

シダ植物, *Pteris cretica* の葉組織由来 再分化植物における核型特性の不変性

武井雅宏

大分大学教育学部

(〒870-11 大分市旦那原 700)

(1991年7月26日受付)

(1991年8月22日受理)

組織培養によって *Pteris cretica* (2倍体, $2n=58$) の葉由来カルスから再分化した胞子体の核型特性の観察を行った。

今回の培養に用いた外植片供与体では、染色体の数的及び形態学的特性が不変的であった。他方、培養で得られた再分化胞子体中の約95%の個体が供与体と同じ正2倍体 ($2n=58$) で、残りの約5%の個体が低2倍体 ($2n=57$) であった。極く少数の正2倍性再分化胞子体は、外植片供与体の subterminal 型や terminal 型の染色体とは僅かに異なる形状を示す数個の同型染色体を有し、微細な構造変化が染色体に生じたことを示していた。しかし、大多数の正2倍体の核型特性は外植片供与体の核型特性と変わらなかった。

以上の観察結果から、*P. cretica* の葉由来組織の培養過程では、軽微な染色体変異が生じるのみで、外植片の核型特性が不変的に維持されるものと結論された。

1. 緒言

シダ植物培養細胞の細胞遺伝学的特性は、*Osmunda cinnamomea* の配偶体由来カルス細胞¹⁾、*O. japonica* の胞子由来カルス細胞²⁾、*Pteris vittata* の葉由来カルスからの再分化胞子体³⁾及び *Lepisorus thunbergianus* の葉由来カルス細胞とそれから再分化した胞子体と配偶体⁴⁾で観察されているに止まっている。それらの観察によれば、シダ植物の培養過程では、外植片の染色体の数的不変性が維持されることが多いとされている。しかし、染色体の数的不変性を維持していた *O. japonica* の胞子由来カルス細胞では、多様な構造的変化が染色体に高頻度で生じていることが観察されている²⁾。一方、*L. thunbergianus* の葉由来組織の培養では、全過程を通じて染色体の数的及び構造的な不変性が維持されていることが観察されている⁴⁾。この両観察結果間の相違が、培養に用いた外植片の組織学的特性の違いか、あるいは外植片供与体の種特性の違いのいずれを反映したものであるか明らかでない。筆者は、シダ植物の各種組織の培養過程での核形態学的特性を明らかにする目的で、各種シダ植物の組織培養細胞の核形態学的観察を行っている。本報で

は、*Pteris cretica* 2倍体の幼葉由来カルスから再分化した胞子体の核型特性について報告する。

2. 材料及び方法

今回の培養には、大分県天瀬町の野外に生育していた *P. cretica* 2倍体 ($2n=58$) から採取した幼葉の一部を外植片として用いた。

外植片からのカルスの誘導及び増殖用の培地として、2,4-D (1 mg/l), kinetin (0.5 mg/l) 及び sucrose (30 g/l) を含む MS 寒天培地を用い、カルス細胞の再分化誘起用培地として 2,4-D と kinetin を除いた sucrose (20 g/l) 含有 MS 寒天培地を用いた。その培養手順及び温度、光量等の培養条件は、既報^{4,5)}の *L. thunbergianus* の葉組織培養に準拠した。

再分化胞子体及び外植片供与体からの各種細胞の染色体を観察するためのプレパラートは、*O. japonica* の培養細胞の場合²⁾と同様の手順に従って、フォイルゲン染色—押し潰し法で作製した。

外植片供与体や再分化胞子体の染色体数や核型特性をより正確に把握するために、1植物体当たり3細胞から10細胞について、中期染色体の観察を行った。核型分

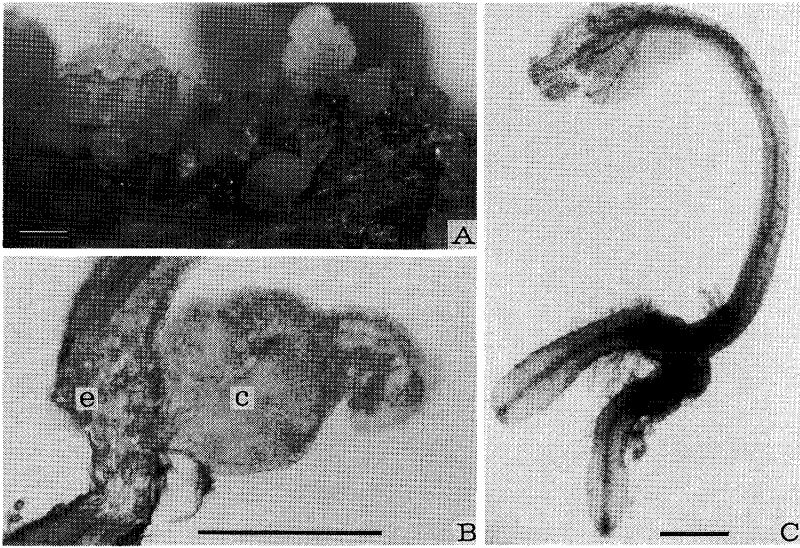


Fig. 1 Photomicrographs showing a regeneration of the whole sporophyte from the leaf tissue of *Pteris cretica* (diploid $2n=58$). A) an explant producing callus cells. B) a lateral section of an explant (e) showing callus cells (c) produced in the epidermal zone. C) a young whole sporophyte regenerated from the callus. This sporophyte was stained by Feulgen reaction. All scales show 0.5 mm.

析のためには、Levanら⁶⁾が提唱した染色体腕比基準に従って、各植物体で観察された中期染色体を median, submedian, subterminal 及び terminal の 4 染色体型に類型した。なお、体細胞分裂各期染色体の形状等を記述するための学術用語は田中⁷⁾に準拠した。

3. 結果及び考察

筆者は、本報と同じ組成の再分化誘導用培地上の *L. thunbergianus* の幼葉由来カルスから完全孢子体と心臓形配偶体とが同時に再分化することを報告した^{4,5)}。一方、White 基本培地に sucrose (20 g/l) のみを加えた培地に移植した *P. cretica* の幼葉由来カルスからは、孢子体のみが再分化することが知られている⁹⁾。今回の観察でも、sucrose を含有した MS 基本培地に移した *P. cretica* の幼葉由来カルスからは、孢子体のみが再分化し、配偶体は再分化しないことが確認された。その培養過程での形態学的特性の概要は、以下の通りであった。

幼葉片をカルス誘導用培地に置床して約 1 ヶ月が経過した葉の表面に多数の瘤状のカルス塊が形成された (Fig. 1A)。それらのカルスは、*L. thunbergianus* の葉由来カルス⁵⁾の場合と同様に、葉表皮細胞から形成されたように見えた (Fig. 1B)。この時期のカルスは細胞が密に結合していて堅かった。一方、培養開始後 2 ヶ月が経過したカルスでは、細胞間の結合が弱く、多様な形状の単離細胞と数個の淡緑色細胞が結合した球状塊が混

在していた。それらの細胞塊の一部は、仮根を形成している等の配偶体的特性を示していた。再分化誘導用の培地に移植したカルスからは、不定形の茎葉体のみが形成され、*L. thunbergianus* での孢子体の再分化過程で観察されている不定胚形成⁵⁾は行われていなかった。その後、それらの茎葉体に葉や根の原基が形成されて多数の完全孢子体となった (Fig. 1C)。

P. cretica の染色体数に関する多数の報告によれば、野外に生育する本種には 2 倍体 ($2n=58$)、3 倍体 ($2n=87$) 及び 4 倍体 ($2n=116$) の 3 種類の細胞学的系統がある⁹⁻¹⁴⁾。しかし、本種の核型特性についての報告はみあたらない。そこで、筆者は、再分化孢子体の核型特性の観察と並行して外植片供与体とその特性も観察した。それぞれの核形態学的特性は以下に示す通りであった。

a) 外植片供与体

P. cretica の核型特性に関して、これまでに報告されていない。今回の培養に用いた 2 株の外植片供与体で観察された染色体の数、腕比、染色度合等に関する形態学的特性は、均質的で、以下の通りであった。

体細胞分裂の中間期から前中期までの染色体は、全体が均質に染色される分散型染色体の特性を示していた。

体細胞分裂中期で、58 個の染色体が観察された (Fig. 2A)。それらの染色体は、長さが約 $5\mu\text{m}$ から約 $2.5\mu\text{m}$ の範囲にあって (Figs. 2A, 3)、各染色体間で漸次

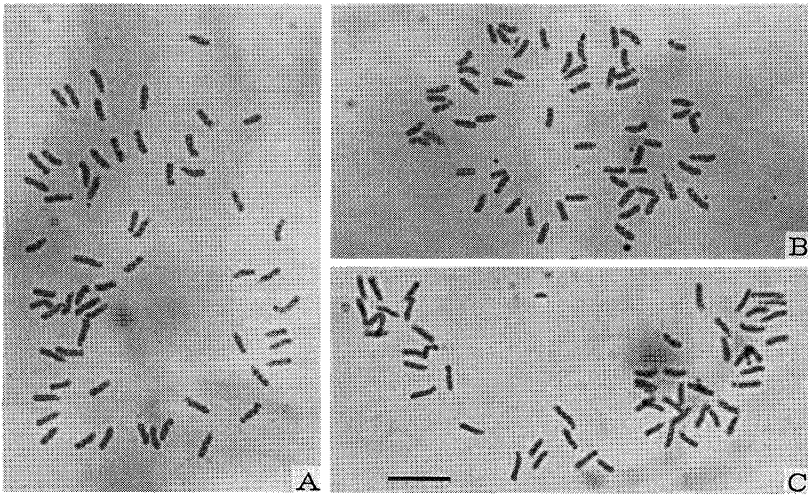


Fig. 2 Photomicrographs of somatic metaphase chromosomes of an explant donor and sporophytes regenerated from leaf calli of *Pteris cretica* (diploid, $2n=58$). A) $2n=58$ chromosomes in an explant donor. B) $2n=58$ chromosomes in the regenerated sporophyte. C) $2n=57$ chromosomes in the regenerated sporophyte. The scale shows $10\ \mu\text{m}$.

的に変化していた。

58個の染色体の大多数は、一次狭窄を端部近くに保持していた。それらの染色体を類型すると、**Fig. 3**に示したように、median染色体は皆無で、submedian染色体が4個で全体の6.9%を占め、subterminal染色体が10個で17.2%を、terminal染色体が、44個と最も多く、75.9%を占めていた。この腕比特性を核型式で表すと、 $2n=58=0(0)\ m+4(6.9)\ \text{sm}+10(17.2)\ \text{st}+44(75.9)\ \text{t}$ となる。これによれば、非対称的な腕比を示すsubterminal型やterminal型の染色体が全体の90%以上を占め、腕比の対称的なmedian型とsubmedian型

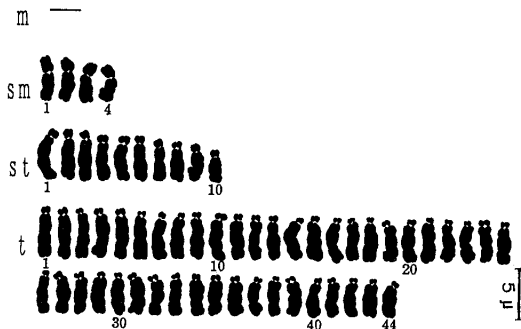


Fig. 3 Somatic metaphase chromosomes of an explant donor, *Pteris cretica* (diploid, $2n=58$), classified by arm-ratio. No median chromosomes (m) were observed in explant donors. sm; submedian chromosomes. st; subterminal chromosomes. t; terminal chromosomes.

の染色体の占める割合が10%未満である。以上の観察によって、外植片供与体 (*P. cretica*) が染色体腕比に関して強度の非対称性を示すことが、初めて明らかとなった。

類型された各型染色体組の長さに関する特性は、以下の通りであった (**Fig. 3**)。4個のsubmedian型染色体は、長さが2様相的で、2対に分けられた。10個のsubterminal型染色体は、長さに関して顕著な不均一性を示していた。そのsubterminal型染色体中の最長染色体 (**Fig. 3 st-1**) と最短染色体 (**Fig. 3 st-10**) に対応する形状の相同な染色体が見出せなかった。44個のterminal型染色体は、長さが約 $5\ \mu\text{m}$ から約 $3\ \mu\text{m}$ の範囲で漸次的変化を示していた。

P. cretica は、2倍体 ($2n=58$) であっても、無配生殖によって種族維持を図っていることが報告されている^{9,11)}。今回の観察では、58個の染色体中に形状の相同な染色体のない数個の染色体が存在することが、2株の外植片供与体に共通した特性であることが明らかとなった。これらの観察結果は、野外に生育する *P. cretica* の2倍体が種間雑種性か構造雑種性のいずれかを普遍的特性とする植物であることを示唆しているものと考えられる。

b) 再分化胞子体

今回の培養で得られた葉組織由来カルスからの再分化胞子体の中の43株で染色体が観察された。それらの株の体細胞分裂過程では、正常な2極性核分裂のみが行われていた。

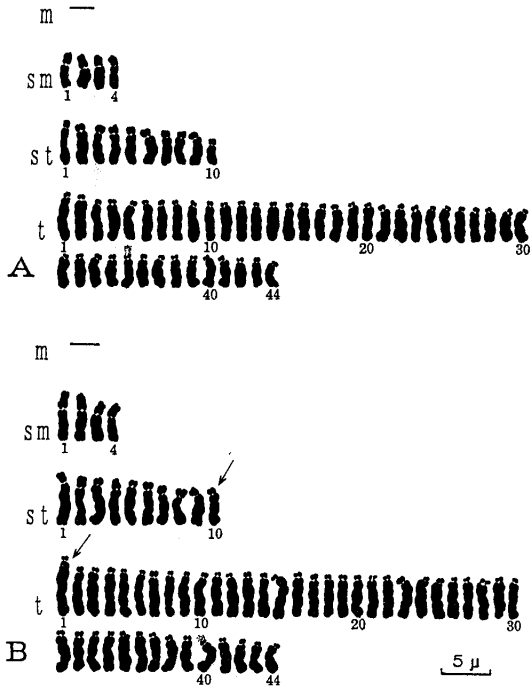


Fig. 4 Somatic metaphase chromosomes in sporophytes (diploid $2n=58$) regenerated from leaf calli of *Pteris cretica* (diploid $2n=58$) classified by arm-ratio. No median chromosomes (m) were observed in all the regenerated sporophytes. sm; submedian chromosomes. st; subterminal chromosomes. t; terminal chromosomes. A) the chromosome complement showing morphological similarity to that of the explant donor. B) the chromosome complement showing small differentiation in size of subterminal and terminal chromosomes (arrows) from those of the explant donor.

体細胞分裂中間期から前中期までの染色体は、染色質の形状が外植片供与体の場合と同様で、全体が均質に染色される分散型染色体の特性を示していた。

シダ植物の *L. thunbergianus*⁴⁾ や *P. vittata*³⁾ の孢子体組織の培養過程では、染色体の数的安定性が維持されることが報告されている。一方種子植物の組織培養過程では、染色体の倍加的あるいは異数的変化が高頻度で生じる場合とそれらの変異が生じない場合があることが知られている¹⁵⁾。 *P. cretica* の再分化孢子体では、正2倍性の $2n=58$ (**Fig. 2B**) と低2倍性の $2n=57$ (**Fig. 2C**) の2種類の染色体数が算定されたが、倍数性の染色体数は全く算定されなかった。 *Apium graveolens*¹⁶⁾ や *Vicia faba*¹⁷⁾ 等の種子植物の培養細胞中の約10%から30%の細胞が染色体の倍数的変異を示すことに比べて、 *P.*

cretica の再分化孢子体中で倍数性が観察されなかったことは、注目すべきことである。

再分化体での2種類の染色体数中の正2倍性染色体数 ($2n=58$) は、染色体が観察された植物体の約95%に相当する40株で、低2倍性染色体数 ($2n=57$) は他の3株(約5%)で観察された。植物組織培養で染色体の数的変異が生じる場合には、高頻度で観察されることが多数の植物で知られている¹⁵⁾。例えば、 *Apium graveolens*¹⁶⁾、 *Vicia faba*¹⁷⁾ 及び *Hawor thiasetata*¹⁸⁾ 等では、倍数的及び異数的変異の何れかの染色体変異を示す培養細胞の出現頻度は、高く、25%から50%にも達すると報告されている。それらに比べて、本報の *P. cretica* でのその出現頻度は、5%程度で、極めて低い。従って、本種の葉組織の培養過程でも、既報のシダ植物2種^{3,4)} の場合と同様に、染色体の数的安定性が維持されているものと考えられる。

P. cretica の葉由来カルスから再分化した低2倍性孢子体 ($2n=57$) では、詳細な核型を確定するまでには至らず、染色体の形状を概観するに止まった。それによれば、低2倍体の57個の染色体の腕比や長さに関する形態学的特性は、正2倍体の染色体のそれらに類似していて、正2倍体と低2倍体との間では、大きな核形態学的相違が見出せなかった。このことは、 *P. cretica* の葉組織培養では、切断や転座等の染色体の構造的変化によるよりも、染色分体の不分離によって低2倍体が稀に生じることを示唆している。一方、正2倍性の再分化孢子体 ($2n=58$) では、詳細な核型分析が行われた。それによって、体細胞分裂中期で観察された58個の染色体が、1) 長さに関して、外植片供与体の場合と同様で、約6 μm から約3 μm までの範囲で染色体間の漸次的変化を示すこと、2) 腕比特性も、 $2n=58=0(0) m+4(6.9) sm+10(17.2) st+44(75.9) t$ の核型式で表され、外植片供与体の染色体と同様の腕比特性を示すことが明らかになった (**Fig. 4A, B**)。これらの観察結果は、 *P. cretica* の葉由来カルスからの孢子体の再分化過程でも、 *L. thunbergianus* の葉由来カルス⁴⁾ の場合と同様に、外植片の基本的な核形態学的特性が不変的に維持されることを示している。しかし、類型された各型染色体組の微細な形態学的特性に関しては、外植片供与体と極少数の再分化孢子体との間で異なる場合があった。その一例が、 **Fig. 4B** に示されている。それによれば、外植片供与体や大多数の再分化体で観察された subterminal 型染色体中の最短染色体 (**Fig. 3 st-10, 4A st-10**) が少数の正2倍性再分化体の同型染色体中には見出せず、前者植物で観察されなかった大形の terminal 型染色体 (**Fig. 4B t-1**)

が後者植物で1個だけ観察される等の相違点が両者間に見出された。これらのことは、*P. cretica*の葉組織の培養過程で、軽微な転座や欠失等の構造的変化が一部の染色体に低頻度で誘発されることを示している。

種子植物での孢子体組織の培養過程では、核分裂装置の異常、染色体の数的あるいは構造的変異等の染色体変異が高頻度に生じる場合があるとの報告^{15,19)}が多数ある。他方、シダ植物の*L. thunbergianus*の孢子体組織の培養過程では、染色体の数的及び構造的変化がほとんど生じないと報告されている⁴⁾。同じシダ植物*P. cretica*の葉組織の培養の場合でも、染色体の軽微な数的及び構造的変化によって派生した核型が、少数の再分化体で観察されるに過ぎないことが本報で明らかにされた。以上の観察結果は、*P. cretica*の孢子体組織の培養過程でも、*L. thunbergianus*の場合と同様に、外植片の核形態学的特性を不変的に維持する何等かの機構が作用していることを示しているものと考えられる。

文 献

- 1) Morel, M. G., R. H. Wetmore, 1951. Amer. J. Bot. **63**: 325-330.
- 2) Takei M., 1988. Plant Tissue Culture Letters **5**: 61-65.
- 3) Palta, H. K., P. N. Mehra, 1983. Caryologia **36**: 325-332.
- 4) Takei, M., 1989. Cytologia **54**: 135-144.
- 5) Takei, M., 1988. Res. Bull. Fac. Educ., Oita Univ. **10**: 89-104.
- 6) Levan, A., K. Fredga, A. A. Sandberga, 1964. Hereditas **51**: 201-220.

- 7) 田中隆荘 1977. 植物細胞学, 統細胞学大系 3 (小川和朗ほか編), p. 293-326. 朝倉書店, 東京.
- 8) Bristow, J. M., 1962. Develop. Biol. **4**: 361-375.
- 9) Manton, I., 1950. Problems of cytology and evolution in the Pteridophyta. Cambridge Univ. Press, London.
- 10) Mehra, P. N., S. C. Verma, 1960. Caryologia **13**: 619-650.
- 11) Walker, T. G., 1962. Evolution **16**: 27-43.
- 12) Mitui, K., 1965. J. Jap. Bot. **40**: 117-124.
- 13) Mitui, K., 1968. Sci. Rep. Tokyo Kyoiku Daigaku, Sec. B. **13**: 285-333.
- 14) 中藤成実 1975. 植物研究雑誌, **50**: p. 119-125.
- 15) Phillips, R. H., A. S. Wang, 1984. Chromosome analysis. In "Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. Vol. 1; Laboratory procedures and their applications" (ed. Vasil, I. K.), p. 712-727, Acad. Press, London.
- 16) Murata, M., T. J. Orton, 1982. Analysis of Karyotypic change in suspension cultures of celery. In "Plant Tissue Culture" (ed. by Fujiwara, A.), p. 435-436, Maruzen, Tokyo.
- 17) Ogura, H., 1982. Studies on the genetic instability of cultured tissues and the regenerated plants-Effects of auxines and cytokinins of *Vicia faba* cells. In "Plant Tissue Culture" (ed. by Fujiwara, A.), p. 433-434, Maruzen, Tokyo.
- 18) Ogihara, Y., 1982. Characterization of chromosomal changes of calluses induced by callus cloning and parafluorophenylalanine (PFP) treatment and regenerated from them. In "Plant Tissue Culture" (ed. by Fujiwara, A.), p. 439-440, Maruzen Tokyo.
- 19) D'Amato, F., 1978. In "Frontiers of plant tissue culture 1978" (ed. Thorpe, T. A.), p. 287-295, Univ. Cargary Press, Cargary.

Summary

Constancy of the Karyomorphological Features in the Regenerated Plant from Tissue Culture of Leaves of *Pteris cretica*, a Fern.

Masahiro TAKEI

Biological Institute, Faculty of Education,
Oita University, Oita 870-11, Japan

Karyomorphological features were observed in sporophytes regenerated from leaf calli and in explant donors, *Pteris cretica* (diploid $2n=58$).

The explant donors showed numeral and morphological chromosome stability. On the other hand, about 95% of the regenerated sporophytes were diploid with 58 chromosomes and the others were hypodiploid with 57 chromosomes. Almost all the regenerated sporophytes with 58 chromosomes showed the uniformity of karyotypic

features being similar to those of the donors. In a few of the regenerated sporophytes, however, the chromosome complement showed small differentiations in size of subterminal and terminal chromosomes from those of the explant donors.

The present karyomorphological investigations conclude that numeral and morphological chromosome stability are maintained throughout the process of the regeneration of whole sporophytes from calli originating from young leaf tissues of *P. cretica*.