

## トウジンビエの薬培養方法および再分化植物の染色体数

重宗明子・吉田智彦\*

(九州大学)

**要旨:** トウジンビエの薬培養の効率化を探るため、5種類の培地、品種、生育ステージ、および低温処理について検討した。さらに薬培養によって得られた植物の染色体数について調査した。薬は長さ0.5~1.0 mmの四分子期前後の花粉を含むものが適し、10°C、7~9日の低温処理が有効であった。MS培地に2.5 mg/Lの2,4-Dを加えた培地では、置床薬あたり全カルスの誘導率は約10%となり、さらに植物体再分化率は0.16%であった。すべての培地を合わせて15個体の薬培養起原の植物が得られた。品種間差は明確でなかった。それらの植物のほとんどに自然倍加が起こっていたが、すべて部分的にしか倍加が起こらない混数体で、稔性も低く、培養法の改良や培養反応の高い材料の選抜が必要と考えられた。

**キーワード:** 混数体、再分化率、トウジンビエ、不稔、薬培養。

トウジンビエ (*Pennisetum typhoideum* Rich.  $2n=2x=14$ ) は高温、乾燥など、過酷な環境下でも生育できる、世界の半乾燥熱帯における非常に重要な他殖性の作物である (Kumar and Andrews 1993, Burton and Powell 1968, ICRISAT 1996)。放任受粉品種の他にも、ハイブリッド品種の育種が盛んで、アメリカでの飼料栽培はもちろんで、インドで栽培されている品種の40%はハイブリッド品種である (Jauhar and Hanna 1998)。通常は自殖を6~7回繰り返して、ハイブリッドの親となる近交系が作出されている。イネ、コムギなど自殖性の作物においては薬培養による育種年限の短縮が広く行なわれているが、他殖性のトウモロコシにおいても、薬培養により倍加半数体を作り、それらの組み合わせ能力を検定した報告がある (Wu 1986)。またコムギの雄性不稔維持系統候補の育成のために薬培養を利用した報告もある (Shimada ら 1994)。したがって薬培養はトウジンビエのハイブリッド育種においても、育種年限の短縮のための手段であると期待される。

しかし現在、トウジンビエの薬培養に関する研究は少なく、また再分化率も非常に低いと報告されている (Choi ら 1997)。また、薬培養では一般的にカルスを経ることによって遺伝的変異や多染色体性を示すことが多い (新関 1979)。したがって本研究では、まずその再分化率を向上させるため、培地や材料、前処理について検討した。また、薬培養起原の植物の染色体を観察し、倍数性についても調査した。

### 材料と方法

#### 1. 薬培養

実験は予備実験を1998年7月から10月に、本実験を1999年3月から8月にかけて行った。品種はICRISATから導入した短稈・早生の集団であるICMV 89074を九州大学構内の圃場で一穂粒重の大きいものについて選抜した

集団 (短稈集団) (Totok ら 1998) と、九州大学保存の数種の早生の育種材料からなる長稈集団の2品種を用いた。それらを九州大学構内の温室でポット栽培し、出穂前の穂を採取して培養に供した。培養の前に、花粉 (小孢子) の発育時期の目安として葉耳間長、穂の長さ、薬の長さを測定した。さらに、薬から取り出した花粉を酢酸カーミンで染色し、薬の大きさと花粉の発育時期の関係を調べた。

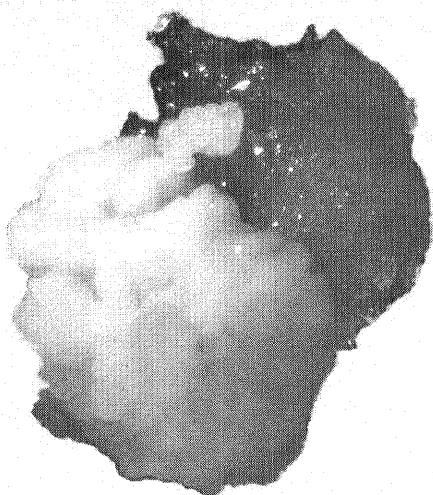
次に前処理として、10°Cの低温処理を0~14日間行い、低温処理程度として0日間をI、1~3日間をII、4~6日間をIII、7~9日間をIV、10~14日間をVとした。また、脱分化培地は第1表に示すように、D1:ソルガムの薬培養 (Can ら 1998)、D2、D4、D5:トウジンビエの花序培養 (Botti and Vasil 1984, Nabors ら 1983, Talwar and Rashid 1990)、D3:トウジンビエの小孢子培養 (Ha and Pernes 1982) の各報告を参考にして基本培地および植物成長調節物質組成を決定した。すべてスクロースは20 g/L加え、ゲル化剤としてgellan gumを1.5 g/L加えた (Can ら 1998)。

培地をオートクレーブ後、90×15 mmのプラスチック製の滅菌シャーレに25 mL入れ、1シャーレに30個の薬を置床し、30°C暗黒条件のインキュベーターに入れた。約1週間後からカルス化し始め、直径2 mm程度になったものをカルスとみなし、全カルス数を記録した。記録は置床後約1か月間続けた。カルスの大きさが直径5 mm程度になったものを再分化培地に移植した。Vasil (1987) は、イネ科植物の培養においてはEmbryogenic callus (Eカルス)を選抜し、継代培養することが必要であるとしている。今回の実験でもEカルスを選抜してその数を数えて移植した。Non-Embryogenicカルス (NEカルス) が半透明でもろいものに対して、Eカルスは白く細かい細胞からできており、表面が滑らかで硬い性質をもっているため、それらを肉眼で判別した (第1図)。Talwer and Ra-

第1表 培地別, 集団別の全カルス, Eカルス誘導率および再分化植物体数.

培地名		D1	D2	D3	D4	D5
基本培地		MS	MS	MS	MS	N <sub>6</sub>
培地	2,4-D	2.5	2.5	0.25	2.5	10.0
	植物成長調節物質 (mg/L)					
	IAA	1.0	-	-	1.0	-
	NAA	-	-	1.0	0.5	-
	Kinetin	2.0	-	-	-	-
置床薬数	短稈集団	2370	1770	1740	300	120
	長稈集団	1230	2100	2010	870	660
全カルス誘導率 (%)	短稈集団	0.55 Ba	9.53 Aa	4.87 Ba	0.28 Ba	0 Ba
	長稈集団	0.37 Ba	11.28 Aa	8.79 Aa	0.59 Ba	0.22 Ba
Eカルス誘導率 (%)	短稈集団	0 Ba	0.70 Aa	0.03 Ba	0 Ba	0 Ba
	長稈集団	0 Aa	3.37 Aa	1.13 Aa	0.11 Aa	0 Aa
再分化植物体数 (うちアルピノ数)	短稈集団	0	5	0	0	0
	長稈集団	0	1 (1)	7	2 (1)	0

同一の大文字アルファベット間には, 培地の間に5%水準で有意差がないこと, 同一の小文字アルファベット間には, 集団の間に5%水準で有意差がないことを示す (ダンカンの多重検定による).



第1図 Eカルス (左下) とNEカルス (右上).

shid (1990) はトウジンビエの花序培養において, NEカルスは再分化培地に移しても根を生じるのみで, 胚発生を行わないと報告している.

再分化培地はMS培地にIAA 3.0 mg/L, kinetin 2.5 mg/Lを加え, スクロースおよびgellan gum濃度は脱分化培地と同様としたものを用いた (Canら 1998). それを60×90 mmのコニカルビーカーに入れ, 1ビーカーにつき2つのカルスを移植した. カルス置床後は25°C, 光条件400 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>の人工気象室に入れた. 約2か月後, 再分化個体をパーミキュライトを入れたペーパーポットに移植し, 根がよく伸びるまで人工気象室で栽培し, その後ポットに移植して温室に移した. 出穂後に袋をかけて自殖させ, 採種した.

## 2. 再分化植物の染色体数

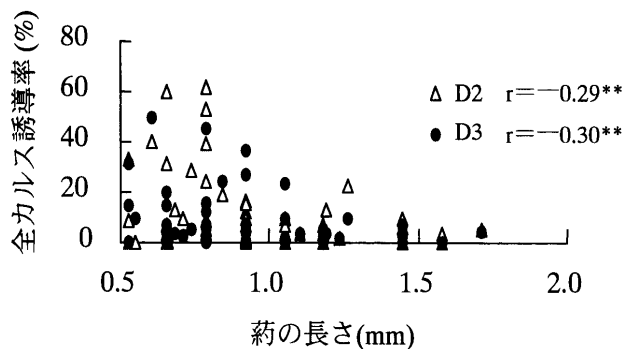
ポットに移植前の幼植物 (再分化培地に移植して2か月程度) と, 薬培養起原の植物から得られた種子由来の根端を, 酵素解離ギムザ染色法によって染色体観察した. 根端を0.05%コルヒチン溶液で1時間前処理し, 固定液で1時間固定した後, 水洗し, 4%セルラーゼと2%ペクトリアーゼを混合した酵素液を加えて, 1時間, 34°Cで酵素解離させた. その後再固定し, ピンセットで根端組織をおし潰して展開し, 乾燥後5%ギムザ液で1時間染色した (日向 1990, Can and Yoshida 1997). 染色体数のはっきり分かる細胞について, 染色体数を数えた. 幼植物6個体合計123細胞, 種子由来の根端の合計30細胞について観察した.

なお, 1998年の予備実験では短稈集団を用い, 培地もD1のみとした. この予備実験により得られた個体から採種して染色体を観察した. 以後, データとして処理したのは1999年の本実験の結果である. 予備実験, 本実験を合わせて, 約14000個の薬を置床した. 培地別, 集団別に, 1週間間に置床した総シャーレを1反復として統計処理した.

## 結果と考察

### 1. 薬培養

短稈, 長稈集団を合わせたD2, D3培地における全カルス誘導率 (全カルス誘導数/置床薬数) と薬の長さの関係を図2に示した. 薬の長さが短いほうがカルス誘導率は高い傾向がみられた. 一般的に薬培養には四分子期から第1有糸分裂期直後の花粉が適しているといわれている (新関 1979). 今回トウジンビエの花粉 (小孢子) を観察したところ, 花粉の正確な発育段階は判定できなかったが, 長さ0.5 mmの薬は, 四分子期以前であると推察さ



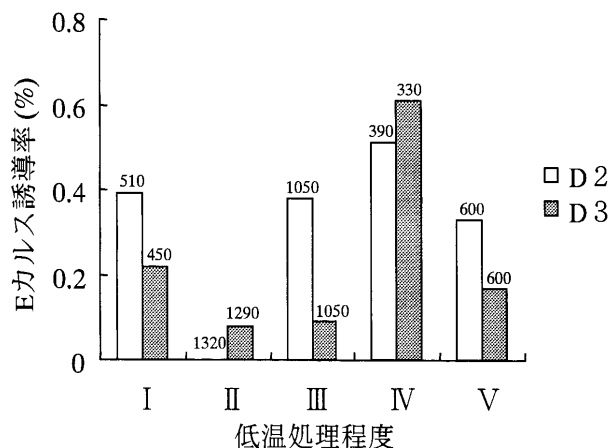
第2図 薬の長さ と全カルス誘導率の関係。  
D2, D3 培地は第1表の培地を参照。  
\*\*は相関係数が1%水準で有意であることを示す。

れる。また1.0 mmに達した薬ではすでに一核期の小孢子となっていた。今回の実験でも、小花から薬を摘出できる最小の長さ0.5 mmから1.0 mmの薬が適しており、四分子期前後の花粉を含む若い薬を使うことが重要であることが示された。一方、葉耳間長や穂の長さは短いほうが全カルス誘導率は高い傾向がみられたが(データ略)、一つの穂の中でも上下で薬の長さは異なるので、補助的な指標として用いるのが適切と考えられる。

第3図に低温処理程度とEカルス誘導率(Eカルス誘導率/全置床薬数)の関係を示した。培地によって低温処理の及ぼす影響は異なったが、特にD3培地においては低温処理程度IV、つまり7日~9日間でEカルス誘導率が高くなった。したがって、トウジンビエにおいても低温処理が有効であることが示された。なお、Choiら(1997)は、9°C、14日間の低温処理が胚様体誘導および緑色植物体再分化に効果的であったと報告している。また、今回の実験では植物体の再分化はEカルスのみから起こり、NEカルスからは根を生じたのみであったことから、薬培養においてEカルスを誘導することの重要性が確認された。

第1表に培地別、短稈、長稈集団別の全カルス誘導率とEカルス誘導率(Eカルス誘導率/置床薬数)、および再分化植物体数を示した。すべての培地からカルスが得られたが、全カルス、Eカルスの誘導率および再分化植物体数は培地によって大きく異なり、他の培地に比べて植物成長調節物質が少ないD2、D3培地がすべてにおいて優れていた。植物成長調節物質が少ないほうが薬壁など半数体以外からの再分化を阻害できるという水稻についての報告がある(新関1979)。今回の実験では、カルスは花粉から分化していることを観察しており、得られた再分化個体は半数体起原であると思われる。合計15個体の再分化植物が得られたが、再分化率(再分化植物体数/置床薬数)は、D2培地で0.16%、D3培地で0.19%となり、イネでの再分化率が品種間差はあれ、5%程度であるのに比べると(島田ら1999)、非常に低い値となった。

集団間の差については、第1表のように長稈集団の方が全カルス、Eカルス誘導率共に高い傾向がみられたが、反



第3図 低温処理とEカルス誘導率の関係。  
低温処理は10°Cで、I:0、II:1~3、III:4~6、IV:7~9、V:10~14日間行った。D2、D3培地は第1表の培地を参照。  
グラフ上の数値は全置床薬数を示す。

復間のばらつきが大きく、有意な差は検出できなかった。今回用いた材料は放任受粉品種であり、遺伝的にも雑多な集団であるため、このような結果となったと考えられる。さらに前述のように、再分化率も実際の育種に利用するには非常に低いので、今後はさらに培養方法を検討しなければならない。また、薬培養による再分化率は、優性効果によるものであると報告されており(Wan and Widholm 1993, Can and Yoshida 1999)、交配と選抜によって再分化率を高めることが可能だと考えられる。したがって、再分化率の高い品種とされるICRISAT育成の843 Bと7042 DMRの2品種(ICRISATのDr. Shyamalaの私信による)を用いるなどして、ある程度我が国での栽培用に改良した早生・多収集団の再分化率向上を図っていきたい。

## 2. 再分化植物の染色体数

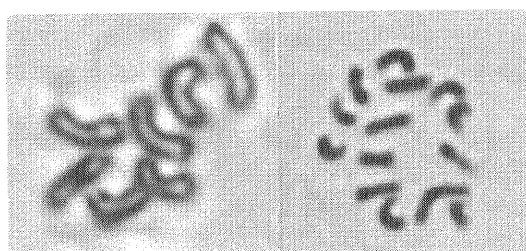
第2表に示したように、観察した個体はすべて混数体であった。トウジンビエは自然倍加が頻繁に起こると報告されているが(Powellら1975)、今回の結果では幼植物体でも根端細胞に2倍性の染色体数のものが多く認められ、再分化個体を誘導し培養する過程の中で、既に自然倍加が起こっていることが示唆される(第2表、第4図)。なお、倍数性細胞の他に、異数性の細胞も数多く観察された。

今回はコルヒチンなどによる染色体の倍加処理は行っていないが、Wan and Widholm (1993)によると、トウモロコシの再分化個体に倍加処理を行うと、細胞分裂が同時にないため倍加半数体の部分を含んだキメラが生じ、自殖させても種子はほとんど得られないとしている。一方、半数体のカルスに倍加が起こると、それから再分化した植物の大部分はキメラでない倍加半数体となる。また、彼らは3年間にわたってトウモロコシの薬培養起原のカルスの倍数性を調べたところ、20系統が半数体で、6系統が2倍体であったが、カルス誘導後2~4か月後の細胞は、混数体

第2表 幼植物および種子由来の根端細胞の染色体数。

染色体数	<7	7	7~14	14	14~21	21	21~28	28	28<	稔実程度	観察細胞数
幼植物 1		1(14.3)	2(28.6)		3(42.8)			1(14.3)		×	7
2		2(16.7)		10(83.3)						○	12
3	6(8.6)	21(30.0)	3(4.3)	32(45.7)		4(5.7)		4(5.7)		△	70
4			1(33.3)	2(66.6)						○	3
5		1(20.0)		3(60.0)		1(20.0)				○	5
6		3(12.0)	3(12.0)	19(76.0)						△	25
種子		5(16.7)	1(3.3)	12(40.0)		2(6.7)		10(33.3)			30

表中の数字は細胞数，( ) は観察細胞数に対する割合の%を示す。稔実程度は，○：良，△：不良，×：完全不稔を表す。



第4図 再分化培地に移植して約2か月の幼植物の根端細胞の染色体。

左が半数性 ( $n=7$ )，右が2倍性 ( $2n=14$ ) の細胞である。

ではなく，半数体か2倍体のいずれかであった。これらの結果から，倍数性レベルは非常に安定で，染色体の自然倍加は，カルス誘導前に起こるとしている。

今回得られた植物体は混数体で，稔実の程度も低かった。第2表のように，染色体数が一定であるほど稔実の程度は高い傾向がみられた。稔実の程度が低い個体では，部分的にしか染色体倍加が起こっていないため，配偶子も正常でなく，そのため大部分が不稔となったと考えられる。すべての薬が裂開しない完全に不稔の個体もあった。また，種子も混数体であり，その稔性が懸念される。今後さらに再分化植物体数を増やし，稔性について検討し正常な倍加個体を効率良く得る方法や，効果的な染色体の倍加方法についての研究が必要である。

また，薬培養によって得られた系統の稔性ととも，生育についても調査を行っていく必要がある。イネにおいて薬培養法と通常の育種法と比較した大里ら (1999) は，薬培養育種法では収量などが劣る傾向があり，再分化系統を増やして育種規模を大きくする必要のあるとしている。コムギでは，Winzelerら (1987)，Baenzigerら (1989) や Mitchellら (1992) が薬培養法と交雑育種法で得られた系統の比較を行っている。トウジンビエでは，Ha and Pernes (1982) が薬培養で再分化した2個体を自殖させて採種した2系統を播種し，1か月後の草高，葉の大きさ，葉数について原品種と比較したところ，薬培養起原の

系統は，草高が低く，また葉も小さくなった。また，それらの2系統は完全に不稔であったと報告している。

今後はさらに今回得られた系統の組合せ能力も検討し，トウジンビエのハイブリッド育種のための薬培養による近交系作成の可能性を探っていきたい。

#### 引用文献

- Baenziger, P.S., D.M. Wesenberg, V.M. Smail, W.L. Alexander and G.W. Schaeffer 1989. Agronomic performance of wheat doubled-haploid lines derived from cultivars by anther culture. *Plant Breeding* 103: 101-109.
- Botti, C. and I.K. Vasil 1984. Ontogeny of somatic embryos of *Pennisetum americanum*. II. In cultured immature inflorescences. *Can. J. Bot.* 62: 1629-1635.
- Burton, G.W. and J.B. Powell 1968. Pearl millet breeding and cytogenetics. *Adv. Agron.* 20: 49-89.
- Can, N.D. and T. Yoshida 1997. Cytological study in root tip cells in four cultivars of *Sorghum bicolor*. *J. Fac. Agric. Kyushu Univ.* 42: 11-16.
- Can, N.D., S. Nakamura, Totok, A.D.H., and T. Yoshida 1998. Effects of physiological status of parent plants and culture medium composition on the anther culture of sorghum. *Plant Prod. Sci.* 1: 211-215.
- Can, N.D. and T. Yoshida 1999. Combining ability of callus induction and plant regeneration in sorghum anther culture. *Plant Prod. Sci.* 2: 125-128.
- Choi, B.H., K.Y. Park and R.K. Park 1997. Haploidy in pearl millet [*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.]. In Jain, S.M., S.K. Sopory and R.E. Veilleux ed., *In vitro* Haploid Production in Higher Plants, Vol.4. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. 171-179.
- Ha, D.B.D. and J. Pernes 1982. Androgenesis in pearl millet. I. Analysis of plants obtained from microspore culture. *Z. Pflanzenphysiol. Bd.* 108: 317-327.
- 日向康吉 1990. 染色体観察法. 東北大学農学部農学科編, 最新農学実験の基礎. ソフトサイエンス社, 東京. 31-33.
- ICRISAT 1996. Improving the unimprovable —Succeeding with pearl millet—. 1-13.
- Jauhar, P.P. and W.W. Hanna 1998. Cytogenetics and genetics of

- pearl millet. *Adv. Agron.* 64 : 1–26.
- Kumar, K.A. and D.J. Andrews 1993. Genetics of qualitative traits in pearl millet : a review. *Crop Sci.* 33 : 1–20.
- Mitchell, M.J., R.H. Busch and H.W. Rines 1992. Comparison of lines derived by anther culture and single—seed descent in a spring wheat cross. *Crop Sci.* 32 : 1446–1451.
- Nabors, M.W., J.W. Heyser, T.A. Dykes and K.J. DeMott 1983. Long—duration, high—frequency plant regeneration from cereal tissue cultures. *Planta* 157 : 385–391.
- 新関宏夫 1979. 葯・花粉培養. 原田宏・駒嶺穆編, 植物細胞組織培養. 理工学社, 東京. 217–272.
- 大里久美・浜地勇次・今林惣一郎 1999. 水稲における葯培養法と通常育種法による育成系統の農業形質の比較及び葯培養法による有望系統の育成. *日作紀* 68 : 440–443.
- Powell, J.B., W.W. Hanna and G.W. Burton 1975. Origin, cytology, and reproductive characteristics of haploids in pearl millet. *Crop Sci.* 15 : 389–392.
- Shimada, T., K. Toriyama, K. Tsunewaki, S. Nonaka, T. Koba, M. Otani and M. Fujita 1994. Breeding of candidate lines for male sterility—maintainer by anther culture for hybrid wheat production using an S<sup>v</sup> type cytoplasm and a 1BL—1RS chromosome. *Breed. Sci.* 44 : 23–28.
- 島田多喜子・大谷基泰・生田陽子 1999. イネ葯培養におけるカルス誘導培地と再分化培地の検討. *日作紀* 68 : 151–154.
- Talwar, M. and A. Rashid 1990. Factors affecting formation of somatic embryos and embryogenic callus from unemerged inflorescences of a graminaceous crop *Pennisetum*. *Ann. of Bot.* 66 : 17–21.
- Totok, A.D.H., T.K. Shon and T. Yoshida 1998. Effects of selection for yield components on grain yield in pearl millet (*Pennisetum typhoideum* Rich.). *Plant Prod. Sci.* 1 : 52–55.
- Vasil, I.K. 1987. Developing cell and tissue culture system for the improvement of cereal and grass crops. *J. Plant. Physiol.* 128 : 193–218.
- Wan, Y. and J.M. Widholm 1993. Anther culture of maize. *Plant Breed. Rev.* 11 : 199–224.
- Winzeler, H., J. Schmid and P.M. Fried 1987. Field performance of androgenic doubled haploid spring wheat lines in comparison with lines selected by the pedigree system. *Plant Breeding* 99 : 41–48.
- Wu, J. 1986. Breeding haploid corn by anther culture. In Jain, S.M., S.K. Sopory and R.E. Veilleux ed., *In vitro* Haploid Production in Higher Plants, Vol.1. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. 23–24.

**Methods of Anther Culture of Pearl Millet and Ploidy Level of Regenerated Plants :** Akiko SHIGEMUNE and Tomohiko YOSHIDA\* (*Fac. of Agr., Kyushu Univ., Fukuoka 812-8581, Japan*)

**Abstract :** To improve the regeneration efficiency from anther culture of pearl millet (*Pennisetum typhoideum* Rich.), we studied the influence of the composition of culture media, stage of anther and low temperature treatment on the anther culture. The anthers having pollen around the tetrad stage were most suitable for anther culture and low—temperature treatment (10°C, 7~9 days) was effective for the callus induction. On the MS medium supplemented with 2.5mg/L 2,4-D, the callus induction rate was about 10% and the plant regeneration rate was 0.16%. No varietal difference was observed. Fifteen plants were regenerated in total, but all of them were mixoploid and the fertility was very low. More studies are needed to find better culturing methods, and to select the genotypes suitable for anther culture.

**Key words :** Anther culture, Mixoploid, Pearl millet, Regeneration rate, Sterility.