Masahiro MII: Studies on the Haploid Formation from Immature Pollen Grain.

I. Relation between Pollen Stage and the Plantlet Formation and the Process of Embryoid Formation in *Nicotiana tabacum*. (with English Summary, p. 33)

Synopsis. The relation between pollen stage and the plantlet formation and the process of embryogenesis from pollen grain were studied by using two varieties of *Nicotiana tabacum*. Haploid plantlets were induced from immature pollen grains in uninuclear to early binuclear stage and no plantlet was formed in tetrad stage in both varieties. In the process of embryoid formation from immature pollen grain, it was clarified that the vegetative nucleus played the main part of embryogenesis and the generative nucleus rarely divided. Two types of cell division were also observed, one of which had clear cell walls and the other had not. The cause of these phenomena were discussed.

花粉からの半数体育成に関する研究

I. タバコの幼植物形成と花粉のステージとの関係、ならびに胚状体形成過程

三 位 正 洋
(名古屋大学農学部, 各古屋市)

緒 言

GUHA and MAHESHWARI (1964) が *Datura innoxia* で葯培養による半数体植物育成に成功して以来, 種々な植物で数多くの報告がなされたが (新関 1970), そのうち成功例はわずかであり, 大部分の植物では解決の糸口さえつかめていない。葯培養による半数体育成は当然花粉からの幼植物形成を意味するが, *Nicotiana* (中田・田中 1968, NITSCH 1969, SUNDERLAND and WICKS 1971, NÖTH and ABEL 1971), *Datura* (GUHA and MAHESHWARI 1967, NARAYANASWAMY and CHANDY 1971) 以外ではこの点についての的確な調査が行なわれていないようである。

本研究は以上の現状を認識したうえで, 現在最も半数体育成の容易となつているタバコを用い, 花粉からの胚発生初期分裂過程を追求し, あわせて中田・田中(1968)以来問題となつている胚発生誘導に適切な置床時の花粉のステージを明らかにすることにより, 葯培養法に関する基礎的な知見を得る目的で実験を行なつたものである。

材料および方法

供試品種には *Nicotiana tabacum* の Bright Yellow と Xanthi を用いた。

培地は NITSCH (1969) で, pH は 0.1~1.0 N の 1972 年 6 月 17 日受領

NaOH あるいは HCl で 5.6 に調整した。培養には直径 2.5 cm, 高さ 12 cm の培養ビンを用い, 培地量は 1 ビン当たり約 10 ml とし, 栓にはアルミ箔を用いた。培地を入れたビンはオートクレーブにより 120°C 10 分間滅菌した。

材料の蕾はオスバン 10 倍液で軽く洗い, 水洗したのち 1% の次亜塩素酸ソーダ溶液で 8 分間消毒を行ない, 滅菌水で 6 回の洗浄後, 滅菌濾紙に移し余分な水を吸い取つた。植付けにあつては 1 つの蕾中の葯はすべて同じ培養ビンへ水平に置床し, その際花糸はなるべく取り除くように注意した。植付け後の培養は 25°C に保つた終日照明の定温室で行なつた。

花粉分裂過程の観察には Bright Yellow の長さ 13~20 mm の一核期~二核分裂期の蕾を用い, 1 ビン当りに 1 つの蕾中の葯全部を植付ける方法で, 合計 40 個分の蕾を供試し, 経時的に sampling を行なつて内部の花粉の変化を追跡した。また比較の対象として植物体上での正常な二核分裂をも観察した。なお花粉の核染色には Schneider 氏アセトカーミンを用い常法により行なつたが, 一部 Feulgen 染色も使用した。

葯培養により得られた植物の染色体数は根端において調べたが, この際染色にはアセトオルセインを用いた。

結 果

1. 花粉のステージと植物体発生率の関係
開花最盛期の蕾の長さ花粉の発育ステージとの関係

Fig. 1. Relations between pollen stage and the growth of petal and sepal in *Nicotiana tabacum* cv. Bright Yellow. (Dec. 10—Jan. 3)

Table 1. Relations between bud length and pollen stages

No.	Bud length (mm)	Pollen stage	
		Bright Yellow	Xanthi
1	5—8	PMC*-Meiosis	Meiosis-Tetrad
2	9—12	Meiosis-Tetrad	Uninuclear stage
3	13—16	Uninuclear stage	Pollen mitosis
4	17—20	Pollen mitosis	Binuclear stage
5	21—24	Binuclear stage	"
6	25—28	"	"
7	29—32	"	"
8	33—36	"	"
9	37—anthesis	"	"

* PMC : pollen mother cell

Table 2. Relations between pollen stages and plantlets formation in *N. tabacum* cv. Bright Yellow

Stage	TB*	TA*	No. of anthers opened locules	color of anthers**			No. of buds or anthers produced plantlets			
				Br.	YBr.	Y.	32 days		53 days	
							PB*	PA*	PB*	PA*
2	9	42	0	33	7	2	0	0	0	0
3	17	83	12	74	7	2	5	7	5	7
4	6	28	14	21	0	7	2	8	6	12
5	3	14	8	14	0	0	3	6	3	6
6~9	5	24	19	24	0	0	1	1	1	1

* TB : No. of buds used. TA : No. of anthers used. PB : No. of buds produced plantlets. PA : No. of anthers produced plantlets.

** Br : Brown, YBr : Yellowish brown, Y : Yellow.

を Bright Yellow で 12 月に調査したものを Fig. 1 に示した。蕾の生長は初期にがく片の伸長があり、その停止する時点から急激な花弁の伸長が起こるが、花粉はそれと密接な發育経過をとり、Xanthi でも同様な傾向が認められた。そのため両品種を蕾の長さで 9 ステージにわけ以後の実験を行なった (Table 1)。

(1) Bright Yellow

Table 2 は花粉のステージの違いによる植物体の発生数と葯の裂開・呈色の状態を調査した結果である。置床した葯は日時の経過とともに褐変していくが、それはより生長した蕾からとつた葯で早く起こり、色もより濃い褐色となる。子葉を備えた幼植物体は 25 日頃から出現しはじめるが、それに先立ち葯は成熟時に起こるのと同様の部位で裂開する。しかし蕾の發育の進んだものでは葯の裂開と幼植物の発生は一致しなかつた。

植物体はステージ 3~5 で発生しやすく、ステージ 3 においては主として肥大葯から幼植物の発生がみられ、その際の葯の色は黄褐色がほとんどであつた。ステージ 6 でも植物体を 1 個体のみ発生したが、この場合ステージ 5 に近い蕾から取つた葯においてであり、本個体はその後の培養の結果アルビ

Fig. 2. Difference of ability of plantlet formation by pollen stages. (cv. Bright Yellow) (51 days after inoculation)

Table 3. Relations between pollen stages and ability of plantlet formation (cv. Bright Yellow)

Stage	TB	TA	PB	PA	No. of anthers formed plantlets				
					Degree*			Site	
					≡	≡	+	one locule	both loculi
2	10	46	0	0	—	—	—	—	—
3	14	65	12	30	24	4	2	26	4
4	15	74	15	47	42	4	1	44	3
5	2	10	1	3	0	3	0	3	0
6	10	49	0	0	—	—	—	—	—

51 days after inoculation

* Sign (+) means the degree of plantlet number formed in one anther.

≡: 1—5, ≡: 6—10, +: over 11

ノであつた。植物体の発生は全区を通じてほぼ 50 日までに完了した。この結果から四分子期以前のステージ 2 と二核期後半のステージ 6 以降は植物体を発生しないことがほぼわかつた。

これをさらに検討するため、ステージ 2～6 の範囲で実験を行ない Table 3, Fig. 2 に示す結果を得た。

幼植物発生の割合を供試蕾数 (TB) に対する幼植物発生蕾数 (PB) : $PB/TB \times 100$ と供試葯数 (TA) に対する幼植物発生葯数 (PA) : $PA/TA \times 100$ の 2 通りであらわした場合両者ともほぼ同様な傾向を示し、前者であらわした場合ステージ 4 では 100% の発生率を示した。

幼植物を発生する花粉の発育時期は一核期 (ステージ 3) から二核期前半 (ステージ 4, 5) で、とくに発生しやすい時期は 2 核分裂期 (ステージ 4) にあり、これらの時期以前以後とも全然幼植物の発生はみられなかつた。その後 2 回の反復実験を行なつたが、ステージ 6 でわずかに発生がみられた以外はほぼ同様な結果が得られた。

Fig. 3. Germinated pollen grains in stage 6 after 27 days of culture.

また 1 葯当りの発生個体数の程度をみると、前回と同様ステージ 4 が最も多く、ついで 3, 5 の順になっている。また幼植物発生は多くの場合、葯の片側で起こるようであつた。ステージ 6 は葯が大きく裂開し、内部の花粉は葯ごとに異なつた状態を呈しており、肥大して巨大花粉粒を多く蔵する葯、あるいは裂開した部分からまとまつて花粉管を伸ばし、束になつて培地面にへばりついている状態の葯が見られた (Fig. 3)。また幼植物を発生しなかつた葯でも、同一の蕾内の他の葯のどれかが幼植物を形成している場合、その葯内の花粉が分裂し、embryoid を形成していることがみられた (Fig. 4)。しかし、どの葯も幼植物を発生しない蕾の場合、花粉の分裂はおこつていなかつた。

(2) Xanthi

植物体の発生する大まかな花粉のステージを調べるため、ステージ 2, 4, 7, 9 を用い日を追つて発生率を調べた結果を Table 4 に示した。

供試葯当りの植物体発生率は Bright Yellow に比べて低く、最大でも 27% であつた。本品種の場合も置床 20 日経過後から植物体を発生しはじめ、50 日で完了した。

発生率を向上させる目的で、次にココナツトミルク (CM) 20% を加えて実験を行なつた。その結果は Table 5, Fig. 5 に示すとおりである。

CM を加えるとステージ 2 では発生率が増加したが逆にステージ 4 では減少した。最大発生率はステージ 2 の

Fig. 4. Embryoids which stopped the growth in the anther. (60 days of culture) Cell wall are visible.

Table 4. Difference of the ability of plantlets formation by pollen stages (cv. Xanthi)

Stage	Bud length	TB	TA	PB	PB/TB ×100	PA			PA/TA ×100
						45 days	22 days	35 days	
2	9—10	15	71	3	20	0	0	2	3
4	19—20	15	70	7	47	7	7	14	19
7	29—31	13	59	2	15	1	1	2	2
9	40—41	14	62	0	0	0	0	0	0

37% であり、これは一核期に相当し、以後二核分裂期を経て二核期前半まで発生がみられるが、それ以後になると全く発生はみられなかった。

一核期の発生率が最も多いので、この付近のステージを厳密に検討するため、同様の培地で実験を行なった。その際、各蕾から1個だけ葯をとり出して花粉のステージを調べ、他の4個を1ビンに置床する方法をとった。その結果は Table 6 に示した。

四分子期以前の花粉母細胞を持つ葯からはまったく植物体は形成されず、培養後の顕微鏡による観察では四分子よりほとんど進行せず、それが分離してバラバラになったものでも、はつきりした花粉膜の形成が認められなかった。CM を加えると、一核期が植物体を最も発生しやすい時期であることが本実験により再確認された。

2. 花粉分裂過程の観察

自然状態での花粉の二核分裂は Fig. 6 に示すようであつた。すなわち分裂期の核はそれ以前よりも広がり、端の方へよつていき、そこで不等分裂の形をとる。分裂終期になると細胞膜が端に位置する核の周囲をとり囲むようにして形成され、花粉は2細胞となる。その際外側に位置する方が生殖核であり、内側に位置する方が栄養

Table 5. Relations between pollen stages and ability of plantlet formation. (cv. Xanthi)

Stage	TB	TA	PB	PB/TB ×100	PA	PA/TA ×100	No. of anthers formed plantlets				
							Degree*			Site	
							≡	≡	+	one locule	both loculi
1	10	44	0	0	0	0	—	—	—	—	—
2	10	46	6	60	17	37	8	5	4	12	5
3	9	43	4	44	6	14	0	2	4	4	2
4	10	49	2	20	3	6	0	0	3	3	0
5	10	50	1	10	4	8	4	0	0	4	0
6	10	47	0	0	0	0	—	—	—	—	—
7	10	48	0	0	0	0	—	—	—	—	—
8	10	45	0	0	0	0	—	—	—	—	—
9	10	49	0	0	0	0	—	—	—	—	—

50 days after inoculation

* See in Table 3.

Fig. 5. Difference of ability of plantlet formation by pollen stages (cv. Xanthi) (50 days after inoculation.)

核となつて、分裂以後両者は染色具合ではつきり区別がつくようになる。すなわち生殖核は濃く、比較的容易に染まるが、栄養核は薄く大きく広がって染まる。これ以後生殖核はレンズ状に大きくなり、柱頭上で発芽するまで2核状態を保つ。

この二核分裂は筆者の観察では午前中に限られ、午前10時頃に頻度が高いように思われた。またこの分裂は同一葯内の同調性がかなり乱れており、1核から分裂中のもの、2核状態になったものが混在しており、なかには栄養核の分裂によつて3核にまでなつた異常なものが認められた (Fig. 6-h)。

一方葯培養の場合には Fig. 7, 8 に示すようであつた。培養3日後にはま

Table 6. Relations between pollen stages and ability of plantlet formation. (cv. Xanthi)

Pollen stage	TB	TA	PB	PB/TB ×100	PA	PA/TA ×100	Degree*		
							≡	≡	+
PMC-Tetrad	13	52	0	0	0	0	—	—	—
Uninuclear stage	12	48	5	42	10	21	0	4	6
Pollen mitosis	3	12	2	67	2	17	1	0	1

55 days after inoculation

* See in Table 3.

だ1核のままであつたが、6日後には1核または2核の花粉がみられ、8日後には初めて3核ないし4核になる分裂期の花粉 (Fig. 7-a~d) やでんぶんを蓄積し肥大した花粉 (Fig. 7-e) が認められた。10日目にも異常な分裂核がみられ、14日目に至ると肥大花粉や正常に発達した花粉の中に混じつて、数細胞からなる塊りが少数みられた。17日後には多細胞塊が少数みられ、2~5核や分裂中の像もみられた (Fig. 7-i~o)。27日後 (Fig. 8) には比較的多くの多細胞塊あるいは多核体——細胞壁がはつきり形成されるもの (Fig. 7-n, 8-g) とそうでないもの (Fig. 7-o, 8-a~d) の2つのタイプ——がみられ、葯ごとにどちらか一方が多く、両者は同一葯内にはあまり混在していなかつた。また将来 embryoid になると思われる花粉は、正常なものが細長く、表面に溝ができるのに対し、形が丸く細胞質がカーミンにうっすら薄まるように思われた。その後35日目頃になると、葯を押し開けるようにして、ぼつぼつと幼植物の発生が認められ、なかには embryoid のままであふれてくるものもみられた。

以上の分裂過程において、Fig. 7-a, d, j, 8-a, b, e にみられるように、分裂は主として栄養核の方で起こり、一部生殖核の分裂もみられた (Fig. 7-a, b, c, f)。しかしどちらの核に由来するのかはつきりしないものもあ

Fig. 9. Chromosomes in a roof tip cell. Haploid chromosome number ($2n=24$) is observed.

り、培養状態での1核から2核への分裂では生殖核と栄養核の区別がつけられない状態のものもあつた (Fig. 7-f, g, h)。

3. 染色体数

得られた植物体の根端における染色体数調査の結果 Bright Yellow は30株中28株、Xanthi は15株中14株が $2n=24$ をもつ半数体であつた (Fig. 9)。

考 察

タバコの葯培養に適した花粉のステージについて、中田、田中 (1968) は Bright Yellow と Hicks の2品種を用いて実験を行ない、四分子期をその重要なステージとし、一核期にも若干の幼植物発生がみられたと報告した。ついで NITSCH (1969) は一核期が最も幼植物の発生するステージであり四分子期では形成されないと述べ、SUNDERLAND and WICKS (1971) は一核期後半から二核期前半、とくに二核分裂 (花粉分裂) を機会にして embryogenesis が起こり、その際栄養核の方が主体となつて分裂してくることを観察した。

今回筆者が行なつた実験では、従来の報告 (中田、田中 1968) どおりタバコ *Nicotiana tabacum* cv. Bright Yellow で花粉に由来する半数体植物育成に成功し、Xanthi でも半数体植物を得ることができた。

両品種とも幼植物を発生させる置床時の花粉のステージは一核期から二核期前半においてでであり、四分子期以前にはまったく認められなかつた。これは NITSCH (1969, 1972) や SUNDERLAND and WICKS (1971), NÖTH and ABEL (1971) などの結果と一致しており、中田、田中 (1968) の四分子期分裂説は疑問である。

幼植物発生を供試蕾当りと供試葯当りで比較した場合、両者ともほぼ同様な傾向を示すため、どちらの表示でも大差ないことがわかつた。また1葯当りの幼植物発生も花粉のステージと密接な関係を有しているが、同じ蕾からとつた葯の間でも幼植物形成の有無に大きな差異があり、また葯の片半分からの発生例が多いことは滅菌、植付け操作の微妙な違いが葯ないし内部の花粉の養分吸収等に大きな影響をおよぼすものと考えられるので、実験にあたっては細心の注意が必要であろう。

Bright Yellow と Xanthi とを比較すると、Bright Yellow の方が幼植物発生は高率でおこり、NITSCH (1969, 1972) の結果と同様、品種間に大きな差が認められた。

さらにもつとも発生率の高いステージをみても、Bright Yellow では二核分裂期にあり、Xanthi の方は

一核期であり、品種によつて差があることが認められた。ただし Xanthi の方は各実験によつて発生率が大きく変動するのでこれまでの実験では正確なことはいえない。

またココナットミルクの添加はこの実験の範囲ではどの程度植物体形成に効果があるのかはつきりしないが、*Datura innoxia* (GUHA and MAHESHWARI 1967) の場合にみられるほどには、タバコの場合必要不可欠なものでないといえることができる。

一核期から二核期初期の限られた範囲で花粉が正常な発達をせず、embryogenesis をひきおこすという事実は、その主因が一核から二核への体細胞分裂にあることを示唆しており (SUNDERLAND and WICKS 1971) この時期には外部からの刺激 (この場合は親植物から切り離され培地上に置かれたということ) によつて正常な花粉への発達過程から脱分化しやすくなつていと考えられる。また自然状態の二核分裂でも、栄養核による分裂異常が認められていることからタバコは他の植物に比べて、この時期には環境に対しかなり不安定なのではないかと推察される。その不安定な状態は二核になつて間もなく終わり、それ以後は全く分裂しなくなると考えられよう。*Datura metel* の場合も一核期の花粉を用いており (NARAYANASWAMY and CHANDY 1971), この場合も同様なことが考えられよう。ただ *D. innoxia* では開花寸前の花粉を用いている (GUHA and MAHESHWARI 1964~67) のでこれについては詳しい検討がなされた上でないと議論はできない。

花粉の分裂過程の観察から、分裂は主として栄養核の方で起こるのが一般的であり、一部で生殖核の分裂も確認できた。これらは SUNDERLAND らの報告と同様な結果であり、また TULECKE and SEHGAL (1963) も *Torreyia nucifera* の花粉培養で花粉管核の方が分裂しカルス形成することを認めており、猪野 (1954) も自然状態の *Lolium italicum* で栄養核の異常分裂を認めていることから、この両核の分裂能差異はあるいは普遍的なものではないかと思われる。

栄養核が分裂する原因を考えると、まず両核の形態的差異を比較する必要がある。花粉粒中の栄養核は大きく広がっており、きわめて薄く染色され、生殖核は小さいがはつきり染まるのが普通である。核は容積を増した状態で DNA 合成を行なうという報告 (GURDON and WOODLAND 1968) から考えると、前記栄養核の状態は DNA 合成をしやすい状態にあることを示しているのではないかと思われる。

次に生殖核は 2 つの精核に分裂したのち、卵核との合

体で次代の植物を形成するべく運命づけられている以上、環境の変化によつて簡単に分裂しないように内外から厳しく分裂規制を受けているのではないだろうか。それに対し、栄養核は山田 (1972) がイネで述べているように体細胞と同様な性格を持ち、体細胞から分離した単細胞が培養条件のいかんによつて分裂してくるのと同様に、環境の変化に応じて分裂を起こしやすい性質を備えているのではないだろうか。タバコなどはその性質が強いものと考えられる。

タバコや *Datura* などによく組織培養の材料に使われるように、植物の組織全体がきわめて分裂能の高いことと関連ありそうに思えるが、現在のところこれを支持できる結果はないようである (新関 1970)。

また両植物ともナス科に属するが同じ科の植物では *Solanum nigrum* (HARN 1971, 1972), *Lycopersicon* (SHARP and DOUGALL 1971) で報告されているにすぎない。このことは近縁といえども花粉の分裂能には大きな差があることを示しており、筆者の今回の結果や、NITSCH (1969) の結果から同じ *Nicotiana* 属のなかでも種や品種によつて大きな差があり、*Brassica* ではゲノム構成の違いによる差を認めており (KAMEYA and HINATA 1970), 花粉からの植物体形成には遺伝的要因が大きく関与しており、今後種間、品種間の比較あるいはそれらの交雑による花粉分裂能の遺伝的変化も追求する必要がある。

今回の実験で花粉の分裂に 2 つのタイプ——細胞壁のはつきり形成されるものとそうでないもの——が認められ、葯ごとにその傾向が異なるようなので、何か微妙な条件の違いで分裂タイプが変化することが考えられる。またどちらのタイプが幼植物にまで発達しやすいのか今後検討する必要がある。

摘 要

1) 本実験ではタバコ 2 品種 Bright Yellow と Xanthi を用い、両者で花粉起源の半数体植物を得ることができた。

2) 花粉からの幼植物発生は一核期から二核期前半でおこり、四分子期にはまったく発生はみられなかつた。これは NITSCH (1969), SUNDERLAND and WICKS (1971), NÖTH and ABEL (1971) の結果と一致する。その際 2 品種間で差異があり、Bright Yellow では花粉分裂期、Xanthi では一核期において最も発生率が高かつた。

3) 幼植物発生は供試蕾当り、供試葯当りのどちらで表示した場合でも同様の傾向を示し、最も発生率の高い

Fig. 6

Fig. 7

Fig. 8

Fig. 6. Process of pollen mitosis in vivo. ($\times 660$)

- a. Pollen grains at uninucleate stage. The nucleus is located near the side of pollen, and the volume of it is increased.
- b. Prophase.
- c. Metaphase.
- d. Anaphase.
- e. Telophase. Two nuclei are observed, the inner one of which is vegetative and the outer is generative.
- f. Cell wall is appeared around the generative nucleus.
- g. Binuclear pollens. Generative nucleus, lens-like in its shape, is stained more densely than vegetative one.
- h. An abnormal pollen which has three nuclei after mitosis. Vegetative nucleus divided into two but generative one, separated by the wall-like structure, did not divided.

Fig. 7. Process of embryoid formation. (1)

a-g : 8 days, h : 10 days, i-o : 17 days of culture.

- a. Three nuclear pollen grain. Vegetative nucleus is just dividing and the generative one was already divided.
- b, c. Three nuclear pollens. c : $2\text{gn}+1\text{vn}$
- d, j. Vegetative nucleus is just dividing.
- e. Giant pollen grain which accumulates starch.
- f, g, h. Two nuclei. The difference of these two nuclei is not clear.
- i. One nuclear is dividing.
- k. Multinuclear pollen grain. (5vn)
- l. Two nuclear pollen resembling to the normal binuclear pollen grain.
- m. Two cells. Nuclei are not so visible.
- n. Multicellular embryoid. Cell wall is rather visible.
- o. Multinuclear embryoid. Cell wall is invisible.

(a : $\times 1200$, b-o : $\times 600$)

Fig. 8. Process of embryoid formation (2). 27 days of culture. Generative nuclei are densely stained, and the nuclei which stained weakly are derived from vegetative nuclei.

- a. Eight nuclei ($7\text{vn}+1\text{gn}$).
- b. Seven nuclei ($6\text{vn}+1\text{gn}$).
- c, d. Multinuclear embryoid. Cell wall is invisible.
- e. Embryoid which is the same size as other pollen grains.
- f. Two nuclei stained densely in the center of embryoid are probably derived from generative nucleus.
- g. Multicellular embryoid. Cell wall is clearly visible.

(a, b, c, d, g : $\times 600$; e, f : $\times 300$)

ステージでは1葯当りの発生数も多かった。また葯の片半分からの発生例が多かった。

4) 植物体上での二核分裂過程において栄養核の異常分裂が観察された。

5) 一核期後半から二核分裂期の花粉を置床した場合、最初の胚発生的分裂は8日目に観察され、それ以後embryoidを形成し、約1カ月経過後幼植物を発生した。その際栄養核の方が主体となつて分裂してくるが、一部生殖核の分裂も認められた。これらは SUNDERLAND and WICKS (1971), NÖTH and ABEL (1971) の結果と一致する。

6) 花粉から形成された分裂体には細胞壁のはつきり形成されるものとそうでないものがあり、葯ごとにどちらかのタイプにかたよる傾向がみられた。

謝辞：本実験を行なうにあたり、御指導いただいた名古屋大学農学部の加古舜治氏をはじめ、有益な助言をいただいた蓬原雄三氏・鳥潟博高氏、理学部伊藤道夫氏ならびに友人各位に対し感謝の意をあらわします。

引用文献

- 猪野俊平 1954. 植物組織学. 内田老鶴圃, 東京. p. 562~563.
- GUHA, S. and S. C. MAHESHWARI 1964. In vitro production of embryos from anthers of *Datura*. Nature 204 : 497.
- 1967. Development of embryoids from pollen grains of *Datura* in vitro. Phytomorphology 17 : 454~461.
- GURDON, J. B. and H. R. WOODLAND 1968. The cytoplasmic control of nuclear activity in animal development. Biol. Rev. 43 : 233~267.
- HARN, C. 1971. Studies on anther culture in *Solanum nigrum*. Sabrao Newsletter 3 : 39~42.
- 1972. II Cytological and histological observation. ibid. 4 : 27~33.
- KAMEYA, T. and K. HINATA 1970. Induction of haploid plants from pollen grains of *Brassica*. Japan. J. Breed. 20 : 82~87.
- 中田和男・田中正雄 1968. 葯の組織培養による花粉からのタバコ幼植物の分化. 遺殖 43 : 65~71.
- NARAYANASWAMY, S. and L. P. CHANDY 1971. In vitro induction of haploid, diploid, and triploid androgenic embryoids and plantlets in *Datura metel* L. Ann. Bot. 35 : 535~542.
- 新関宏夫 1970. 葯培養と育種. 育種学最近の進歩. 第11集 : 45~51.
- NITSCH, J. P. 1969. Experimental androgenesis in *Nicotiana*. Phytomorphology 19 : 389~404.
- 1972. Haploid plants from pollen. Z. Pflanzenzüchtg. 67 : 3~18.
- NÖTH, M. H. und W. O. ABEL 1971. Zur Entwicklung haploider Pflanzen aus unreifen Mikrosporen verschiedener *Nicotiana*-Arten. Z. Pflanzenzüchtg. 65 : 277~284.
- SHARP, W. R. and D. K. DOUGALL. 1971. Haploid plantlets and callus from immature pollen grains of *Nicotiana* and *Lycopersicon*. Bull. Torrey Bot. Club 98 : 219~222.
- SUNDERLAND, N. and F. M. WICKS 1971. Embryoid formation in pollen grains of *Nicotiana tabacum*. J. Exp. Bot. 22 : 213~226.
- TULECKE, W. and N. SEHGAL 1963. Cell proliferation from the pollen of *Torreya nucifera*. Cont. Boyce. Thomp. Inst. 22 : 153~163.
- 山田記正 1972. 水稻花粉の發育生理学的研究 (1) 花粉の構造変化とその物質代謝について. 日作紀 41 : 320~334.

Summary

Two varieties of *Nicotiana tabacum* L., Bright Yellow and Xanthi, were used to study the haploid plant formation from immature pollen grain by the anther culture technique. Both of them were succeeded to produce the haploid plantlets from immature pollen grains. Although the rate of plantlet formation was expressed in two manners, PB/TB and PA/TA (see in Table 2), both results showed the same tendencies. The number of produced plantlets per anther was maximum at the stage in which the rates of PB/TB and PA/TA were maximum. At this time, the plantlets were produced mostly from one half of an anther.

The pollen stage which produced plantlets was ranged from uninuclear to early binuclear stages. Plantlet formation was never occurred in tetrad and late binuclear stages. This result agreed with ones

of NITSCH (1969) and SUNDERLAND and WICKS (1971). The maximum stage of haploid production was different in these two varieties, that is; at the pollen mitosis in Bright Yellow and uninuclear stage in Xanthi.

The process of embryogenesis from immature pollen grains *in vitro* and pollen mitosis *in vivo* were also observed to clarify the difference between generative and vegetative nucleus. When the anthers of uninuclear and pollen mitosis stage were planted in nutrient media, the first embryogenetic cell division of immature pollen grains were observed in 8 days after inoculation and they grew into embryoid, finally plantlets in about one month. The vegetative nucleus mainly divided successively to grow plantlets. On the other hand, the generative nucleus rarely divided. This result was

agreed with one of SUNDERLAND and WICKS (1971). The same phenomenon had been observed in pollen culture of *Torreya nucifera* (TULECKE and SEHGAL 1963). On the other hand, the abnormality of pollen mitosis, the formation of polynuclear pollen grains by the division of vegetative nucleus was observed *in vivo* and the same phenomenon was also observed in *Lolium italicum* (INO 1954). From these observations, the difference of the unstability or ability for division seems to exist between these two

nuclei. The generative nucleus probably suffers a severe regulation for division until fertilization takes place.

Two types of cell division were observed; one of which had clear cell walls and the others had not. Each anther had a tendency to possess one type of them.

Masahiro MII

Faculty of Agriculture, Nagoya University, Nagoya.