くの植物では4分子期から1核期にかけての花粉粒が最適であると思われる。これに対して *Brassica* の F<sub>1</sub> において成熟花粉よりカルス形成に成功した例 (亀谷:1967) があり、そのステージの決定については、トウモロコシにおいても1核期前後より成熟花粉に至る発育の諸段階の培養を実施して検討しなければならない。

カルス形成と器官形成との関係、すなわち再分化とその前提としてのカルス脱分化の必要性についても多くの論議がなされている。イネなどにみられるように、概して脱分化する経路をとるものが多いが、*Datura* やタバコのようにカルスを経過せずに直接胚形成を行ない、50~70%の高い幼植物形成率を示す場合があり、一般に後者では幼植物形成までの期間が著しく短縮されるとともに、Guha ら (1967) が指摘するように染色体数の変異も少なく、育種的に有効的であると考えられる。しかしトウモロコシを使用した本実験においては器官形成はすべて脱分化を経過しており、カルスを形成せずに直接培養薬より発根するものは全く認められない。

現在、薬培養において形成されるカルスは、花粉粒、薬壁組織および花糸の切口などより発生することが知られ、えられたカルスまたは幼植物が花粉粒起源であるか、他の薬組織から由来するかについてはとくに検討する必要がある。このために従来より *Datura innoxia* において細胞の形態または特性と染色体の判定により、またタバコにおいては薬内花粉の追跡によって、カルスの花粉粒起源であることを立証している。本実験においては、既述のごとくカルス形成数がきわめて少なかったために、培養の初期の細胞学的観察を行なうことが出来ず、再分化後の器官の染色体鑑定により決定しようと試みたが、分化根の伸長が緩慢で、明らかな染色体像は1試料を除いて観察しえなかった。しかしすでに述べたように、細胞乃至は核の状態ならびに大きさより、半数性あるいは異数性核の存在を推測することが可能であり、形成カルスのすべてが花粉起源でないと速断することは出来ない。しかし、トウモロコシにおいてはとくに鑑別が困難であると思われるので、今後さらに、技術的方法の改善が望まれ

ると考える。さらに、トウモロコシにおいては、上述のようにカルス形成までに4~8週間の期間を必要としているが、これは従来の事例に比してかなり長い。したがってカルスの早期形成のために、さらに進んで花粉粒よりの直接胚分化のために、より広い範囲の培地条件を設定して検討を加えなければならないと考える。

カルスの形成率に関して新関ら (1968) は、イネで平均4.0%、亀谷 (1969) は *Brassica* で平均6.1%と概して低い値であると報告している。一方勝尾 (1969) ならびに著者ら (未発表) は、チャで平均70%以上の高率を観察しているように、植物の種類によって、カルス形成に難易が認められるが、本実験におけるトウモロコシのカルス形成率は最大で0.5%、平均0.04%ときわめて低い値を示すにすぎない。内宮ら (1971) もトウモロコシにおいては1%未満にとどまっている。両者に培地条件の差異はあるとしても、これらの結果よりすれば、従来の方法によってはトウモロコシの薬培養によるカルス誘導はきわめて困難であると考えてよいであろう。しかしトウモロコシが本質的に脱分化乃至は再分化の起り難い作物であるか否かは、供試花粉の発育程度の問題、さらには添加物質の種類を検討することによって決定されるべきであろう。

さらに本実験においては、カルスよりの器官分化は、発根にとどまり、茎葉などの地上部の分化は全く認められなかった。カルスより根および茎葉を分化する能力自身遺伝的支配形質であるとも考えられるが、長期間の培養によって、培養中の細胞内に、器官の再生力を減退せしめるような何らかの作用が働くことも十分考えられる。このためには、器官の早期分化を計るための培養方法乃至は培養期間の長さもまた十分に考慮しなければならないだろう。従来より、一般に器官形成に関しては、再分化能力を遺伝的に保有するカルス細胞に対して、培地中の auxins 濃度を下げるかまたは auxins を除き、逆に cytokinins 濃度を高め、さらに有機態のN含量を増加することによって器官分化を促進しうるとされている。以上の観察より本実験の結果を考察すれば、移植時における auxins の残留効果による影響、カルス形成より移植までの期間の長すぎることに起因する再分化能力の減退、さらには移植時における添加物質濃度の不適正などが考えられ、これらの諸要因が複合的に作用する結果、十分な再分化を招来しえなかったものと推察される。また、たとえ根の分化と茎葉分化の生理的機作の間に何らかの差異が存在するとしても、これらの差異は本質的なものとは考えられない。したがって本実験において、一応トウモロコシのカルス脱分化と、それよりの根の分化

に成功したことは、今後培地条件ならびに培養方法の改良如何によっては地上部分化の可能性も十分期待することが出来ると考える。

以上の実験を通じて、トウモロコシの薬培養におけるカルス脱分化と器官再分化に関する一応の知見をえたが、他の多くの試験でも指摘されているように、本試験においても未解決の問題点がきわめて多い。とくにカルス形成率の向上のための基本培地ならびに添加物質の種類と濃度に対する再検討はもとより、供試花粉の発育段階との関係を追究する必要がある。さらにまた脱分化と再分化機構を明らかにするとともに、分化阻害要因を解明することによって、より有効な培養方法を確立しなければならない。

### 引用文献

- 1) 伴 義之・土井 修・国分禎二・宮司佑三(1970) : 育雑, 20 別冊 1 : 59—60.
- 2) Bourgin, J. P. and J. P. Nitsch (1967) : Ann. Physiol. Vég., 9 : 377—382.
- 3) Guha, S. and S. C. Maheshwari (1964) : Nature, 204 : 497.
- 4) ————— (1966) : Nature, 212 : 97—98.
- 5) ————— (1967) : Phytomorphology, 17 : 454—461.
- 6) 亀谷寿和 (1967) : 育雑, 17 別冊 2 : 107.
- 7) ————— (1969) : 化学と生物, 7 : 560—562.
- 8) —————・日向康吉 (1969) : 育雑, 19 別冊 1 : 90—91.
- 9) 勝尾 清 (1969) : 育雑, 19 別冊 1 : 99—100.
- 10) 村上寛一 (1967) : 農園, 42 : 971—972.
- 11) 中田和男 (1969) : 育雑, 19 別冊 2 : 123—124.
- 12) —————・田中正雄(1968) : 遺雑, 43 : 65—71.
- 13) ————— (1968) : 葉たばこ研究, 47 : 81—85.
- 14) ————— (1968) : 農園, 43 : 685—686.
- 15) ————— (1968) : 育雑, 18 別冊 1 : 55.
- 16) ————— (1969) : 育雑, 19 別冊 1 : 97—98.
- 17) 新関宏夫 (1970) : 育種学最近の進歩. 第11集 : 45—51.
- 18) Niizeki, H. and K. Oono (1968) : Proc. Japan Acad., 44 : 554—557.
- 19) 新関宏夫・大野清春 (1968) : 育雑, 18 別冊 1 : 57—58.
- 20) ————— (1968) : 育雑, 18 別冊 2 : 107.
- 21) ————— (1970) : 育種学最近の進歩, 第11集 : 69—81.
- 22) 西 貞夫・豊田 努・大沢勝次 (1968) : 園芸学会講演要旨 (昭和43年10月) : 138—139.
- 23) —————・大沢勝次・豊田 努 (1970) : 育雑, 20 別冊 1 : 65—66.
- 24) Nitsch, J. P. and C. Nitsch (1969) : Science, 163 : 85—87.
- 25) ————— and S. Hamon (1968) : Comp. Rend. Soc. Biol., 162 : 369—372.
- 26) 岡野信雄・淵之上康元 (1969) : 育雑, 19 別冊 1 : 101—102.
- 27) Skoog, F. (1944) : Amer. Jour. Bot., 31 : 19—24.
- 28) Steward, F. C., C. M. Caplin and F. K. Millar (1952) : Ann. Bot. N. S., 16 : 57—77.
- 29) 田中正雄 (1971) : 育雑, 21 別冊 1 : 126—127.
- 30) —————・中田和男 (1967) : 育種学会第9回シンポジウム講演要旨 (1) : 11—15.
- 31) ————— (1969) : 育種学最近の進歩, 第9集 : 23—32.
- 32) Tulecke, W. (1953) : Science, 117 : 599—600.
- 33) White, P. R. (1943) : A Handbook of Plant Tissue Culture.
- 34) 内宮博之・亀谷寿昭 (1970) : 薬培養シンポジウム講演要旨 : 10—13.

### Explanation of plate

1. Anthers dehisced in 3 days after placing on medium.
2. Callus formed in 2 months after placing on medium.
3. 5. 7. 11. 13. 15.  
Callus transplanted in 1 week after placing on second medium. Number of each figure in order show callus No. 1, 5, 7, 8, 9, 10 and 12 in the table 4 and 5 respectively.
4. 6. 8. 10. 12. 14. 16.  
Roots differentiated from transplanting callus in 1 month after placing on second medium. Number of each figure in order show callus No. 1, 5, 7, 8, 9, 10 and 12 in the table 4 and 5 respectively.

### Summary

This experiment was made a trial for investigate possibility on induction of haploid plant by anther culture in maize (*Zea mays* L.). Several anthers with uni-nucleate stage of pollen from male flowers, 7~10 days before heading, were placed on the medium. The basic media were prepared modified White's medium and modified Miller's medium containing various concentration of 2,4-D, IAA and kinetin. The media were adjusted to pH 5.8.

Among the morphological variation of anthers placed on the media, anthers changed brown and died after a while were amounted about 20~40% of all placed ones on Miller's media, and dehiscent anthers and enlarged ones were observed 50~64% on White's media and 10~20% on Miller's media respectively. Primordium of callus was formed in the ends of anthers in about 20 days after anther culture, and decided callus formation was recognized in extremely few anthers in 4~8 weeks after anther placing. The percentage of callus formation was about 0.04%. The callus formed by anther culture had not uniformity in the

size and colour, and generally the state of callus increased was very inactivity. Callus formed on several media were transplanted on modified Miller's media in supplement with various auxins and kinetin. Degree of rooting from callus and its velocity of growth were susceptible to influences from the conditions of media. In general, state of rooting was very inactivity on all media and the optimum constituents of media for root differentiation were yet to be determined through result of above experiments. Roots with haploid number of chromosomes were well not ascertained and the differentiation of leaves and stem from callus were not recognized to the last of these anther culture.

From these investigation mentioned above, it was recognized that it is difficult to make the haploid plant of maize by anther culture. Our experimental results show, however, that the callus formation and root differentiation from callus were successful. We expect to establish, therefore, available method for induction of haploid maize by improving the method of anther culture.



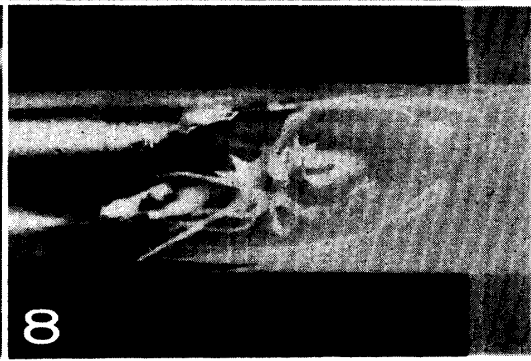
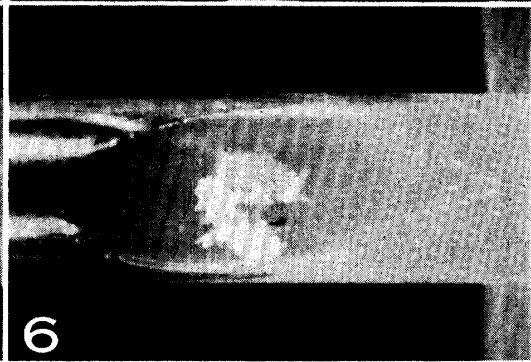
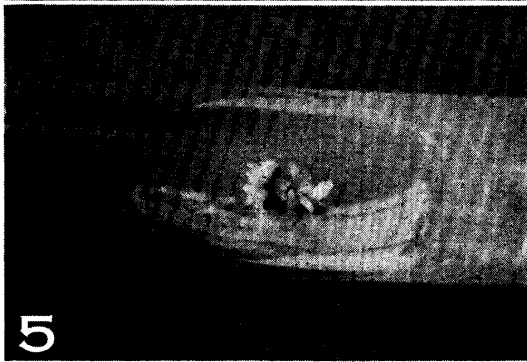
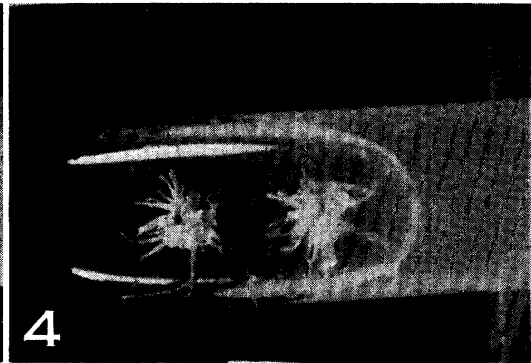
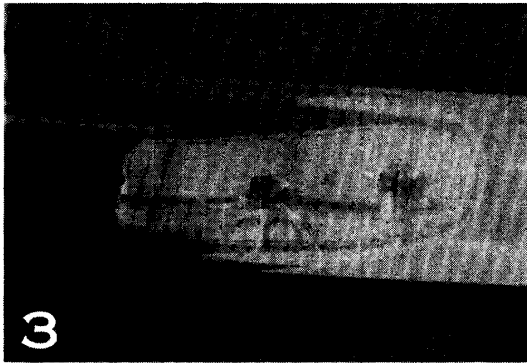
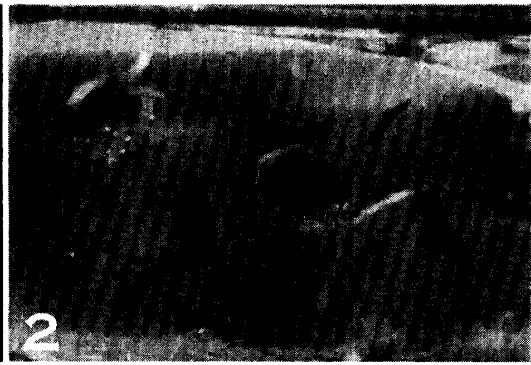
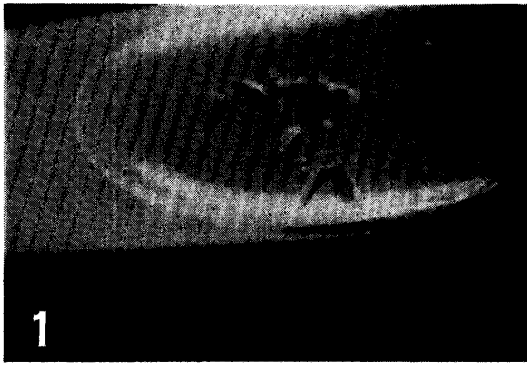


Plate II

