Eizo MAEDA : A MORPHOLOGICAL STUDY OF NUCLEI AND AN ACTION OF COLCHICINE ON RICE CALLUS CULTIVATED IN VITRO. (With English summary, p. 12) Japan. J. Breeding, Vol. 17, No. 1, 1967.

Synopsis. This experiment deals with the determination of nuclear diameter in rice callus developed by aseptic culture. From the variation in the frequency distribution analysis the order of the nuclear diameter was determined in various varieties. The effect of colchicine on the nuclear growth was examined.

イネのカルスにおける細胞核の形態と
コルヒチンの作用

前 田 英 三
(名古屋大学農学部)

I. 緒 言

著者は先きに、無菌条件にて無機および有機栄養を与えイネ苗を培養すると、胚その他の部分からカルスを生ずることを明らかにした (MAEDA, 1965)。その報告のなかで、イネのカルス形成に対し培地のなかに 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid) の存在する必要があることを示し、その条件におけるカルスの形成過程を、外部形態的に詳細に追跡することができた。またカルス組織から、イネの単細胞を分離することにも成功した。これらの事実は、イネの無菌培養実験が、イネにおける細胞分裂機構の研究に対し有効な素材を提供することができることを意味すると共に、イネの遺伝・育種学的研究に対しても、興味ある展望を与えているといえることができる。

すなわち種々な植物の無菌培養組織において、継代培養を続けた場合、染色体数が変化すること、および染色体数の変化と対応して、生長物質に対する反応性が変化するという報告がある (庄野, 1965)。また *Tradescantia* をもちいて山田 (1965) は、カルス組織における染色体数と核型の変化、および多核細胞の出現を報じている。

このような報告およびイネにおけるカルス形成の成功にもとづいて、著者は、日本稲・外国稲・ワイ性稲その他数品種のイネをもちい、これら品種のカルス組織を作成して、その細胞内容物とくに細胞核の形態を観察し、細胞核の大きさとその変異を測定した。本報告では、これらの実験結果を述べ、細胞分裂過程との関係においてそれを考察する。またイネの無菌培養組織において、コルヒチン (Colchicine) の細胞核に対する作用を明らかにすることができたので、その結果をもあわせてここに報告する。

II. 材料と方法

イネの品種として、金南風・短銀坊主・ムラサキイネ・Cody・Century patna・Vialone nano など、外国稲・ワイ性稲を含めて 6 品種をもちいた。Cody は、USA の品種で Japonica 型の中生種であり、Century patna は USA の Indica 型の晩生種である。Vialone nano はイタリアおよびフランスの品種で早生の大粒種であり、Lamina joint 付近が紫色に着色している。米粒の長さとの比は、Century patna・金南風・Cody・Vialone nano の順に減少する (NAGATO and KÔNO, 1963)。

前報 (MAEDA, 1965) にて示した基本培地に、2,4-D $10\mu\text{M}$ ・イースト抽出物 (Difco 製 yeast extract) 5g/l ・ショ糖 (Sucrose) 30g/l ・寒天 8g/l をくわえた培地を 100ml 用三角フラスコをもちいた培養瓶に 50ml ずつ作成し、これに種子を 5 粒ずつ置床した。ムラサキイネの種子は多くの雑菌でよごれていたもので、サラシ粉溶液による滅菌を 1 時間ないし 2 時間とし、他の品種では 30 分間滅菌した。このほか培養瓶の加熱滅菌時間を 20 分とした以外、滅菌その他の方法は前報 (MAEDA, 1965) と同じである。

約 30°C 条件に一定日数おき形成された無定形のカルス組織を、FAA (70% エタノール : サク酸 : ホルマリン, 90 : 5 : 5) で固定し貯蔵した。細胞核の形態を観察するためには、この固定組織を乳鉢ですりつぶし、脱イオン水をくわえて細胞懸濁液を作り、これを通常の光学顕微鏡および AO Baker の干渉顕微鏡 Model 7 にて無染色のまま検鏡した。細胞核の大きさは、ニコンの測微接眼レンズをもちいて、その直径を測定することにより観察した。

コルヒチン処理の影響を検討した実験においては、28

1966 年 2 月 4 日受領

日または 36 日間培養して形成された組織に、コルヒチンの 1mM または 0.1mM の溶液を与えて、13 日または 22 日さらに培養を続け、このものを固定し検鏡することにより研究をおこなった。コルヒチンは培養瓶中に 195mg/10ml および 19.5mg/10ml の濃度の溶液を 1 ml ずつ Millipore filter を通して入れることにより、50ml 寒天培地に対して、それぞれ 1mM または 0.1 mM となるように調整した。また培地にコルヒチンを 1 mM となるようにくわえたのちに、加熱滅菌した培養瓶でも、コルヒチンの作用を検討した。

III. 実験結果

I) 細胞核の大きさとその品種間差異

各品種のイネ種子を無菌培地の上に置床し、約 4 週間培養したところ、ほぼ次に示すような直径のカルスを形成した。ムラサキイネ 12mm・金南風と Vialone nano 10mm・短銀坊主と Cody 5mm・Century patna 3mm・ムラサキイネの場合は、種子の滅菌がむずかしく培養し難かつたが、滅菌に成功した場合は、カルの生長が良好であり、白色の塊状カルスを形成した。金南風・Vialone nano はともに白色塊状のカルスを形成しその生長は良好であつた。Vialone nano の場合には、さらに培養を続けると小粒状のパラパラなカルスとなり、約 190 日後には 1mm 程度の多数のカルス粒となつた。短銀坊主の場合は、置床後 1 週間ないし 2 週間程度は、白色

のカルスを形成するが、3 週間後には茶褐色の部分が多くなり、8 週間程度で小粒状のカルスとなり、その生長は悪くなつた。Cody もカルの生長悪く、5 週間程度で茶褐色となり、小粒状のカルスとなつた。Century patna は、白色塊状のカルスとなつたが、カルの生長はもつとも悪かつた。

以上に述べたようなイネのカルス組織をもちいて、種々な品種につき細胞核の大きさを測定した。その結果を Table 1 に示した。30 日間培養することにより、金南風の胚から形成された組織について、2 回それぞれ異つた組織から懸濁液を作成し検鏡をおこなつた。各実験につき 100 個の細胞核をえらんで、その直径を測定した。この 2 回の実験結果 (Exptl. 1 および 2) から、100 個の細胞核についての平均値が、それぞれ 6.9μ と 6.8μ であることを知ることができる。このことから、100 個の細胞核についてその大きさを測定した場合、測定誤差はほとんどないものと考えられるので、以後の実験ではすべて、懸濁液中の細胞から 100 個の細胞核をできるだけ無作為にえらんで、その大きさを測定した。またこの実験の結果から、測定した細胞核の 70% ないし 80% が 5.5μ から 7.9μ までの間の大きさであることがわかる。

観察された細胞核の形態は多く円形であり、核膜と仁を認識することができたが、一部楕円形または長楕円形

Table 1. Size of the cell nuclei in the callus developed from rice embryos under aseptic culture using various varieties

Frequency distribution of nuclei (diameter in μ)	Varieties								
	Kinmaze Exptl. 1	Kinmaze Exptl. 2	Kinmaze Average	Kinmaze Exptl. 3	Cody	Century patna	Vialone nano	Tan ginbozu	Murasaki ine
3.0~3.4	0	0	0	0	0	0	0	0	1
3.5~3.9	0	0	0	0	0	0	0	1	1
4.0~4.4	0	0	0	1	1	1	2	2	16
4.5~5.9	1	1	1.0	2	3	1	7	9	21
5.0~5.4	5	11	8.0	15	6	9	8	16	24
5.5~5.9	12	9	10.5	20	13	15	19	26	14
6.0~6.4	19	16	17.5	17	17	14	18	19	11
6.5~6.9	17	21	19.0	16	9	18	13	13	4
7.0~7.4	24	17	20.5	10	18	23	16	6	4
7.5~7.9	11	10	10.5	11	12	8	7	6	1
8.0~8.4	3	6	4.5	4	6	5	3	1	1
8.5~8.9	3	3	3.0	2	7	5	6	0	1
9.0~9.4	1	3	2.0	1	3	0	0	0	0
9.5~9.9	2	2	2.0	0	4	1	1	1	1
10.0~10.4	1	1	1.0	1	1	0	0	0	0
10.5~10.9	1	0	0.5	0	0	0	0	0	0
Average of diameter (μ)	6.9	6.8	6.85	6.5	7.0	6.7	6.4	6.0	5.3
Volume (μ^3)	—	—	168	—	180	158	137	113	78
Culture periods (days)	30	30	30	30	67	33	67	40	39

のものもある。乳鉢ですりつぶした際に、変形したと思われる細胞核も観察された。また多くの細胞核は細胞中に存在しているが、一部細胞質から分離して遊離状態となつた核も見られた。

以上の実験は、前述の細胞懸濁液をスライドガラスにとり、カバーガラスをかけて測定したものであるから、測定された細胞核が、カバーガラスのために扁平となり、細胞核の直径が実際よりも大きく測定される危険性も考えられる。したがつて次の実験 (Exptl. 3) では、エルマの Fuchs-Rosenthal の血球計算板をもちい、これに細胞懸濁液をのせて細胞核の大きさを測定した。すなわち、この血球計算板の深さは 200μ であるから、上の危険性は充分除きうるものと思う。この実験の結果は、Table 1 に見られるように、前述の 2 回の実験の平均値から、著しくはことならない。このことから以後の測定においては、スライドガラスとカバーガラスをもちいる通常の方法がもちいられた。

Cody・Century patna・Vialone nano・短銀坊主・ムラサキイネなどに関しては、33 日から 67 日までの各培養期間ののちに、培養組織を固定し、検鏡・測定した。その結果は Table 1 に示されている。ここに見られるように、Cody の細胞核が金南風のものより大きい以外は、いずれもその細胞核の直径の平均値は、金南風のそれよりも小さい。なかでもムラサキイネは著しく小さい。細胞核の形状を球形と考えて体積を計算した結果を Table 1 に示してあるが、この結果から、ムラサキイネの細胞核は、金南風のその 2 分の 1 以下の平均体積であることを知り得る。しかしイネの培養組織の細胞核の形態を球形とするか円盤形とするかは、今後の検討にまかたい。

II) 細胞分裂の過程と細胞核の生長

金南風についての 2 回の実験の平均値、すなわち Table 1 に示した実験結果から、細胞分裂の進行中における細胞核の大きさの増大に関する、時間的経過を推測することができる。すなわち、培養組織における細胞核は、細胞分裂の間期のあいだにその大きさを増大するものと考えられるのであるが、そのあいだの種々な時期にある細胞核が、Table 1 に見られるような種々な大きさを示し、一定の変異を示すものと考えられる。

いま分裂終期から分裂前期直前までの期間、すなわち間期の経過による時間を 100 とし、著しい頻度で見いだされる大きさの核をもつ細胞を、間期中の経過において、細胞核の生長に関し比較的長い時間を必要とする時期にあると考えるならば、Fig. 1 に示したような経過をたどつて、イネのカルスにおいては、その細胞核

Fig. 1. Changes of nuclear diameter in rice callus plotted as a function of relative interphase time culculated from nuclear diameter frequency using Kinmaze variety.

の大きさの増大がおこるものと推測することができる。この図では、それぞれの大きさの核以下の大きさをもつ核の数が、横軸に示されている。この図から明らかなように、分裂終期直後の細胞核は比較的急速にその直径を増大するが、その後直径の増大は緩慢となる。しかし核の生長が進むにつれて、その後その増大速度は再び速くなり、分裂直前には、急速にその大きさを増大すると考えることができる。

III) コルヒチン処理の影響

細胞核に対するコルヒチンの影響を、イネの無菌培養組織において検討し、その結果を Fig. 2 に示した。いずれも品種金南風をもちい、1mM コルヒチン処理の場合は、培地に置床後 28 日目のカルスに前述の方法にてコルヒチン进行处理し、その後 13 日目にその組織を固定した。0.1mM の場合は、同じく置床後 36 日目のカルスにコルヒチン进行处理し、その後 22 日目に固定した。ここでは細胞核の大きさが、コルヒチンにより影響をうけていることがわかる。

すなわちコルヒチンの 1mM で処理した場合は、直径 7μ 前後の細胞核が多く一部 10μ 以上の大形核を見ることができたが、コルヒチンの濃度が高すぎてカルスの発達が抑制されたためか、大形核の割合は比較的すくなかつた。しかしコルヒチンの 0.1mM による処理の場合は、核の直径の平均値は 9.0μ であり、1mM のコル

Fig. 2. Effects of colchicine concentrations upon nuclear diameter in the rice callus using Kinmaze variety. : colchicine at 1mM, : colchicine at 0.1mM.

ヒチン処理の場合が 7.4μ であるのと較べれば、この場合細胞核の形態が大形となつていことがわかる。また 0.1mM のコルヒチン処理では、Fig. 2 から見られるように、直径 10μ 以上の大形核が多数観察されており、 15μ 程度の巨大核も確認することができた。直径 15μ の核の体積は $1769\mu^3$ となり、この実験から、コルヒチン処理により $1000\mu^3$ 以上の細胞核が比較的多く観察できることが明らかである。

あらかじめコルヒチンを 1mM となるようにくわえた培地に種子を置床した場合には、培養組織の形成は見られたが、その後の発達は見られず、種子と共に黒変してしまつた。すなわち、培地にあらかじめコルヒチンをくわえる場合には、 1mM 以下の濃度がもちいられねばならない。

また前述の各品種およびコルヒチン処理組織のいずれにおいても、細胞分裂像を観察することができなかった。山田 (1965) は、*Tradescantia* にて培養初期に分裂像のすくなかつたことを述べているので、このことから今後の継代培養の結果に期待したい。

IV. 考 察

イネの種子を、2,4-D・イースト抽出物などを含む栄養培地に無菌条件下にて培養した場合、主に Scutellum

または Coleorhiza 付近起源のカルス組織が形成される (MAEDA, 1965)。本報告では、6 種類のイネ品種でこのような培養組織の発達を観察し、この組織を構成する細胞における細胞核の大きさを測定した。その結果、細胞核の直径の平均値は、品種間に著しい差異のあることを確認することができた。特に、短銀坊主・ムラサキイネにおいては、細胞核が小さい、この事実はこれらの品種が他の正常な品種と較べて、その核内物質が量的にまた質的に異つていことを示すものと考えられ、これらの品種の遺伝的特性と考えあわせて大変興味深い。

MATTINGLY (1963) は、*Vicia faba* の遊離核においてその平均直径を測定し、約 8μ であることを示し、KUEHL (1964) はタバコ葉における遊離核で、 4μ ないし 8μ 平均 6.0μ の直径を認めている。本報告においては、金南風でその平均直径が約 6.8μ であることを示した。またその他のイネ品種における測定値から、イネの培養組織における細胞核の大きさは、ほぼタバコ葉のものより大きく、ソラマメ根より小さいことを知ることができた。

イネのカルスにおいて、間期にある細胞核は Table 1 に見られるように種々な大きさを示しており、この事実はさらに Fig. 1 に見られるように、細胞分裂の間期に

における直径増大の過程を、ある程度反映しているものと考えることができる。WOODARD *et al.* (1961) は *Vicia faba* の根端細胞において細胞核を観察し、その体積を算出した。その結果細胞分裂終期直後の約 $145\mu^3$ から $1553\mu^3$ 程度まで増大すると述べており、GRUNDMANN and MARQUARDT (1953) は同じく *Vicia faba* の根において、 $100\mu^3$ から $1000\mu^3$ 以上まで、細胞分裂の間期中にその細胞核の体積が増大することを示している。

この報告では、イネのカルス組織において、細胞核の直径は約 5.0μ から約 10.0μ まで増大することを示した (Fig. 1)。また GRUNDMANN and MARQUARDT (1953) および WOODARD *et al.* (1961) は、細胞分裂終期直後と前期直前において、細胞核の体積増大は著しいと述べており、本報告で示したイネのカルス組織の結果とよく一致している。しかしながら、*Vicia faba* の根端でも、イネの生長中のカルスにおいても、正常な細胞分裂能力をうしなつた老化細胞を多く含むものと考えられるので、そのような静止期の細胞核の大きさを、平均値程度の大きさと考えるならば、Fig. 1 に示したような曲線から本来そのような静止期の細胞核をのぞかなければならない。しかしこれを除くことは、現在の方法では不可能である。ここでは、正常な細胞分裂をおこなっている細胞を多く含むほど、平均値に近い大きさの核の数はすくなくなり、その大きさ付近において、曲線はより急傾斜とならねばならぬことのみを、指摘しておく。

カルスの外部形態に関する知見からは、いずれも白色または茶褐色を呈した、塊状または小粒状のカルスを形成することを認めた。これらのカルス形成の品種間差異、および培養条件に関する反応は、近く別に報告することとするが、ムラサキイネにおいて、他の品種と同じく白色あるいは茶褐色を呈し、紫色を示さなかつたことは、培養条件中の光の影響とも関連して、今後の興味ある課題である。

本報告ではまた、イネの胚組織から脱分化することにより生じた培養カルスをコルヒチン処理することにより、巨大な細胞核を誘導し得ることを示した。すでに4倍体イネにおける量的形質の変化については、種々の報告がある (OKA, 1954)。また周知のように、雑種不稔を示すイネ品種群において、その4倍体雑種が稔性の高いこと (MASIMA and UCHIYAMADA, 1955 および MASIMA, SATO and UCHIYAMADA, 1958)、雑種性4倍体イネの後代において着粒数および稔性の向上すること (NAGAMATSU, 1954)、などが示されている。また倍数体イネの放射線に対する感受性も、種々検討されている

(FUJII and MATSUMURA, 1959 および YAMAGUCHI and ANDO, 1959)。さらに8倍体イネの形成と、その個体における気孔・花粉粒などの形態変化についても、報告がなされている (WATANABE and ONO, 1965)。

これらの報告は、コルヒチンによる細胞核の巨大化に関する研究が、我々にとって魅力的な課題であることを示している。本研究で明らかにされた結果は、倍数体または異数体イネにおける細胞核と細胞質との関係を究明する上で、イネのカルス組織が良い材料であることを示している。これらの事実は、前報 (MAEDA, 1965) でイネの遊離単細胞が容易に作出し得たこととあわせて、イネの遺伝および育種学に対して、微生物で確立された諸手法を準用出来るかも知れぬという期待を、我々にいだかせるものである。

おわりに、本実験の実施に関し、種々ご教示・ご援助をいただいた、志村 喬教授および清水正治助教授に感謝すると共に、ご助力をえた前田和子氏に謝意を表する。

V. 摘 要

イネの6品種、金南風・短銀坊主・ムラサキイネ・Cody・Century patna・Vialone nano をもちいて、無菌培地上にカルス組織を作成した。形成されたカルスの外部形態を観察すると共に、このカルスをもちいて、各品種のイネの細胞核の直径を測定し、その平均値および変異の状態を比較検討した。細胞核の直径の平均値は、ムラサキイネ・短銀坊主・Vialone nano・Century patna・金南風・Cody の順に大きくなる。

金南風において培地にコルヒチンを無菌的にくわえた場合、その細胞核が巨大化することを観察し得た。

以上の実験結果にもとづき、イネのカルス組織において、細胞分裂の間期のあいだに細胞核が生長する過程につき考察をおこなつた。またコルヒチン処理細胞における、遺伝的・育種の意義につき若干の考察をつけくわえた。

参 考 文 献

- FUJII, T. and MATSUMURA, S. 1959. Radiosensitivity in plants. III. Experiments with several polyploid plants. Japan. J. Breeding 9 : 245~252.
- GRUNDMANN, E. und MARQUARDT, H. 1953. Untersuchungen an Interphasekernen des Wurzel-Meristems von *Vicia faba* I. Mitteilung Desoxyribosenukleinsäure-Gehalt und Grösse der Kerne. Chromosoma 6 : 115~234.
- KUEHL, L. R. 1964. Isolation of plant nuclei. Z. Naturforsch. 19 b : 525~532.
- MAEDA, E. 1965. Callus formation and isolation of single cells from rice seedlings. Proc. Crop Sci. Soc. Japan 34 : 139~147.
- MASIMA, I., SATO, H. and UCHIYAMADA, H. 1958.

- Correlations between varietal hybrid sterility and tetraploid sterility in rice plants. Japan. J. Breeding 7: 141~144.
- MASIMA, I. and UCHIYAMADA, H. 1955. Mechanism of recovering of fertility in autotetraploid rice. Japan. J. Breeding 5: 163~166.
- MATTINGLY, S. A. 1963. Nuclear protein synthesis in *Vicia faba*. Exptl. Cell Res. 29: 314~326.
- NAGAMATSU, T. 1954. Observations on some characters in F_2 and F_3 of induced inter-subspecific tetraploid rice, with special reference to the sterility and number of spikelet per ear compared with autotetraploid. Japan. J. Breeding 3 (No. 3~4): 71~75.
- NAGATO, K. and KÔNO, Y. 1963. On the grain texture of rice I. Relations among hardness distribution, grain shape and structure of endosperm tissue of rice kernel. Proc. Crop Sci. Soc. Japan 32: 181~189.
- OKA, H. 1954. Studies on tetraploid rice. III. Variation of various characters among tetraploid rice varieties. Japan. J. Genet. 29: 53~67.
- 庄野邦彦 1965. 継代培養中に生ずる培養組織の性質の変化について, 竹内正幸編 植物組織培養法による分化の研究 16~19.
- WATANABE, Y. and ONO, S. 1965. Cytogenetic studies on the artificial polyploids in the genus *Oryza*. I. Colchicine-induced octoploid plants of *Oryza latifolia* DESV. Japan. J. Breeding 15: 149~157.
- WOODARD, J., RASCH, E. and SWIFT, H. 1961. Nucleic acid and protein metabolism during the mitotic cycle in *Vicia faba*. J. Biophys. Biochem. Cytol. 9: 445~462.
- 山田卓三 1965. 培養細胞における変異と分化, 竹内正幸編 植物組織培養法による分化の研究 28~33.
- YAMAGUCHI, H. and ANDO, A. 1959. Radio-sensitivity of gamma-irradiated autotetraploid in rice. Japan. J. Breeding 9: 169~172.

Summary

The rice callus under sterile condition was developed using six varieties: which were Kinmaze, Tan-ginbozu, Murasaki-ine, Cody, Century patna, and Vialone nano, composed of Japonica type, Indica type, dwarf type, etc. The appearance of the callus developed was observed in each variety. The diameter of the nuclei of each callus was estimated, the average and the variation being compared. It was found through the frequency distribution analysis (Table 1) that the average value of the nuclear diameter increased in the following order: Murasaki-ine, Tan-ginbozu, Via-

lone nano, Century patna, Kinmaze, and Cody. In the Kinmaze variety the nuclei were observed to be giant ones since the colchicine had been added to the agar medium aseptically. Based on the experimental result, the process of nuclear growth during interphase in mitosis was discussed in the rice callus. Also, some consideration was given to colchicine treated cells through the genetic and breeding aspects of rice.

E. MAEDA

Faculty of Agriculture, Nagoya University
Nagoya