

タバコにおける花粉からの不定胚発生

有賀小海*

(1984年12月12日受理)

1. はじめに

半数体は染色体を倍加することによってただちに純系を得ることが可能であるため、半数体の利用によって交雑育種における育種年限の短縮が期待できる。Guha と Maheshwari¹⁾ によって *Datura innoxia* の薬培養による花粉起源の半数体作出が報告されて以来、薬培養は半数体作出の手段として注目され、多くの研究がなされてきた。現在までに花粉起源の半数体植物が得られた種は20科100種をこえている²⁾。

花粉から植物体が復原する経路には2種類ある。1つは花粉から直接不定胚発生を経て発芽個体へと発育する経路である。この経路では、一般的に効率よく半数体植物が復原し、また遺伝的変異もこの間にほとんどおこらない。他の1つは花粉からカルスが形成された後、不定芽と不定根とを分化する経路である。この場合は、カルスを経ることにより遺伝的変異を生じやすい。また、すべてのカルスから植物体が再分化するわけではないため、植物体形成の効率も悪い。したがって、実際の育種に利用するためには、不定胚発生を経て植物体が復原することが望ましい。しかしながら、花粉からの不定胚発生が報告されている種は、主としてナス科、アブラナ科などに属する少数の種に限られている。なぜ、特定の種のみで不定胚が形成されるのかについては、現在のところまったくわかっていない。より多くの種において不定胚発生を経て半数体植物を得るために、花粉からの不定胚発生について、それに関与する諸要因や培養条件などを解析する必要があると考えられる。

薬培養においては、不定胚発生が培養薬内で進行するため、不定胚発生に関与する要因を詳細に究明すること

は困難である。最近、タバコにおいては、薬採取直後に単離した花粉の培養が可能となった^{3,4)}。このような花粉培養法は、培養薬の影響を除くことができるため、不定胚発生に関与する要因についての解析的な研究のための有効な手法である。

著者らは、薬培養および花粉培養を用いて、タバコ (*Nicotiana tabacum* L.) における花粉からの不定胚発生の機構に関して研究を行い、若干の知見を得ているので、以下それらを中心に述べる。

2. 花粉起源の不定胚の形態的特徴

1 細胞期後期の花粉を含む薬を無機塩類と蔗糖を添加した寒天培地に置床すると、薬内の花粉は、植物体上で発育する花粉と同様に、ただちに花粉体細胞分裂を行い、生殖細胞と栄養細胞とからなる2細胞の花粉 (Fig. 1 A) となる。一部の花粉は、培養薬内で花粉としての発育をその後も継続して発芽し、花粉管を伸長する。一方、発芽せずに残った花粉の一部は、培養10日目頃に不定胚形成への細胞分裂を開始する。この際、生殖細胞は1~2回分裂するのみで分裂を継続しないが、栄養細胞が分裂を継続して不定胚形成が進行する (Fig. 1 B)。

花粉壁内で20細胞程度になった不定胚をアセトカーミンで染色すると、細胞質が濃染される細胞群とほとんど染色されない細胞群とが認められる。その後、細胞質が濃染される細胞群の側で花粉壁が破れ、外に出た細胞群は活発に分裂を続けて球状胚を形成し、花粉壁内に残った細胞群は不活化して小突起になる (Fig. 1 C)。花粉から形成された球状胚には、このような小突起が必ず認められる。その後、不定胚は心臓型胚へと発育するが、その際小突起の反対側に子葉が分化し、小突起側は必ず根極側となる。したがって、この小突起は受精胚の胚柄に相当し、不定胚の極性決定に関与すると考えられる。

不定胚は受精胚と同様に、心臓型胚から魚雷型胚 (Fig. 1 D) を経て発芽個体へと発育する。また、発育速度も受精胚とはほぼ等しい。しかしながら、球状胚が形成されるまでには、受精胚に比べて長い時間を要する。

* Koumi ARUGA: Pollen Embryogenesis in *Nicotiana tabacum* L.

東京大学農学部育種学研究室 (〒113 東京都文京区弥生1-1-1)

Laboratory of Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Tokyo (1-1-1, Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113)

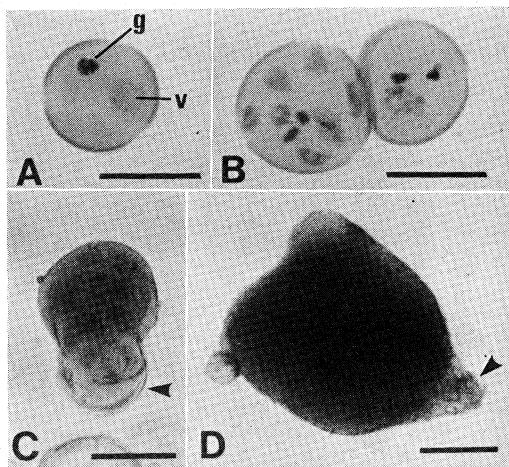


Fig. 1. Development of pollen embryos.

A : Bicellular pollen grain with generative (g) and vegetative (v) nucleus. B : Multicellular proembryo. C : Early globular embryo. D : Torpedo shaped embryo. Arrows indicate the suspensor-like protuberances.

Bar line represent 20μm (A-C), 50μm (D).

すでに述べたように、花粉からの不定胚発生の際に、主として栄養細胞が分裂し、生殖細胞はほとんど分裂しない。そこで、上述の胚柄状小突起部分が、細胞分裂が不活発な生殖細胞に由来する可能性があることも考えられる。著者らはこの問題を検証するために、コルヒチンを用いて、生殖細胞と栄養細胞という異なる2細胞を形成しない花粉を作出し、不定胚発生を誘導することを試みた。

1細胞期後期の花粉を含む薬をコルヒチン溶液に浸漬し、コルヒチンを薬内に浸透させた後薬培養を行うと、花粉体細胞分裂が阻害され染色体数が倍加された1細胞の花粉が形成される。このような花粉も培養10日目頃には不定胚形成への細胞分裂を開始するが、その際まず均等な2細胞となる。その後その両方の細胞が分裂を継続して不定胚が形成される。こうして形成された二倍性の不定胚にも胚柄状小突起が認められた。この結果は、不定胚の極性は、不定胚形成の初期に細胞分裂が不活発な細胞が存在するか否かとはかわりなく生じることを示すと考えられる。

ニンジンの培養細胞からの不定胚形成においては、最初に小細胞塊が形成され、その一部の細胞の活発な分裂によって不定胚本体が発育し、残った細胞塊が付着した側が根極側になること^{5,6)}、また、細胞塊形成の際の細胞の増殖速度は比較的おそく、不定胚本体が発育する際

には急速になること⁶⁾が明らかにされている。著者らの観察結果をこれらの報告と照らしあわせると、花粉からの不定胚形成の最初の20細胞程度までは、ニンジンの場合の小細胞塊形成の過程に相当すると考えられる。ニンジン以外にもいくつかの種において、単細胞またはプロトプラストからの不定胚形成が報告されているが、その際にもまず小細胞塊が形成され、その一部から不定胚本体が発育することが観察されている^{7,8)}。したがって、このような過程を経ることは不定胚形成の際に普遍的なことと考えられる。すなわち、花粉からの不定胚に認められた胚柄状小突起は、不定胚形成が小細胞塊形成の過程を経たために形成されたものであり、また、花粉からの不定胚形成が一定の極性をもって進行し得るのは、このような過程を経ることによると考えられる。

3. 不定胚発生の誘導

すでに述べたが、本実験の薬培養においては不定胚形成への細胞分裂は培養10日目頃に始まった。したがって、花粉はこの間に不定胚発生を行うものへとその機能を変換すると考えられる。しかしながら、薬採取直後に単離した花粉を直接通常の培地で培養しても不定胚は決して形成されないので、通常の培地中ではこのような機能変換はおこらないと考えられる。最近、薬採取直後に単離した花粉を蒸留水または糖を添加しない培地で数日間培養した後、通常の培地へ移植することによって不定胚が形成されることが、タバコなどについて報告された^{3,4)}。この結果は、花粉の機能変換は糖飢餓によって誘導されることを示唆すると考えられている。

著者らも同様の実験を行った結果⁹⁾、糖を添加しない培地で花粉を数日間培養した後、通常の培地へ移植した場合にのみ不定胚が形成され、不定胚発生は糖飢餓によって誘導されることが確認された。この培養方法により、1細胞期後期から2細胞期中期(澱粉粒蓄積直前)までの広い範囲の発育段階にある花粉において不定胚発生を誘導することができた。また、0.1g/lというごく微量の蔗糖(通常は20g/l)が存在しても不定胚発生の誘導は阻害された。

培養中の花粉を観察すると、蔗糖を添加した培地中では、花粉は、植物体上の花粉と同様に花粉体細胞分裂の直後に生殖核においてDNA合成を行う。その後澱粉粒を蓄積して発芽し、配偶体の発育を継続していることが認められる。一方、蔗糖を添加しない培地中では、花粉における澱粉粒の蓄積、花粉発芽などはまったく観察されない。蔗糖がない場合には、花粉の配偶体の発育は停止すると考えられる。

タバコの薬培養初期の花粉の観察から、Bhojwani

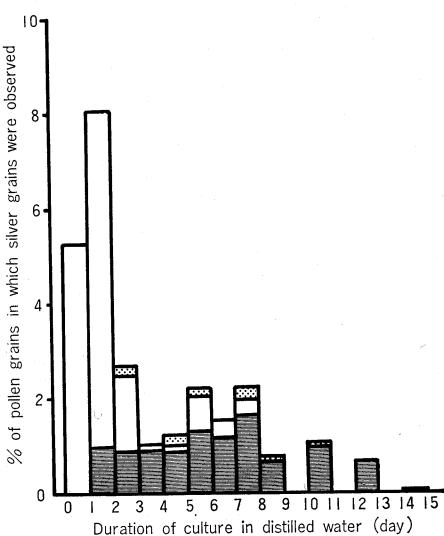


Fig. 2. Incorporation of ^3H -thymidine into pollen grains cultured in distilled water.

Open bar, striped bar and dotted bar indicate the percentage of pollen grains in which silver grains were observed in the generative nucleus, the vegetative nucleus and both nuclei, respectively.

ら¹⁰は、不定胚へと発育する花粉においては、花粉の正常発育の際にみられるような RNA およびタンパク含量の増大がおこらないことを、また、Dunwell と Sunderland¹¹は、花粉としての細胞内小器官の発達が認められないことを報告している。これらの報告からも、培養初期に花粉の配偶体的発育が停止することが示唆される。すなわち、花粉からの不定胚発生における最初の過程は花粉における配偶体的発育の停止であると考えられ、また、花粉からの不定胚発生の誘導の際の糖飢餓の役割は、花粉の配偶体的発育を停止することであると考えられる。

さらに、 ^3H -thymidine を添加した蒸留水で花粉を培養し、ミクロオートラジオグラフを作成して観察すると、Fig. 2 に示すように、栄養核への ^3H -thymidine のとりこみが認められる⁹。植物体上で発育する花粉においては栄養核での DNA 合成は決しておこらないことが知られている¹²。また、前述のように不定胚形成の際は主として栄養細胞が分裂する。したがって、ここで観察された栄養核における ^3H -thymidine のとりこみは不定胚形成への新たな DNA 合成を示すと考えられる。すなわち、タバコの花粉は糖飢餓下において、配偶体的発育の停止にひきつづいて不定胚形成への発育の第一歩とも言える DNA 合成を行うと考えられる。

糖飢餓によって新たな DNA 合成が誘起されることはない例がない。したがって、タバコの花粉は内生的にそのような能力をそなえているものと推察される。花粉の内生的な要因についての研究は、現在までのところまったく行われていない。この問題についての詳細な研究が望まれる。

4. 不定胚形成

前述のように、タバコの花粉は糖飢餓下で不定胚形成への DNA 合成を行う。しかしながら、蒸留水で培養を続ける限り、細胞分裂を開始することはない。これらの花粉は、無機塩類と蔗糖に加えてグルタミンなどのアミノ酸を添加した培地に移植されるとただちに細胞分裂を開始して不定胚へと発育する¹³。しかし、ここで添加したアミノ酸のかわりに、それに相当する量のアンモニウム塩を添加した場合には花粉は細胞分裂をしない。また、いったん細胞分裂を開始すればその後はアミノ酸を必要とせずに不定胚形成は進行する。すなわち、花粉からの不定胚形成の初期の細胞分裂の際にアミノ酸が必須であると考えられる。

アミノ酸としては、著者らの実験では、グルタミンのほかアスパラギンが有効であった。その他、グルタミ酸、アスパラギン酸、プロリンなども効果的であることが報告されている¹⁴。

不定胚発生に対するアミノ酸の重要性はすでに何人かの研究者によって指摘されている^{15,16}。しかしながら、アミノ酸が不定胚発生にどのように関与するのか、また、不定胚発生のどの時期に特に影響するのかなどについてはほとんど明らかではなかった。著者らの実験から、これらの点について知見を得ることができた。

一方、培地の pH 値も不定胚形成に重大な影響を与えることが明らかとなった。著者らは一定期間の薬培養の後に花粉を単離し、花粉培養中の不定胚の発育を観察したところ、薬培養期間によっては不定胚形成が約20細胞程度で停止することを見い出した。これらはその後、個々の細胞が肥大し壁も厚くなり、不整形の細胞塊となる。この原因を究明したところ、それらの場合、培地の pH 値が大きく上昇していることを認めた (Fig. 3)¹⁷。そこで種々の pH 値の培地で花粉培養を試みたところ、高い pH 値 (pH 6.8以上) の培地中では不定胚形成の進行が約20細胞期で停止することが明らかとなった¹⁸。

しかしながら、高い培地 pH 値は約20細胞期以上の細胞分裂の継続を阻害するものであり、約20細胞期までは培地 pH 値にかかわりなく進行する。この事実は、不定胚形成は約20細胞期を境に、生理学的に異なることを示すと考えられる。すでに述べたように、不定胚形成

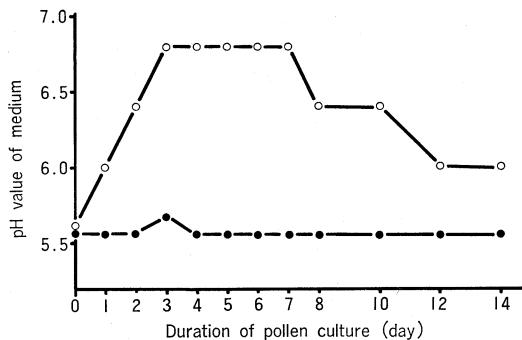


Fig. 3. Changes in pH value during pollen culture.

○ : Pollen grains isolated after 4 days of anther culture. Embryoid formation was arrested at about 20-cell stage. ● : Pollen grains isolated after 9 days of anther culture. Embryoid formation proceeded normally and seedlings were formed.

の過程は細胞塊形成と不定胚本体の発育との2つの過程に分けられる。ここで明らかとなった生理学的に異なる2種類の過程がそれぞれに対応することは十分考え得るところである。

5. 培養薬の働き

以上述べたように、タバコの花粉からの不定胚発生は糖飢餓によって誘導され、また不定胚形成の細胞分裂を開始する際にはアミノ酸が必要である。しかしながら、タバコの薬培養の際は、無機塩類と蔗糖のみの単純な培地における連続的な培養で、多数の不定胚が形成される。この事実は、不定胚発生の各過程に必要な要因が培養薬から与えられていることを示すと考えられる。

培養薬内の可溶態糖（蔗糖、果糖、ブドウ糖）の量は、置床後ただちに減少し（薬1個当たり3種の糖の合計量、置床時約33μg、2日目約8μg）、培養6日目までは少ない状態が続く。その後培養8日目には、培養薬内の蔗糖が増量した。著者らの組織学的観察から、薬組織は培養7日目頃に完全に退化することが明らかになっているので、この增量は培地に添加された蔗糖の薬内への浸透によるものと考えられる。したがって、それ以前には培地中の蔗糖の薬内への浸透が薬壁によって阻害されており、それによって薬室内に糖飢餓状態がもたらされ、不定胚発生が誘導されると考えられる。また、不定胚形成への細胞分裂に先立って、培養8日目頃に培地成分が薬内に浸透し、薬室内が再び栄養分に富むようになったことは、その後の不定胚形成のために好都合であろう。

不定胚形成の初期の細胞分裂に必須であるアミノ酸

も、培養薬から供給されると考えられる。著者らは薬の遊離アミノ酸の分析を行い、培養薬においては、培養が進むに従い、不定胚形成に有効であるとされたグルタミンとアスパラギンが増量することを観察している。特に、不定胚形成の細胞分裂が開始される時期に当たる培養10日目には、この2種のアミノ酸が総遊離アミノ酸量の約70%を占めるに至った。また、薬の新鮮重当たりのこれらのアミノ酸量も、花粉培養の際必要とされた量よりはるかに多いものであった。

以上述べたように、タバコの薬培養においては、花粉からの不定胚発生の各過程に応じて、必要とされる諸要因が培養薬から与えられ、不定胚発生の進行が保証されている。培養薬がこのような働きをすることが、タバコの場合単純な培地における薬培養で花粉から多数の不定胚が形成される主要な原因の1つであることは明らかである。現在までに不定胚が得られていない種のいくつかにおいては、その原因が、培養薬がこのような働きをしないという点にあるのではないかと考えられる。したがって、より多くの種において不定胚を得るためにには、それぞれの種の培養薬内の諸変化を研究することも必要であると考えられる。

6. おわりに

以上述べてきた知見を総合し、著者らはタバコの花粉からの不定胚発生は以下の4過程の連続的な進行であると考えている。すなわち、(1) 糖飢餓によってひき起こされる花粉の配偶的発育の停止の過程、(2) 花粉の内生的な要因に依存しておこる不定胚形成への新たなDNA合成の過程、(3) 初期にはアミノ酸を必要とし、培地のpH値の変動にはほとんど影響されず、発育速度が比較的おそい細胞塊形成の過程、(4) 速い細胞分裂によって進行し、アミノ酸は必要としないが、培地のpH値が高い場合には細胞分裂の継続が阻害される不定胚本体の発育の過程、である。さらに、タバコの薬培養においては、それぞれの要因が必要な時期に培養薬によって供給され、不定胚発生の進行が促されていることを示した。

タバコに関して明らかとなった各要因がそのまま他の植物にあてはまるとはもちろん考えにくい。また、花粉の内生的な要因など解明すべき問題がいくつか残っており、タバコにおいても研究は十分とは言えない。しかしながら、花粉からの不定胚発生は同一条件下で自律的に進行するものではなく、それぞれの要因が必要とされる時期に順次与えられることにより、はじめてすみやかに進行するものであるという点を念頭において、きめこまかい培養を試みることにより、さらに多くの種において

花粉起源の不定胚を得る可能性は十分あるであろう。

本稿を執筆するにあたり有益な御助言をくださいました中島哲夫東京大学農学部教授に感謝の意を表します。

文 献

- 1) Guha, S., S.C. Maheshwari, 1966. *Nature*, **212** : 97-98.
- 2) Maheshwari, S.C., A.Rashid, A.K. Tyagi, 1982. *Am. J. Bot.*, **69** : 865-879.
- 3) Ghandimathi, H., 1982. In "Plant Tissue Culture" (ed. by Fujiwara, A.), p. 527-528. Maruzen, Tokyo.
- 4) Imamura, J., E. Okabe, M.Kyo, H.Harada, 1982. *Plant Cell Physiol.*, **23** : 713-716.
- 5) Backs-Hüsemann, D., J.Reinert, 1970. *Protoplasma*, **70** : 49-60.
- 6) Fujimura, T., A. Komamine, 1980. *New Phytol.*, **86** : 213-218.
- 7) Poirier-Hamon, S., P.S. Rao, H.Harada, 1974. *J. Exp. Bot.*, **25** : 752-760.
- 8) Dorion, N., Y. Chupeau, J.P. Bourgin, 1975. *Plant Sci. Lett.*, **5** : 325-331.
- 9) Aruga, K., T. Nakajima, K.Yamamoto, 1985. *Jpn. J.Breed.*, **35** : 50-58.
- 10) Bhojwani, S.S., J.M. Dunwell, N. Sunderland, 1973. *J.Exp. Bot.*, **24** : 863-871.
- 11) Dunwell, J.M., N. Sunderland, 1974. *J. Exp. Bot.*, **25** : 363-373.
- 12) Aruga, K., K.Yamamoto, T.Nakajima, 1982., In "Plant Tissue Culture" (ed. by Fujiwara, A.), p. 537-538, Maruzen, Tokyo.
- 13) Aruga, K., T. Nakajima, 1985. *Jpn. J.Breed.* in press.
- 14) 今村 順, 1981. 組織培養, **7** : 335-341.
- 15) Nitsch, C., 1974. *C.R. Acad. Sci. Paris, D*, **278** : 1031-1034.
- 16) Wernicke, W., H.W. Kohlenbach, 1977. *Z.Pflanzenphysiol.*, **81** : 330-340.
- 17) Aruga, K., T. Nakajima, 1981. *Jpn. J.Breed.*, **31**, suppl. 2 : 54-55.