



# ストックの遠縁雑種育成並びに種苗生産への組織培養法の利用

溝添(高岡), 素子

---

(Degree)

博士(学術)

(Date of Degree)

1993-03-31

(Date of Publication)

2015-03-13

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1210

(JaLCD0I)

<https://doi.org/10.11501/3092490>

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001210>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



博士論文

ストックの遠縁雑種育成並びに  
種苗生産への組織培養法の利用

平成5年3月

神戸大学大学院自然科学研究科

溝添 素子

## 目次

はじめに .....	1
第1章 ストックとウォールフラワーの人工交配による属間雑種の試み	
緒言 .....	3
第1節 ストックとウォールフラワーの人工交配	
材料および方法 .....	5
結果 .....	6
第2節 ストックおよびウォールフラワーの柱頭上での花粉発芽	
材料および方法 .....	10
結果 .....	10
第3節 ポリアクリルアミド電気泳動法によるストックおよびウォールフラワーの パーオキシダーゼアイソザイムの比較	
材料および方法 .....	12
結果 .....	16
考察 .....	18
摘要 .....	21
第2章 ストックとウォールフラワーのプロトプラスト体細胞雑種作出の試み	
緒言 .....	23
第1節 プロトプラスト培養	
1. ストックのプロトプラスト	
1) 子葉からのプロトプラスト	
材料および方法 .....	24
結果 .....	26
2) カルスからのプロトプラスト	
(1) 下胚軸および子葉由来カルスからのプロトプラスト培養	
材料および方法 .....	31
結果 .....	34
(2) 本葉由来カルスからのプロトプラスト培養	
材料および方法 .....	40
結果 .....	40
2. ウォールフラワーのプロトプラスト培養	
1) 子葉からのプロトプラスト	
材料および方法 .....	41
結果 .....	41
2) カルスからのプロトプラスト	
材料および方法 .....	42
結果 .....	43

第2節	ストックおよびウォールフラワーの細胞融合	
1.	子葉プロトプラストにおける細胞融合の検討	
	材料および方法	46
	結果	47
2.	ストックカルスのプロトプラスト融合の検討	
	材料および方法	50
	結果	51
3.	ストックとウォールフラワーの細胞融合	
	材料および方法	53
	結果	53
	考察	56
	摘要	64
第3章	ストックの種苗生産における組織培養法の利用	
	緒言	66
第1節	葉片培養と器官分化	
	材料および方法	68
	結果	70
第2節	子葉培養と器官分化	
	材料および方法	74
	結果	76
第3節	下胚軸培養と器官分化	
	材料および方法	83
	結果	86
第4節	葯培養と器官分化	
	材料および方法	100
	結果	101
第5節	電気泳動法による一重咲および八重咲株の識別	
	材料および方法	106
	結果	107
	考察	109
	摘要	117
第4章	種苗生産技術確立のための最適培養環境条件の検討	
	緒言	119
第1節	器官分化におよぼす供試植物の前歴の影響	
	材料および方法	120
	結果	120
第2節	器官分化および再生幼植物の形態に及ぼす培養器栓の影響	
	材料および方法	123
	結果	125

第3節 正常個体および水浸状個体を有する培養器内ガス環境の比較	
材料および方法	131
結果	131
第4節 水浸状個体の正常個体への回復の試み	
材料および方法	133
結果	134
第5節 再生した正常個体および水浸状個体の組織形態学および生化学的比較	
材料および方法	138
結果	141
考察	147
摘要	153
謝辞	155
引用文	156

## はじめに

品種改良の出発点は、多くの場合、交雑によって親植物とは異なる遺伝子組成を持った個体を作成することである。遠縁にあたる種属間の交雑は、植物の種類によって程度の差は見られるが、従来の方法によって交雑種子を得ることは極めて困難とされ、古くは混合受粉法などが試みられ一定の成果を上げるに止まっていた。しかし、近年の組織培養技術の発達は、胚培養や胚珠培養、または試験管内授精、更にはプロトプラストを利用した細胞融合法の技術を用いることによって、従来困難とされていた種属間雑種の作出を可能にしつつある。

ストック (*Matthiola incana* R. Br.) は、地中海沿岸原産のアブラナ科の一年草で、わが国では11月頃から早春にかけて主に切り花として市場に出回る。

近年、ストックは家庭用だけではなく、店舗の飾り付けなどに用いられるようになり、需要の伸びが著しい。ストックの花色は白色、および赤紅、紫、青紫にわたる紫色系が主で、その他に黄色系があるが、クリーム色に近い淡黄色で、濃黄色の花は存在しない。そのためストックの品種間での交雑による濃黄色花のストックの作出は困難である。ストックの需要を拡大するためには、多様な花色を持った品種を多数揃えることが重要であり、その点からも濃黄色の花色を持った品種の育成が待望されている。

そこで、同じアブラナ科に属する他の種、属からの黄色系色素遺伝子の導入が考えられる。本実験では、その一つとして濃黄色の色素を有し、属の異なるウォールフラワー (*Cheiranthus cheiri* L. および *C. allionii* Hort. (シベリアンウォールフラワーとも呼ばれる)) との交雑を試みた。ウォールフラワーは、外見はストックに似ているが、花色は黄、オレンジ、褐色の黄色系の色調を中心としている。

ところで、ストックの花は一重咲株と八重咲株があり、八重咲株は雄ずいと雌ずいが花弁化しているため、種子を得ることはできない。今日市場に出ている品種は、一重咲花を支配する遺伝子と花粉の致死遺伝子とが強く連鎖している系統のため、一重咲花から得た次代の種子は八重咲株と一重咲株が1:1に分離するものがほとんどである。商品価値のあるのは花弁の豪華な八重咲花であり、生産者は苗の大きさなどから不要な一重咲株を苗のうちに選別して抜き取る作

業を行っている。このため八重咲きの優秀な品種の組織培養による大量増殖が可能となれば、従来の八重苗の選別作業を必要とせず、八重咲株だけを生産できるようになる。また、人工交雑や組織培養技術によって商品価値のある新花色をもつ雑種系統が育成できた場合、それらを組織培養によって増殖することにより、遺伝的に均一な植物を大量生産することが可能となろう。

本研究は、ストックとウォールフラワーを両親に用いて、従来の交配実験による属間雑種を作出、並びに両者プロトプラスト間の細胞融合による体細胞雑種の作出による黄色花を持つ品種の育成を試みるとともに、このような方法で作出された有性繁殖の困難な商品価値の高い植物体や八重咲き株を大量増殖する技術を確立するための基礎的知見を得ることを目的に行ったものである。

本論文は4章から構成され、属間雑種作出に関する研究を第1および2章に、大量増殖に関する研究を第3および4章にまとめた。

緒言

ストックは冬場の切花として、重要な位置を占めている一年草である（第1-1図）。花色は白を主に、赤紅、青紫、紫等の紫色系を有する品種が多く存在し、黄色系は濃黄色がなく、クリーム色が存在するのみである。

最近、家庭用だけでなく、店舗の商品のディスプレイ用の花として利用されることが多くなり、濃黄色は人目を引きやすいことから、黄色のストックが作出できれば、その需要はさらに拡大することが予想される。

一方、ウォールフラワーは、ストックと属は異なるが、その外見は類似しており、花色は濃黄色、オレンジ系を中心とした一・二年草である（第1-2図）。ストックとウォールフラワーは原産地も近く、栽培適温など生態的特性が類似している。

現在、新花色や新たな有益な特性を持つ品種を育成するため、新しい育種技術を用いての種間、属間など遠縁の植物間で遺伝子を交換することが試みられており、今後ますます重要になるものと考えられている。

本研究では、濃黄色ストックを作出する手段の一つとして、ウォールフラワーの黄色遺伝子をストックに導入するために、従来より行われている人工交雑法によって両種の交配実験を行った。このような試みは、すでに斉藤（1951）によってなされ、2倍性および4倍性のストックとウォールフラワーの正逆交雑を行ったところ、ウォールフラワーを母親にした場合にのみ、わずかに採種できたが、その種子を播種、栽培したところ、すべて母親であるウォールフラワーと同じ外見に生長したことを報告し、ウォールフラワーは単為生殖的な偽受精という現象を起こしやすい植物であることを示唆した。その後、濃黄色ストックの作出の試みについての報告は見られない。このため、本研究では、ストックとウォールフラワーの受精の可能性を調べるために、光学顕微鏡および電子顕微鏡による花粉発芽の観察を行うとともに、交配によって得られた植物が雑種かどうかを判断する手段として、パーオキシダーゼアイソザイムの電気泳動法による分析を行い、サイモグラムに、ストックおよびウォールフラワーを識別する特異的なバンドが存在するかどうかを調べた。





第1-1図 ストック (*Matthiola incana*) の花  
左から、白色花 (八重)、クリーム色花 (八重)、紫色花 (八重) および紫色花 (一重)



第1-2図 ウォールフラワー (*Cheiranthus cheiri*) の黄色花 (八重)

## 第1節 ストックとウォールフラワーの人工交配

### 材料および方法

#### 1. ストックとウォールフラワーの正逆交配

第1-1表に示した様に、ストックでは白色系品種として13品種、有色系品種として2品種の計15品種を、また、ウォールフラワーでは2品種を供試し、各品種とも温室内で慣行法により栽培した。交配は、1987年4月20日～6月2日に行った。除雄を開花1～2日前に行い、除雄当日に蓄授粉し、授粉後袋かけし、温室内で採種時まで肥培管理した。

第1-1表 ストックおよびウォールフラワーの供試品種

ストック				
<i>Matthiola incana</i> R. Br.				
峰の雪	安房の雪	銀潮	クリスマスノー-A	松の雪
ホワイトセンセーション	先勝の雪	ホールホワイトNo. 16	ホワイトゴッテス	
クリスマスホワイト	ヒクミーホワイト	クリスマスノー-B	早雪	(以上白色)
月の輝	(クリーム色)			
紫鵬	(紫色)			
ウォールフラワー				
<i>Cheiranthus cheiri</i> L.				
オルタ'フル	(濃黄色)			
<i>Cheiranthus allionii</i> Hort.				
アリオー-オレンジ'	(オレンジ'色)			

#### 2. 交配種子の無菌発芽と生育個体の形質

正逆交配によって得られた72個の交配種子を1%次亜塩素酸ナトリウムで20分間殺菌し、滅菌水で3回洗浄した。1/2濃度のMS無機塩にMSビタミン、100mg/lイノシトール、500mg/lカザミノ酸、および2%サッカロースを添加し、pH5.5に調整した後、0.2%ゲルライトでゲル化させた。培地は50ml容三角フラスコに15mlずつ分注した。殺菌種子を1粒ずつ各フラスコに播種し、無菌発芽させた。培養は、20±1°C、連続照明(3,500 lx 蛍光灯)下で行った。

発芽後約5mm程度に生育した実生(44個体)は、パーミキュライトを培養土とし

鉢に移植し温室内で馴化させた。さらに、本葉が2~3枚展開後、土：テンボロン（有機化学堆肥）=1:1の用土を含む3号ビニール鉢に移植し、温室内で管理し、形質調査を行った。

## 結果

### 1. ストックとウォールフラワーの正逆交配

#### 1) ストック(♀)×'オールダブル'(♂)の交配(第1-2表)

ストック15品種を母親に、ウォールフラワー'オールダブル'を花粉親とした場合、交配花数158中、結莢数87(55%)で、その中で種子を含んだ莢数は11(7%)であった。種子が得られた交配の組み合わせは、'クリスマススノー' A 2粒、'松の雪' 1粒、'ホワイトセンセーション' 1粒、'先勝の雪' 17粒、'ホワイトゴッデス' 2粒、'早雪' 7粒および'紫鵬' 11粒で、計41粒の種子が得られた。

結莢率が80%以上と高い値を示したのは、'クリスマスホワイト'、'早雪'、'先勝の雪'、'クリスマススノー' B、および'月の輝'であった。一方、'ボールホワイトNo.16'および'ピグミーホワイト'では結莢は認められなかった。

#### 2) ストック(♀)×'アリオニーオレンジ'(♂)の交配(第1-2表)

花粉親にウォールフラワーの'アリオニーオレンジ'を用いた場合、交配花数163中、結莢数99(61%)であった。その中で種子を含んだ莢数は9(6%)であった。種子が得られた交配の組み合わせは、'蜂の雪' 5粒、'松の雪' 9粒、'先勝の雪' 3粒、'ホワイトゴッデス' 4粒、'クリスマスホワイト' 1粒、'クリスマススノー' B 1粒、'早雪' 3粒および'紫鵬' 2粒、の計28粒であった。結莢率が80%以上と高い値を示したのは、'クリスマススノー' A、'先勝の雪'、'クリスマスホワイト'、'銀潮'、'月の輝'、'早雪'および'クリスマススノー' Bであった。一方、'ボールホワイトNo.16'および'ピグミーホワイト'では認められなかった。

3) 'オールダブル' (♀) × ストック (♂) の交配 (第1-3表)

ウォールフラワー'オールダブル'を母親に、ストックを花粉親に用いた場合、交配花数128中、結実数124 (97%) であったが、結実英数は1 (0.8%) であった。種子が得られた交配組み合わせは、花粉親が'ホワイトセンセーション'で1粒のみであった。

第1-2表 ストック (♀) × ウォールフラワー (♂) の交配後の結実状況

♀ストック	オールダブル				アリオーレンジ			
	交配花数	結実数 (%)	結実英数	種子数	交配花数	結実数 (%)	結実英数	種子数
峰の雪	5	3 (60)	0	0	8	6 (75)	1	5
安房の雪	5	1 (20)	0	0	5	2 (40)	0	0
銀潮	15	9 (60)	0	0	14	13 (93)	0	0
クリスマスノア	7	3 (43)	1	2	7	7 (100)	0	0
松の雪	10	5 (50)	1	1	12	5 (42)	1	9
ホワイトセンセーション	12	4 (33)	1	1	15	3 (20)	0	0
先勝の雪	20	17 (85)	4	17	22	22 (100)	1	3
ボールホワイトNo. 16	11	0 (0)	0	0	11	0 (0)	0	0
ホワイトゴッデス	17	9 (53)	1	2	16	12 (75)	2	4
クリスマスホワイト	8	8 (100)	0	0	6	6 (100)	1	1
ビッグミーホワイト	6	0 (0)	0	0	6	0 (0)	0	0
クリスマスノア-B	6	5 (83)	0	0	5	4 (80)	1	1
早雪	7	6 (86)	1	7	9	8 (89)	1	3
月の輝	10	8 (80)	0	0	12	11 (92)	0	0
紫鵬	19	9 (47)	2	11	15	10 (67)	1	2
合計	158	87 (55)	11	41	163	99 (61)	9	28

第1-3表 ウォールフラワー (♀) × ストック (♂) の交配後の結実状況

♀ストック	オールダブル				アリオーレンジ			
	交配花数	結実数 (%)	結実英数	種子数	交配花数	結実数 (%)	結実英数	種子数
峰の雪	12	12 (100)	0	0	12	8 (67)	0	0
安房の雪	6	6 (100)	0	0	3	3 (100)	0	0
銀潮	12	11 (92)	0	0	3	3 (100)	0	0
クリスマスノア	4	4 (100)	0	0	2	2 (100)	0	0
松の雪	13	13 (100)	0	0	13	8 (80)	0	0
ホワイトセンセーション	11	11 (100)	1	1	15	13 (87)	1	1
先勝の雪	15	13 (87)	0	0	5	5 (100)	0	0
ボールホワイトNo. 16	13	13 (100)	0	0	1	1 (100)	0	0
ホワイトゴッデス	8	8 (100)	0	0	13	13 (100)	1	1
クリスマスホワイト	12	12 (100)	0	0	4	4 (100)	0	0
紫鵬	7	7 (100)	0	0	10	8 (80)	0	0
ビッグミーホワイト	3	2 (67)	0	0	4	3 (75)	0	0
クリスマスノア-B	3	3 (100)	0	0	9	7 (78)	0	0
早雪	6	6 (100)	0	0	4	3 (75)	0	0
月の輝	3	3 (100)	0	0	0	0 (0)	0	0
合計	128	124 (97)	1	1	98	81 (98)	2	2

#### 4) 'アリオニーオレンジ' (♀) × ストック (♂) の交配 (第1-3表)

ウォールフラワー 'アリオニーオレンジ' を母親に用いた場合、交配花数98中、結莢数81 (81%) であったが、結実莢数はわずか2. (2%) であった。種子の得られた交配組み合わせは、花粉親が 'ホワイトセンセーション' 1粒および 'ホワイトゴッデス' 1粒であった。

### 2. 交配種子の無菌発芽と生育個体の形質

交配によって得られた種子は、ストックを母親にした場合に69粒、ウォールフラワーを母親にした場合に3粒、合計72粒であった。

#### 1) ストック (♀) × 'オールダブル' (♂) の交配種子

得られた種子数は41粒で、そのうち培地上で正常に発芽したもの27粒 (65.9%)、子葉が水浸状になったもの5粒 (12.2%)、種子がカルス化したもの3粒 (7.3%)、発芽しなかったもの6粒 (14.6%) であった。正常に発芽した実生と水浸状化した実生を順化させたが、成功したのは32本中22本 (68.8%) であった。

#### 2) ストック (♀) × 'アリオニーオレンジ' (♂) の交配種子

得られた種子数は28粒であり、そのうち、培地上で正常に発芽したもの22粒 (78.6%)、種子がカルス化したもの2粒 (7.1%)、発芽に至らなかったもの4粒 (14.3%) であった。発芽した実生の順化処理を行い、22本中21本 (95.5%) で順化に成功した。

#### 3) 'オールダブル' (♀) × ストック (♂) の交配種子

得られた種子数は1粒で、培地上で発芽は見られなかった。

#### 4) 'アリオニーオレンジ' (♀) × ストック (♂) の交配種子

得られた種子数は2粒であり、培地上で正常に発芽したもの1粒で、子葉がカルス化したもの1粒であった。正常に発芽した実生は順化に成功した。

すべての組み合わせを集計すると、交配により得られた種子72粒中、発芽した種子は56粒 (正常発芽50粒 (69.4%)、発芽後水浸状化6粒 (8.3%)) で、種子がカルス化したもの7粒 (9.7%)、不発芽のもの9粒 (12.5%) であった。発芽した56粒中、順化に成功したものは44本 (78.6%) で、すべて開花した。開花個体の

中で八重咲個体は31(70.5%)、一重咲個体は13(29.5%)であった。

第1-4表に交配種子から生育した44の植物体の花色および花の形状を示した。ほとんどの個体で草姿および開花の早晩性は、母親の品種と類似し、傾母性の強い個体であった。しかしながら、花色について母親と異なるものが、'早雪'(♀)×'オールダブル'(♂)、'紫鷗'(♀)×'オールダブル'(♂)で各一個体出現した。

第1-4表 ストック×ウォールフラワーにより得られた個体の花の形質

♀ ストック	♂ ウォールフラワー	個体数	花色	八重：一重
クリスマスノー-A	オールダブル	1	白	1:0
松の雪		1	白	0:1
ホワイトセッション		1	白	0:1
先勝の雪		9	白	7:2
ホワイトゴッテス		1	白	1:0
早雪		2	白(クリーム)	0:2
紫鷗		7	紫(白)	5:2
峰の雪	アリオニーオレンジ	5	白	4:1
松の雪		9	白	8:1
先勝の雪		1	白	1:0
ホワイトゴッテス		2	白	1:1
早雪		2	白	1:1
紫鷗		2	紫	2:0
♀ ウォールフラワー	♂ ストック	個体数	花色	八重：一重
アリオニーオレンジ	ホワイトゴッテス	1	オレンジ	0:1

( ) 内は母親と異なる花色をもったもの各1個体

## 第2節 ストックおよびウォールフラワーの柱頭上での花粉発芽

### 材料および方法

#### 1. 押しつぶし法による観察

温室栽培のストック‘ハイランドホワイト’‘雪まつり’‘リトルゼムホワイト’‘早雪’‘ピグミーホワイト’‘紫鵬’および‘銀潮’の6品種、ならびにウォールフラワー‘オールダブル’を用いた。各品種とも自家受精を防ぐため開葯前に除雄した後、ストックおよびウォールフラワーの柱頭上に相互に授粉させた。授粉後24時間で柱頭を採取し、コットンブルー染色溶液に一昼夜浸漬し染色した。染色された柱頭は、スライドグラス上で押しつぶし法によりプレパレートとし、花粉の発芽および伸長程度を光学顕微鏡によって観察した。

#### 2. 走査型電子顕微鏡による観察

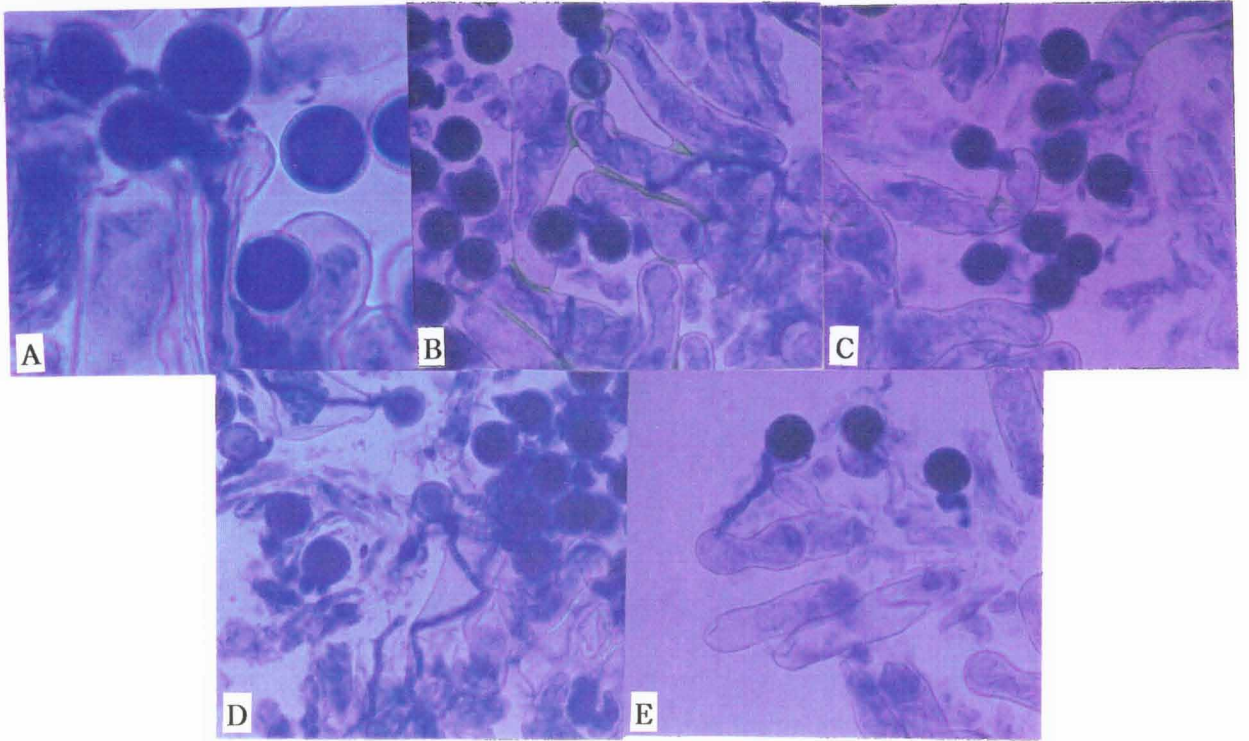
ストック‘ハイランドホワイト’‘雪まつり’および‘リトルゼムホワイト’の3品種、ならびにウォールフラワー‘オールダブル’の1品種を用いた。上記の押しつぶし法の場合と同様、授粉後24時間の柱頭を試料として用いた。柱頭は液体窒素で急速凍結後、凍結乾燥を行った。その凍結乾燥試料をイオンスパッタコーティング装置を用いて金蒸着し、走査型電子顕微鏡（SEM：日立、S-2400）で観察した。観察時の加速電圧は15KVとした。

### 結果

#### 1. 押しつぶし法による観察

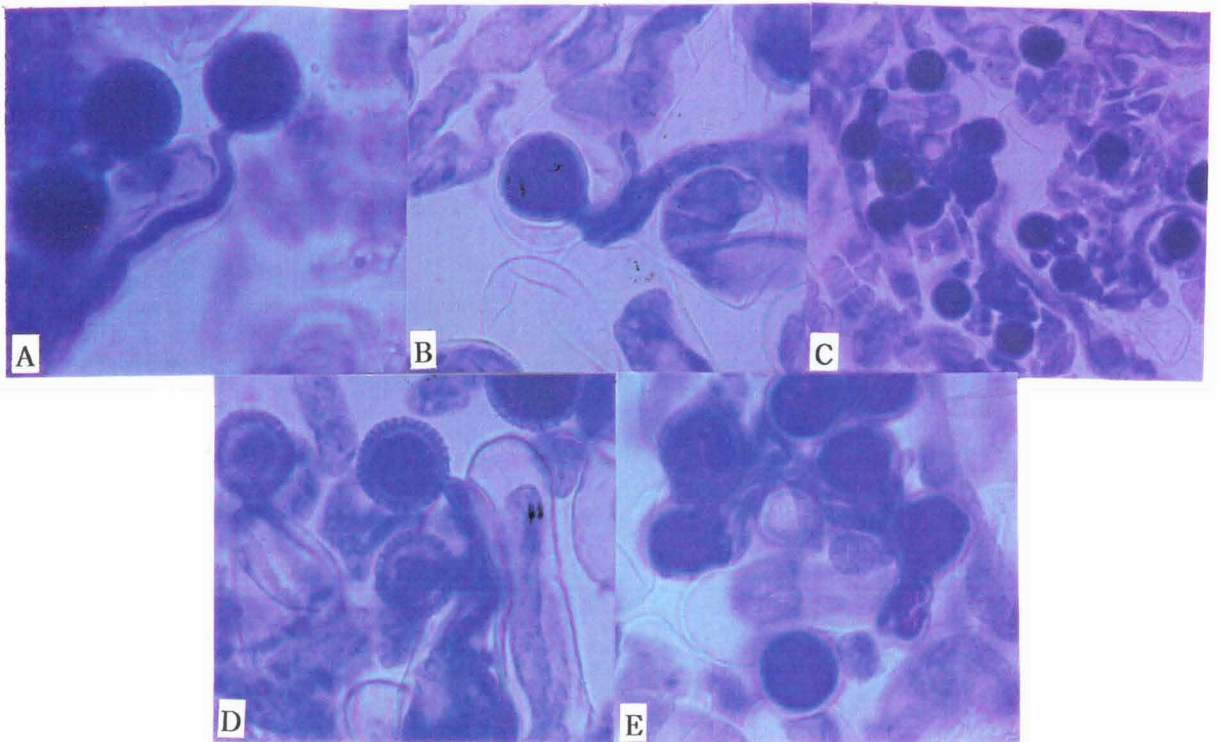
ウォールフラワーの自家受粉花粉およびウォールフラワーの柱頭上のストック花粉の発芽の様子を第1-3図に示した。ウォールフラワーの柱頭上で、ストックの供試した全ての品種で花粉の発芽が観察された。‘雪まつり’‘リトルゼムホワイト’の2品種では、ウォールフラワーの乳頭組織に花粉管が侵入しているのがはっきりと確認できた（第1-3図-B、D）。しかしほとんどの品種は花粉管がわずかに伸長するのみで、コイル状に巻いた異常な花粉管も観察された（第1-3図-C、E）。

一方、第1-4図は、ストックの自家受粉花粉およびストックの柱頭上でのウォ



第1-3図 ウォールフラワー‘オールダブル’の柱頭上のウォールフラワーおよびストックの花粉の状況

A: ‘オールダブル’ (自家受粉)      B、C: ‘雪まつり’  
 D: ‘リトルゼムホワイト’              E: ‘ハイランドホワイト’



第1-4図 ストック柱頭上のウォールフラワー‘オールダブル’およびストックの花粉の状況

A: ‘雪まつり’ (自家受粉)      B、C: ‘雪まつり’の柱頭上  
 D、E: ‘リトルゼムホワイト’の柱頭上



ールフラワーの花粉の状態を示した。ウォールフラワーの花粉発芽は、ストックの全品種において観察された。しかし同一品種でも、花粉が未発芽のもの、伸長が途中で停止するもの、また良く伸長するものなど個体間にも違いがみられた（第1-4図-D、E）。「雪まつり」および「リトルゼムホワイト」の柱頭上においては、ウォールフラワーの花粉管が乳頭状組織に侵入していることが確認された（第1-4図-B、D）。

## 2. 走査型電子顕微鏡による観察

ストック3品種とウォールフラワーとの相互の授粉において、それぞれの品種の柱頭上で花粉発芽が観察された。その中で乳頭状組織への花粉管の侵入が確認されたのは、ウォールフラワーの柱頭上で「リトルゼムホワイト」の花粉（第1-5図）、ストック「ハイランドホワイト」および「雪まつり」の柱頭上でウォールフラワーの花粉であった（第1-6図）。

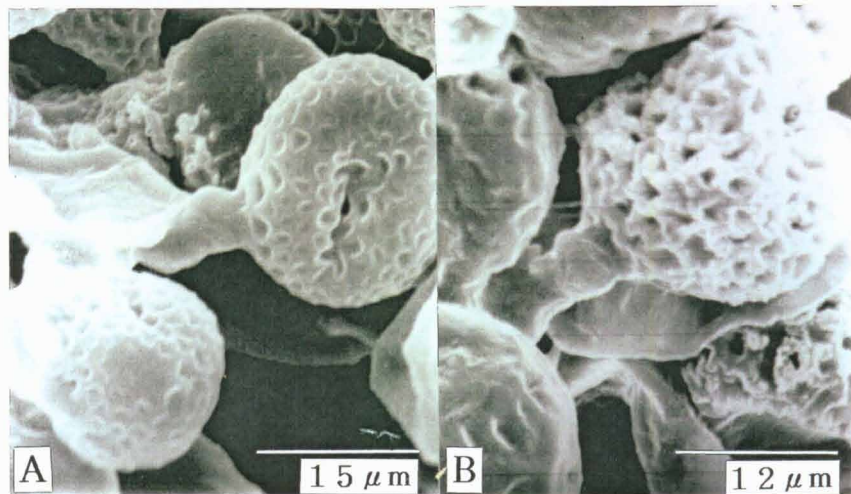
## 第3節 ポリアクリルアミド電気泳動法によるストックおよびウォールフラワーのパーオキシダーゼアイソザイムの比較

### 材料および方法

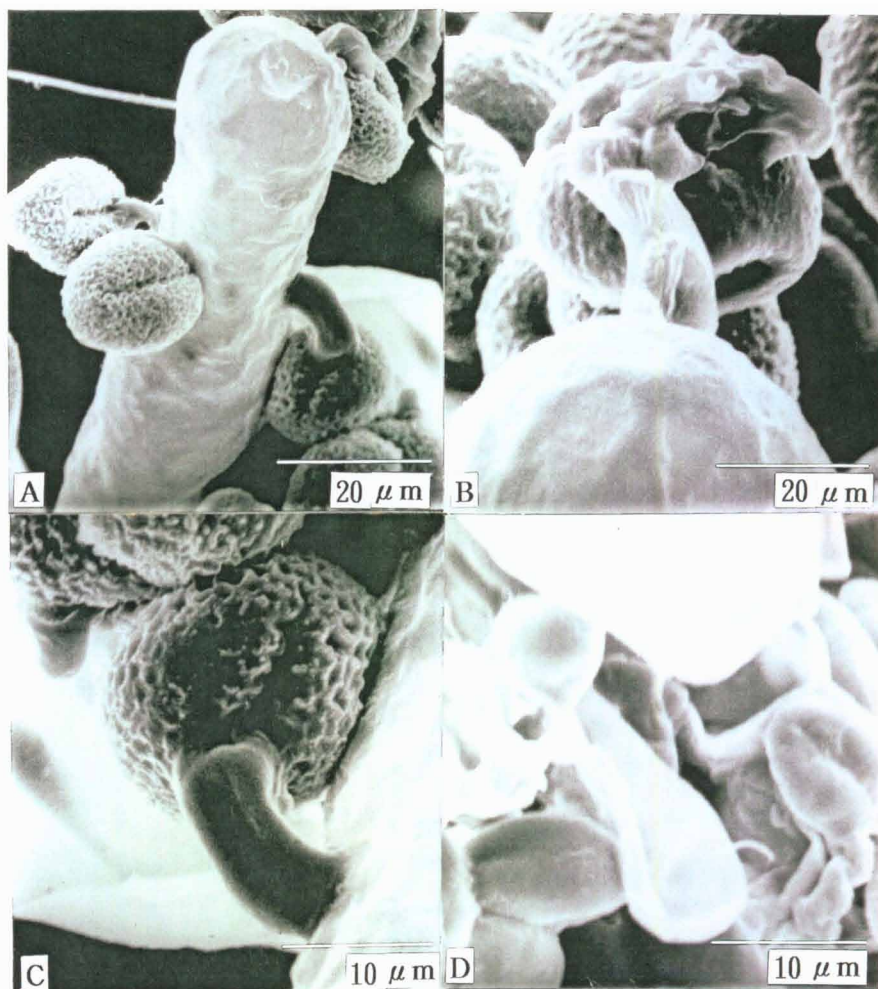
実験操作は第1-7図に示す手順で行った。すなはち、試料（子葉、本葉および実生）を冷却した抽出緩衝液（第1-6表）中で磨砕し、冷却遠心機で10,000rpmで10分間遠心処理し、上澄み液を電気泳動に用いた。ゲルはゲル調製用保存液（第1-5表）を第1-7表の組成で調製し、ポリアクリルアミドゲル・スラブ電気泳動装置（ATTO、AE-6200型）を用いて、泳動を行った。

### 1. 子葉および本葉

子葉はストックは「峰の雪」および「リトルゼムイエロー」の2品種、ウォールフラワーは「オールダブル」1品種を、また本葉は、ストックは「峰の雪」、「リトルゼムイエロー」、「リトルゼムホワイト」、「安房の雪」および「クリスマススノー」Aの4品種、ウォールフラワーは「オールダブル」1品種を用いた。



第1-5図 SEMによるウォールフラワー‘オールダブル’の柱頭上のストックの花粉の状況  
 A：‘リトルゼムホワイト’ B：‘ハイランドホワイト’



第1-6図 SEMによるストックの柱頭上のウォールフラワー‘オールダブル’の花粉の状況  
 A、B、C：‘雪まつり’の柱頭上 D：‘ハイランドホワイト’の柱頭上

### 1. 抽出

材料を生体重の約3倍程度の抽出緩衝液(第1-6表)を含む乳鉢内で冷却磨砕する。

↓  
磨砕した液をエバントルチューブにいれ、0°C、10,000rpmで10分間遠心処理する。

↓  
上澄みを泳動用のサンプルとする。

### 2. ゲル作製(分離ゲルおよび濃縮ゲル)

第1-5表のゲル調製用保存液を作成し、第1-7表に従ってA液、C液及び蒸留水を混ぜる。  
※可溶性タンパクは12.5%、パーオキシダーゼアイソザイムは7.5%

↓  
十分に脱気する。

↓  
第1-7表に従いD液及びTEMEDを混ぜ、素早く攪拌する。

↓  
2枚のガラスのゲル作製板の間に流し込み、2~3cm蒸留水を重層し固める。

↓  
第1-7表の濃縮ゲルの組成に従い、分離ゲル作製の場合と同様にゲルを作成する。

↓  
固まった分離ゲルに重層していた蒸留水を除き、代わりに濃縮ゲルを重層し、コアを差し込み固める。

### 3. 泳動

固まった濃縮ゲルからコアを抜き取る。

↓  
泳動槽に泳動用緩衝液(第1-8表)を入れ、ゲルを含むガラス板を泳動槽に固定する。

↓  
試料をポケットに注入する。

↓  
マーカー色素(BPB 1mg+グリセリン 100μl+蒸留水 900μl)を2、3滴落とす。

↓  
電流を通す。(パーオキシダーゼアイソザイムは5°Cで)

※可溶性タンパク; (1) 定電流30mAで4.5時間

(2) 5mAで15時間または10mAで5時間

パーオキシダーゼアイソザイム; 定電圧300Vで4時間

### 4. 染色

#### ①可溶性タンパク

泳動終了後、ゲルをガラス板から外し染色液(酢酸:メタノール:水=1:3:6+  
クマジーリアントブルー0.25%)を入れ脱色する。

↓  
ゲルが青くなったら、染色液を除いて脱色液(酢酸:メタノール:水=1:3:6)を入れ脱色する

#### ②パーオキシダーゼアイソザイム

泳動終了後、ゲルをガラス板から外し、1液(0-ツアジソン 100mg+氷酢酸 0.84mlを  
再蒸留水70mlにし、さらにpH4.9の0.2M 酢酸緩衝液で100mlにしたもの)に浸漬し、  
暗所、5°Cで20分反応させる。

↓  
1液を取り除き、2液(3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2mlをpH6.5の酢酸緩衝液で100mlにしたもの)を入れ、  
室温でアイソザイムポイントが発色まで反応させる。

第1-7図 可溶性タンパクおよびパーオキシダーゼアイソザイム電気泳動法の操作手順

第1-5表 ゲル調製用保存溶液

溶液	100mℓ 当り	pH
A (30% アクリルアミド 溶液)	アクリルアミド 29.2g Bis 0.8g	
B (1.5M Tris-HCl緩衝液)	Tris 18.17g SDS 0.4g	8.8 (HClで調整)
C (0.5M Tris-HCl緩衝液)	Tris 0.06g SDS 0.4g	6.8 (HClで調整)
D (10% 過硫酸アンモニウム)	過硫酸アンモニウム 0.1gに蒸留水 1mℓを加える。 (必用時調整)	

第1-6表 抽出緩衝液組成

	可溶性タンパク	ハートキナーゼアイソザイム
Tris-HCl緩衝液 (pH6.8)	10mM	10mM
グリセリン	20%	20%
SDS	1%	—
2-メルカプトエタノール	1%	—

第1-7表 ゲル溶液組成 (1mm用プレート)

ゲルの種類・濃度	(mℓ)		
	分離ゲル		濃縮ゲル
	12.5%	7.5%	4.5%
A溶液	10	6	0.9
B溶液	6	6	—
C溶液	—	—	1.5
D溶液	0.095	0.095	0.018
TEMED	0.015	0.015	0.006
蒸留水	8	12	3.6

第1-8表 泳動用緩衝液

	可溶性タンパク	ハートキナーゼアイソザイム
Tris	0.025M	0.005M
グリシン	0.195M	0.0384M
SDS	0.1%	—

各品種の種子を畑土とテンポロンを1:1に混合した培養土にそれぞれ播種し、温室内で発芽させた。子葉は本葉が展開する前に採取し、また、本葉は播種後約1ヶ月の、本葉が6~7枚展開した苗の第1~4葉目の比較的大きな葉を採取した。

## 2. 本葉展開前の実生

ストックは‘早雪’‘改良安房黄金’および‘月の輝’の3品種、ウォールフラワーでは‘オールダブル’および‘アリオニーオレンジ’の2種を、それぞれロックウールに播種し、播種後約10日の本葉展開前の実生を用いた。実生は根を切らないようにロックウールから取り出し、植物体全体を材料とした。

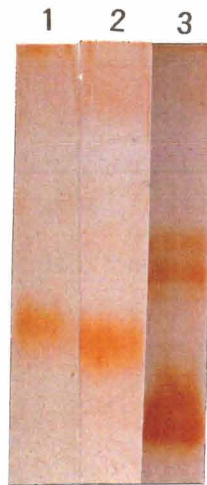
## 結果

### 1. 子葉および本葉

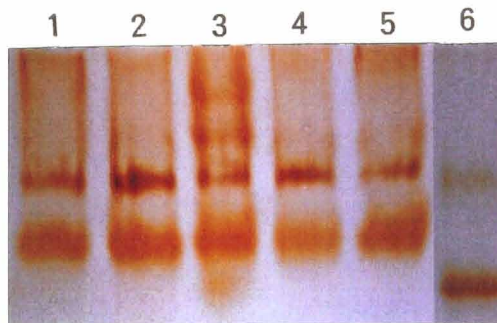
子葉のサイモグラムを第1-8図、本葉を第1-9図に示した。ストックとウォールフラワーのアイソザイムのバンドパターンを比較した場合、子葉、本葉ともストックにおいて品種間で異なるバンドパターンが観察されたが、太く明瞭なバンドが出る位置はストック間で共通して存在し、このバンドはウォールフラワーが示すバンドパターンの位置とは明確に異なっていた。

### 2. 本葉展開前の実生（第1-10図）

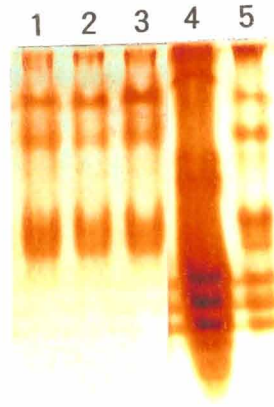
第1-10図に示すように、ストックはゲル上部から中央部にかけてバンドが見られたが、ウォールフラワーはそれよりも下部に多くのバンドが見られた。最も太いバンドがストック3品種間で共通して見られ、またそれより下部にウォールフラワー2品種ではストックに存在しない3本のバンドを共通に持っていた。



第1-8図 ストックおよびウォールフラワーの子葉のパーオキシダーゼ  
アイソザイムのサイモグラム  
1 : ストック ‘峰の雪’ 2 : ストック ‘リトルゼムイエロー’  
3 : ウォールフラワー ‘オールダブル’



第1-9図 ストックおよびウォールフラワーの本葉のパーオキシダーゼ  
アイソザイムのサイモグラム  
1 : ストック ‘峰の雪’ 2 : ストック ‘安房の雪’  
3 : ストック ‘クリスマススノー’ -A 4 : ストック ‘リトルゼムホワイト’  
5 : ストック ‘リトルゼムイエロー’ 6 : ウォールフラワー ‘オールダブル’



第1-10図 ストックおよびウォールフラワーの実生のパーオキシダーゼ  
アイソザイムのサイモグラム  
1 : ストック ‘月の輝’ 2 : ストック ‘改良安房黄金’ 3 : ストック ‘早雪’  
4 : ウォールフラワー ‘オールダブル’ 5 : ウォールフラワー ‘アリオニーオレンジ’

## 考察

ストックとウォールフラワーの属間雑種作出のために、正逆交配を行った結果、ウォールフラワーを母親とした場合に結莢率は高かったが、ストックを母親にした場合の方が、多くの種子が獲得された。ストックとウォールフラワーとの交配の同様な試みは、斎藤（1951）によってなされ、ウォールフラワーを母親にした場合、交配花数460のうち結実莢数18、獲得種子数28粒の結果を得、ストックを母親に用いた場合では全く種子が得られなかった。また結莢率についても、ウォールフラワーを母親にした場合、結莢率は100%であるのに対し、ストックが母親であると13.2%と低い結果を示したことを報告している。この結果は本実験と比較して、獲得種子に関しては全く逆の結果となり、結莢率に関しては、ウォールフラワーを母親とした場合では、ほぼ同じ値であったが、ストックを母親に用いた場合では本実験よりかなり低かった。

ウォールフラワーに多く見られる結実せずに莢だけ生長する現象（単為結果）は、ストックとの交配においてだけではなく、自家受粉においても頻繁に見られた。‘オールダブル’と‘アリオニーオレンジ’をそれぞれ花粉親に用いた場合に、両者の花粉で交配種子が得られたストックは、15品種中‘松の雪’、‘先勝の雪’、‘ホワイトゴッデス’、‘早雪’および‘紫鵬’の5品種、また種子の得られなかったものも5品種あった。一方、ウォールフラワーを母親にした場合では、‘オールダブル’と‘アリオニーオレンジ’の両方で交配種子が得られたのは‘ホワイトセンセーション’を花粉親にした場合のみであった。交配花数が異なるため明確に言えないが、組み合わせによって結実に難易があるように思われた。

結莢や結実に影響する要因として交配親の開花時期のずれがあるが、極早生である‘ピグミーホワイト’と晩生の‘ボールホワイトNo.16’は、ウォールフラワーと開花時期が異なり、充実した花粉を十分確保できなかった。このことが結莢しなかった原因の一つと考えられる。

本実験では交配によって、濃黄色の花色をもった個体は得られず、母親の形質にほぼ類似していた。この結果は、斎藤（1951）の交配結果と同様で、交配により得られた種子は、交雑種子の可能性と共に、単為生殖による可能性が示唆された。この偽受精（pseudogamy）という現象は、比較的遠縁の種間、ある

いは属間で交配が行われた時まれに見られ、アブラナ科の野菜において、しばしばみられる現象である（松尾, 1969）。その機構は授粉により花粉管は胚嚢に達するが精核は卵核と融合せず、卵核に刺激のみを与えることで卵核が分裂を開始し、染色体の倍化が起こり、2倍体の胚が形成されるものと考えられている。この場合、植物体は傾母植物となり、半数体の卵が倍化して生じた2倍体であるので、完全なホモ個体となり、その翌代に固定系統をつくることができるという利点を有している。

前述したように、本実験で得られた交配種子からの個体は母親と類似した花色や形態を持っていることから、これらの個体が偽受精によるものかどうか、後代検定していないため判断できないが、ストックとウォールフラワーの交雑による雑種（黄色花）の作出は極めて困難と考えられる。しかし、この二つの組み合わせで母親の花色と異なったものが各2株出現しており、ウォールフラワーとの交雑の可能性がないと言い切ることはできない。

本実験では、属の異なるかなり遠縁の組合せにおいて交配を行ったが、遠縁植物間では、①柱頭上での花粉発芽、花粉管の柱頭への侵入、花柱内での伸長が抑制され、受精できない（交雑不和合性）。②受精後、交雑胚珠の組織の異常発育・崩壊、胚乳組織の崩壊等が起こり、雑種胚が枯死する（胚珠の退化）。③両親種がそれぞれ個別に持つ補足致死遺伝子によると考えられる雑種胚または雑種幼植物の遺伝的枯死（雑種致死）（中島, 1988）といったような性的隔離機構が働き、雑種植物が得られない場合が多い。

ストックとウォールフラワー間の受精の可能性を探るために、光学顕微鏡（押しつぶし法）および走査型電子顕微鏡による柱頭上の花粉の発芽観察を行った。正逆交配を行い、それぞれの柱頭上の花粉を観察したところ、いずれの組み合わせにおいても、わずかであるがそれぞれの花粉は明らかに発芽しており、品種によっては乳頭状組織に花粉管が侵入しているものも認められた。このことから、ストックとウォールフラワーの不和合の主原因が、花粉が柱頭上で全く発芽しないか、あるいは発芽しても花粉管が柱頭組織内に侵入しないためである可能性は低いと考えられる。しかしながら、侵入するが伸長が不良である、生理的な抑制物質の存在または花粉管の伸長を刺激する物質が不足しているなどという可能性が残されている。



ストックの花の形態に關与する遺伝子には、一重の優性遺伝子Sと八重の劣性遺伝子s、花粉の致死劣性遺伝子lとその優性対立遺伝子Lが存在すると推定されている。一重咲株の体細胞の核内染色体では、S-l遺伝子とs-L遺伝子が連鎖おり、そのため卵細胞はSlとsLの2種類を生じるが、花粉においてはSl型のもものはl遺伝子の致死作用が生ずるため、sL型だけが生き残ることになると考えられている（斉藤, 1969）。従って、一重咲花が生産する花粉にある程度の致死が見られることは、Snow (1925) とWadding (1929) が人工培養基上での花粉の発芽試験から、正常な分離を示す原種の系統と比較して1/2程度に発芽率が低くなることを明らかにした。これは、Sl型の花粉が発芽しなかったためと考えられている。しかし、本実験でストックの花粉を酢酸カーミンなどで染色し、細胞質の充実度を見た場合、すべて染色され、不稔花粉や奇形を呈するものもほとんど観察されなかった。同様に、獲得種子数の少ないウォールフラワー‘オールダブル’の花粉もストック同様よく染色された。

ストックとウォールフラワーとの交雑不和合性は、ウォールフラワーは自家受粉により結莢するが、種子は取れにくいという現象があることから、雌性配偶体の不稔性に問題がある可能性も考えられる。また、花粉は発芽するが正常に伸長し、胚のう内へ侵入できる花粉が少ないこと、卵に到達以前になんらかの原因によって伸長が停止してしまうこと、また母本組織と雑種胚の間の生理的アンバランスによる雑種胚の退化などの、遠縁である属間でのゲノム間のアンバランスが交雑種子の得られない大きな原因と考えられる。

電気泳動法は、個体間あるいは品種間を類縁関係を追求していく上で広く用いられている有効な方法である（岩崎, 1984; Iwaiら, 1981; Pirrie・Power, 1986; Power, 1976）ことから、ストックとウォールフラワーの交雑種子の雑種性の判定において、パーオキシダーゼアイソザイムを用いた電気泳動を行った。その結果、両親を識別できる特異的なバンドの存在することが確かめられた。今後、雑種が作出された場合には、この方法をその確認に応用できるものと期待される。

## 摘要

濃黄色ストックの作出を目的として、ストックとウォールフラワーとの属間交雑を試みた。また、両種の受粉後の花粉の柱頭上での細胞組織的観察および雑種検定法のためのアイソザイムの電気泳動法の利用について検討した。

### 第1節 ストックとウォールフラワーの人工交配

1. ストック（15品種）とウォールフラワー（2種）の正逆交配を行った。ストックを母親にした場合に69粒、ウォールフラワーを母親にした場合に3粒、合計72粒の種子が得られた。

2. 交配によって得られた種子を、*in vitro*で無菌播種後、順化させ、44個体が生長、開花まで至った。それらの形質はほとんどの個体が母親と類似したもので、傾母性の強い個体であった。

3. 花色において母親と異なるものが2個体出現したが、期待される濃黄色を持った個体は作出されなかった。

### 第2節 ストックおよびウォールフラワーの柱頭上での花粉発芽

ストックとウォールフラワー相互の受粉後の、花粉の発芽や花粉管の伸長状況をみるため、ストック数品種とウォールフラワー1品種を供試し、受粉後の柱頭部を光学および走査型電子顕微鏡で観察した。すべての組み合わせにおいて、それぞれの柱頭上で花粉管の伸長が観察され、明らかに柱頭の乳頭組織に侵入しているものが認められた。

### 第3節 ポリアクリルアミド電気泳動法によるストックおよびウォールフラワーのパーオキシダーゼアイソザイムの比較

ストックとウォールフラワーの交配によって植物体が作出された場合雑種検定の方法を確立する目的でパーオキシダーゼアイソザイムの電気泳動を行った。ストックとウォールフラワーでは、子葉、本葉いずれにおいても、パーオキシダーゼアイソザイムのバンドパターンが明らかに異なることが認められ、雑種識別に電気泳動が利用できる可能性が示唆された。

緒言

第1章では濃黄色花のウォールフラワーの黄色系色素遺伝子を導入し濃黄色花のストックを作出することを目的に、ストックとウォールフラワーの人工交配による属間雑種作出を試みた。しかしながら、従来の交雑育種技術による方法では目的とする濃黄色の属間雑種を作出することは困難であった。その原因として、①交雑不和合性による花粉管の柱頭上での発芽不良および花柱内への伸長抑制、②ゲノム不親和による受精不良または受精胚の発育不良が考えられた。そこでこのような障害を克服する手段として、近年多くの植物においてプロトプラストを用いた細胞融合法による体細胞属間雑種作出の試みが行われている。

プロトプラストとは植物細胞に固有の細胞壁を酵素処理などにより取り除いた裸の細胞で、異種の細胞間の融合や外来遺伝子の導入などの細胞育種技術の展開にとって欠かせない材料として用いられてきている。1960年代に入り細胞壁を消化させて、酵素的にプロトプラストを単離することが容易に可能となり (Cocking, 1960)、さまざまな植物においてプロトプラストからの植物体の再生が実証されている (Nagata・Takebe, 1971)。ストック、ウォールフラワーを含むアブラナ科でも *Brassica campestris* や *B. oleracea* などの数種の系統で葉や根組織由来プロトプラストからの植物体再生 (Kohlenbachら, 1982; Iversenら, 1983; 山岸ら, 1986; Robertson・Earle, 1986; Nishioら, 1987; Hegazi・Matsubara, 1992) に成功している。またストックにおいても Hosoki・Ando (1989) によって、子葉カルス由来のプロトプラストからの植物体再生が報告されてるが、安定した技術として確立していない。

細胞融合は自然状態では交雑不能な遺伝的に遠縁の植物体の組み合わせにおいても可能であり (Melchersら, 1987)、種間雑種、属間雑種作出の技術として期待されている。細胞融合の方法としてはポリエチレングリコール (PEG) 法、高 pH-高 Ca 法、ポリビニールアルコール法などの化学的方法が従来行われ、トマトとジャガイモの属間雑種 (ポマト) や *Nicotiana* 属の種間雑種作出等の成果を挙げている (Manczelら, 1981)。これらの方法は、高濃度の PEG などの試薬によるプロトプラストの強力な接着と、それらの試薬の除去過程でのプロトプラ

ストの融合の2段階からなっている。この方法の長所としては高価な機器を必要とせず融合処理が可能であることであるが、一方植物種により用いる試薬が融合後の細胞に毒性を示すことがあるため、①融合した細胞の培養が困難である、②大量の材料を扱えない、③融合処理技術に熟練を要することなどの欠点がある。一方、Zimmermann (1981) は、PEG法などの化学的方法に代わって物理的な方法で細胞融合を誘導できることを示した。この方法は、プロトプラストの懸濁液に高周波 (0.5~2MHz) の電圧 (100~300V/cm) をかけてプロトプラスト同士の接着を誘導し、その後、短時間 ( $\mu$ s単位) の高電圧パルス (1~3KV/cm) を与えることにより一時的なプロトプラスト細胞膜の破壊→修復を起こさせ、その過程で融合を誘導させるものである。この方法は、融合に用いる2植物種の細胞膜の高周波・高電界強度に対する耐性が極端に異なる場合、一方のプロトプラストが破壊される危険がある、また融合装置が高価であるなどの問題もあるが、融合に試薬を用いないため融合したプロトプラストに対する毒性の心配がないこと、融合処理が容易で大量の試料を扱えることなどの長所がある。電気融合法を用い、プロトプラストの融合によって体細胞雑種を作出した例は、*B. oleracea*と*B. campestris*との組み合わせなど、アブラナ科においても幾つか報告されている (Glimelius, 1986; Sundberg・Glimelius, 1986; 西尾ら, 1987)。

細胞融合による体細胞雑種作出過程には、親植物のプロトプラストの単離→融合処理→融合したプロトプラストの培養→プロトプラストの細胞壁再生、分裂→コロニー形成→カルス形成→植物体再生→雑種の確認といった一連のプロセスがある。従って、体細胞雑種を作出するためには、プロトプラスト培養から植物体再生までの培養系の技術を確立しておくことが必須要件となる。

本研究では細胞融合による体細胞雑種作出の基礎となるストックおよびウォールフラワーのプロトプラスト培養系を確立するために、子葉およびカルスからのプロトプラストの単離から植物体再生までの培養系の最適条件について検討するとともに、電気的細胞融合法によるストックとウォールフラワーのプロトプラスト融合の最適条件について検討し、体細胞雑種の作出を試みた。

## 第1節 プロトプラスト培養

### 1. ストックのプロトプラスト培養

#### 1) 子葉からのプロトプラスト培養

##### 材料および方法

ストック種子を1%次亜塩素酸ナトリウムで20分間表面殺菌後、滅菌水で3回洗浄した。この種子を、1/2濃度のMurashige・Skoog (MS) 基本培地に2%サッカロース、100mg/ℓ イノシトールおよび500mg/ℓ カザミノ酸を添加し、pHを5.5に調整し、2g/ℓ のゲルライトでゲル化した培地を含む規格瓶 (∅5cm×11cm) に、15~20粒播種した。播種後10~20日目の完全に展開した子葉を供試材料に用いた。プロトプラスト単離前に温度処理を行う場合は、子葉の部分だけを切り放して滅菌水に浸漬し、5℃または25℃で24時間、暗所で保存した。プロトプラストの単離および精製は以下のように行った。

①子葉を1mmの短冊状に細切し、0.6Mのマンニトール溶液に、0.1%セルラーゼオノヅカRS (Yakult)、0.1%マセロザイムR10 (Yakult)、0.01%ペクトリアーゼY23 (Seishin pharmaceutical) および0.5%デキストラン硫酸カリウムをとかした酵素液に浸漬し、24℃暗所で16~17時間静置して単離処理した (一部変更する場合あり)。②単離されたプロトプラストを含む酵素液を、40μmのナイロンメッシュで濾過後、50%+20%のパーコール溶液層上に重層し、100gで6分間遠心処理し、50%および20%のパーコール溶液層の間にできたプロトプラストの層を取り出した。③これを11%マンニトールを含む1/2MS培地に懸濁し、さらに100gで2分間遠心処理し洗浄した。プロトプラスト培養用培地としては、1/2MS培地に4%サッカロース、100mg/ℓ イノシトール、500mg/ℓ カザミノ酸、0.6Mマンニトール、1.0mg/ℓ 6-benzyladenine (BA, Kohjin) および1.0mg/ℓ α-naphthaleneacetic acid (NAA, Nacalai tesque) を添加したもの (以後PM培地という) を用いた。ただし、実験目的に応じて一部の培地成分を適宜変更した。培養は、3cmのプラスチックシャーレを用い、培養密度を $5 \times 10^4$ 個/ℓとして、24℃、暗所または蛍光灯下3,000 lx、16時間照明で行った。培養1週間目に、プロトプラストの分裂率を以下の方法で調査した。すなわち各処理につき2シャーレを用い、シャーレ当り250個以上のプロトプラストについて分裂調査

を行った。分裂率は、分裂しているプロトプラスト/全プロトプラスト×100で表した。

実験は以下の項目について行った。

#### (1) サッカロース濃度の影響

‘リトルゼムイエロー’の播種後20日目の子葉から単離したプロトプラストを用いた。培地はPM培地から $\text{NH}_4\text{NO}_3$ を除いた培地に、サッカロース濃度を0、1、2および4%添加し、暗所で培養した。

#### (2) 前処理、培地中の $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 濃度および培養温度の影響

‘リトルゼムイエロー’の播種後17日目の子葉を用い、5°C暗所で16時間、前処理を行った子葉と、前処理を行わない採取直後の子葉からプロトプラストをそれぞれ単離した。供試培地は、PM培地の $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 濃度を、0および1/2倍濃度(413mg/l)に改変し、培養は24および30°Cの暗所で行った。

#### (3) 前処理温度およびマンニトール濃度の影響

‘リトルゼムイエロー’の播種後17日目の子葉を用い、5°Cおよび25°C暗所で前処理を行った後、それぞれの子葉からプロトプラストを単離した。培地としてはPM培地から $\text{NH}_4\text{NO}_3$ を除き、マンニトール0.6および0.8Mを添加したものを用い、暗所で培養した。

#### (4) 前処理、グルタミン添加および光の影響

‘雪まつり’の播種後20日目の子葉を、5°C暗所で前処理を行ったものおよび採取直後のものからプロトプラストを単離し次の培地上で培養した。培地は実験(3)で用いた $\text{NH}_4\text{NO}_3$ を除いたPM培地と、同培地からさらに $\text{KNO}_3$ を除き、Kイオンを補うため9.4mM KClを加えた後、10および30mMのグルタミンを添加した培地の計3処理区を設けた。培養は暗所または蛍光灯下3,000 lxで行った。

#### (5) 植物生長調節物質の影響

‘雪まつり’の播種後10日目の子葉を、5°C暗所で前処理を行った後、プロトプラストを単離した。培地は、実験(4)で用いたグルタミン(10mM)添加培地を用い、0、0.5、1.0mg/l NAA、および0.5mg/l NAA+0.5mg/l 2,4-Dの4処理と、1.0、5.0mg/l BAおよび0.5mg/l ゼアチンの3処理とをそれぞれ組み合わせた12処理区とし、暗所で培養した。

#### (6) 無菌播種時の培養器栓の影響

‘ハイランドホワイト’の播種後7日目の子葉を用いた。無菌播種に用いた培養器（規格瓶）の栓として、通気性の高いフィルムのミリラップ、およびアルミフォイルの2種類を用いた。子葉は5℃暗所で前処理を行った後、プロトプラストを単離した。酵素液は、0.75%セルラーゼオノツカRS+0.05%マセロザイムR10とし、そのほかの条件は同様とし、また培養はPM培地およびPM培地の無機塩類を2倍濃度含んだ培地（2PM）の2種類を用いた。

#### (7) 前処理による細胞膜タンパクの変化

温室で栽培中の‘雪まつり’および‘先勝の雪’の展開葉を用い、5℃暗所で16時間、前処理を施した本葉および処理しない本葉から第2-1図に従って、それぞれ細胞膜小胞の精製と細胞膜タンパクの抽出を行った。その後、第1-7図に従いSDSポリアクリルアミド電気泳動法に供し、入江（1980）の方法に従い、銀染色試薬（2D-銀染色試薬・II「第一」, 第一化学薬品）を用い、染色を行った。

### 結果

#### (1) サッカロース濃度の影響（第2-2、2-3図-A, B）

分裂率の最も高かったのは、4%サッカロース区で25.1%を示し、サッカロース濃度が低下するに従い分裂率が下がった。また、凝集するものが多く見られた。なお、第2-3図-A, Bは子葉プロトプラストとその第一分裂の一例を示した。

#### (2) 前処理、培地中 $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 濃度および培養温度の影響（第2-4図）

培地中の $\text{NH}_4\text{NO}_3$ の影響については、1/2濃度区で分裂率は高く、無添加区では劣った。前処理については、 $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 無添加、30℃培養区で、前処理を行わなかった区は分裂しなかったのに対し、前処理区では10.3%の分裂率を示し、他の区との比較においても、前処理を行うことにより分裂率は2倍以上に高まった。培養温度については、30℃より24℃の方が分裂率は高く、分裂率の最も高かったのは、前処理を行い、1/2濃度の $\text{NH}_4\text{NO}_3$ を含む培地中において、24℃で培養を行った場合で17.6%であった。

#### (3) 前処理温度およびマンニトール濃度の影響（第2-5図）

マンニトール0.6Mが0.8Mより、また前処理温度5℃が25℃より、約2倍ほど分裂率が高かった。分裂率の最も高かったのは、5℃前処理、0.6Mマンニトール培

採取した本葉の新鮮重に対して、2倍量の摩砕用緩衝液 (0.25M サッカロース、25mM N-2-hydroxyethylpiperadine N'-2-ethanesulfonic acid (Hepes)-Tris、5mM EDTA、2mM dithiothreitol (DTT)、0.2% 牛血清アルブミン、pH 7.6) を加え、ブレンダーで5分間破碎する。

↓

4層のガーゼでろ過する。

↓

ろ液を12,000 gで15分間、2回遠心処理する。

↓

得られた上澄み液を22,000 gで60分間遠心処理し、沈澱を得る。

↓

沈澱をテフロンホモジナイザーを用い、懸濁用緩衝液 (0.25M サッカロース、10mM K<sup>+</sup>-phosphate、1mM DTT、pH 7.8) で5mℓとなるように懸濁する。

↓

これを水性二層分配系 (5.6% dextran T 500、5.6% polyethylenglycol 3350、0.25M サッカロース、10mM K<sup>+</sup>-phosphate、40mM NaCl、pH 7.8、25g) に加え、よく混合する。

↓

2,000 gで10分間遠心分離し、層分離を行う。

↓

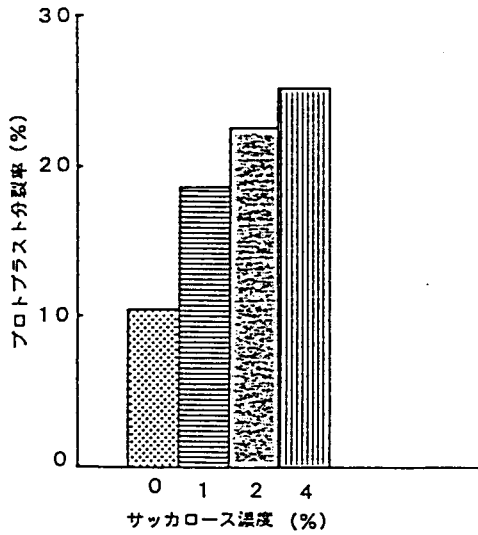
得られた上層は、0.25mM サッカロース、1mM DTTで希釈し、22,000 gで60分間遠心処理を行う。

↓

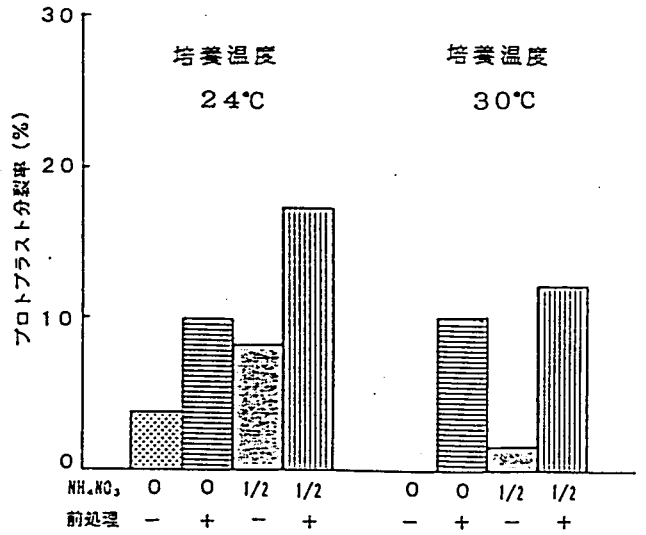
得られた沈澱を再懸濁用緩衝液 (20% グリセロール、5mM Hepes-Tris、1mM EDTA、1mM DDT、pH 7.6) に、タンパク質濃度が約10mg/mℓとなるように懸濁し、この画分を細胞膜タンパクとする。

#### 第2-1図 細胞膜小胞の精製および細胞膜タンパクの抽出手順

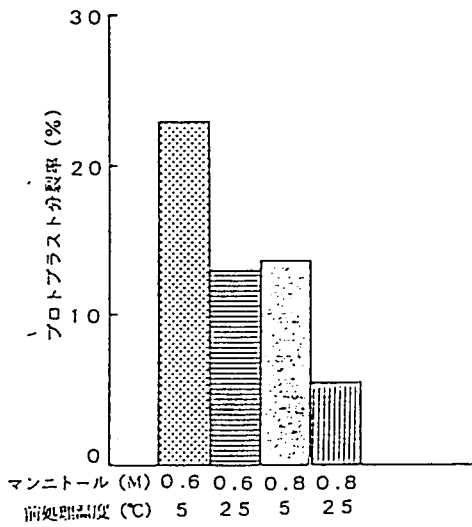




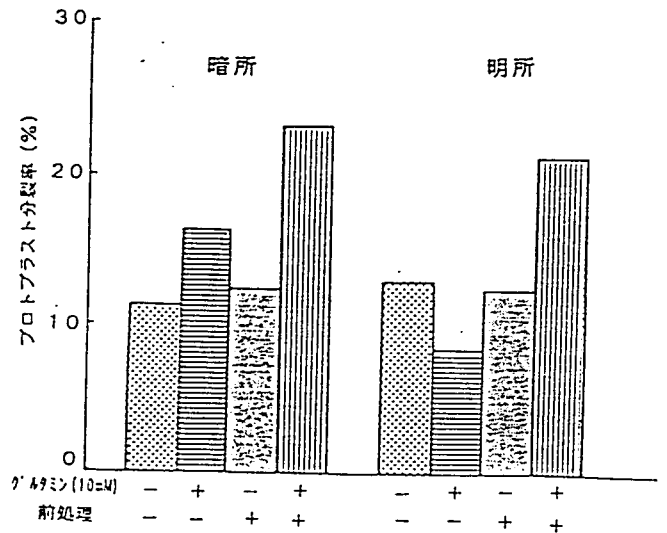
第2-2図 ストックの子葉プロトプラストの分裂に及ぼすサッカロースの影響 (培養1週間)



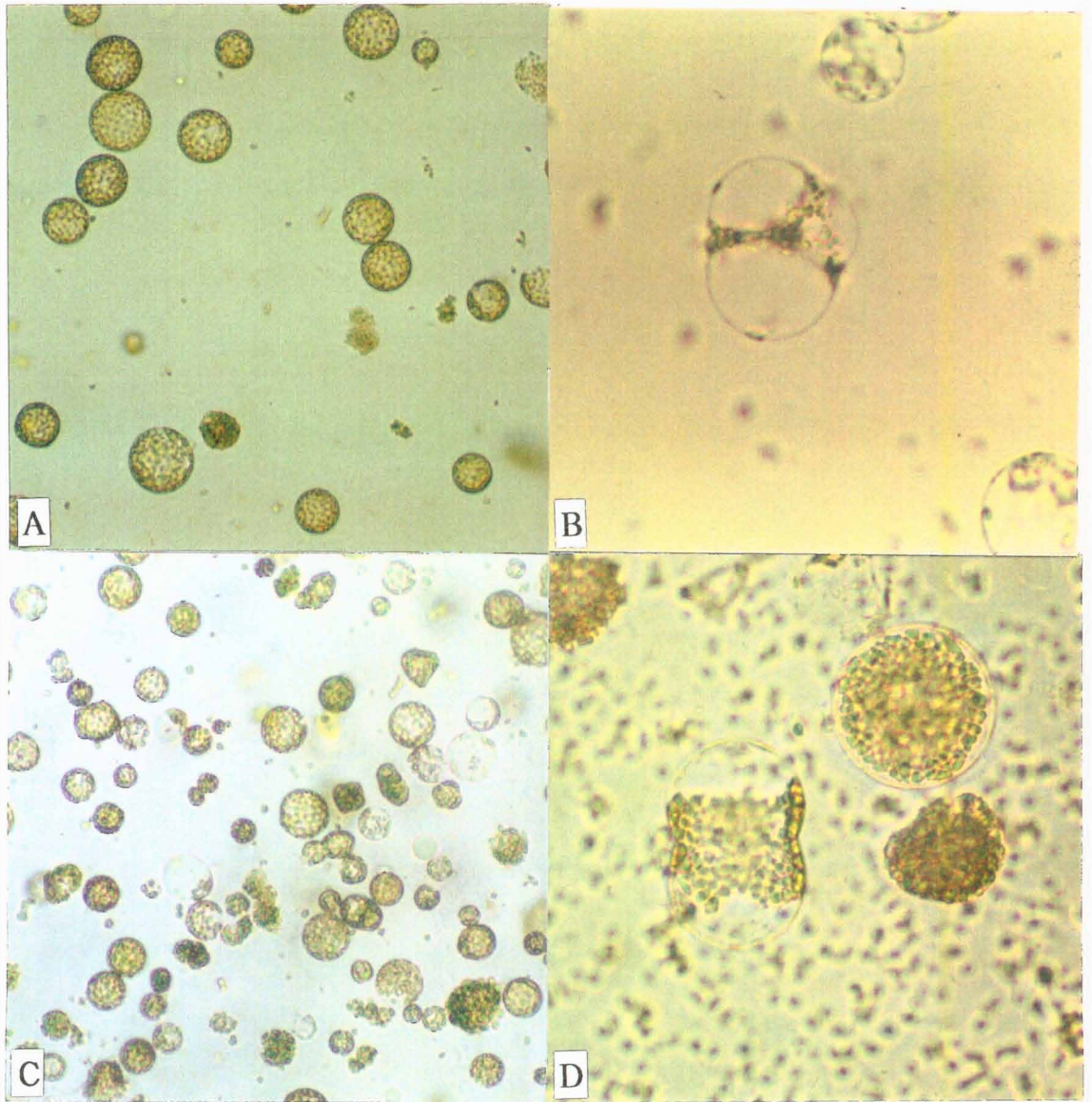
第2-4図 ストックの子葉プロトプラストの分裂に及ぼす前処理、NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>濃度および培養温度の影響 (培養1週間)



第2-5図 ストックの子葉プロトプラストの分裂に及ぼす前処理、マンニトール濃度の影響 (培養1週間)



第2-6図 ストックの子葉プロトプラストの分裂に及ぼす前処理、グルタミン添加および光の影響 (培養1週間)



第2-3図 ストックおよびウォールフラワーの子葉プロトプラスト (A、C) と  
その第一分裂の状況 (B、D)

A、B : ストック

C、D : ウォールフラワー

地で培養した場合で23.0%であった。

(4) 前処理、グルタミン添加および光の影響 (第2-6図)

グルタミン30mM添加した培地のプロトプラストは、培養1週間までにすべて死滅してしまった。前処理の効果は10mMグルタミン添加培地で認められ、暗所および明所区とも20%以上の分裂率を示した。光の影響については暗所と明所の間で明確な差は認められなかった。最も分裂率の高かったのは、5°Cで前処理、10mMグルタミン添加培地で暗所培養した区で、23.3%であった。

(5) 植物生長調節物質の影響 (第2-1表)

BA添加区についてみると、いずれのNAA濃度区においても、BA1.0 mg/ℓ添加区で分裂率が高かった。またゼアチン0.5mg/ℓ添加区は、いずれのNAA濃度区においても、ほぼ同じ分裂率を示した。最も分裂率の高かった区はBA1.0mg/ℓ + NAA0.5mg/ℓ 区で、29.7%であった。

第2-1表 ストックの子葉プロトプラストの分裂に及ぼすBA、ゼアチンおよびNAAの影響 (培養1週間)

(mg/ℓ)		N A A		
		0	0.5	1.0
BA	1.0	18.3 <sup>z</sup>	29.7	20.4
BA	5.0	12.3	17.3	19.8
ゼアチン	0.5	23.3	23.3	22.5

z : 分裂率 (%) : 分裂したプロトプラスト / 全プロトプラスト × 100

## (6) 無菌播種時の培養器栓の影響 (第2-7図)

培養器内のの実生の生育状態はアルミfoil区より、ミリラップ区の方が胚軸が長く、子葉も大きく、全体的に生長が良かった。しかし、プロトプラストの分裂率は、アルミfoil栓を用いた子葉からのプロトプラストの方が高かった。またミリラップをした培養器栓の子葉からのプロトプラストを2PM培地で培養した場合には、分裂が認められなかった。

## (7) 前処理による細胞膜タンパクの変化 (第2-8図)

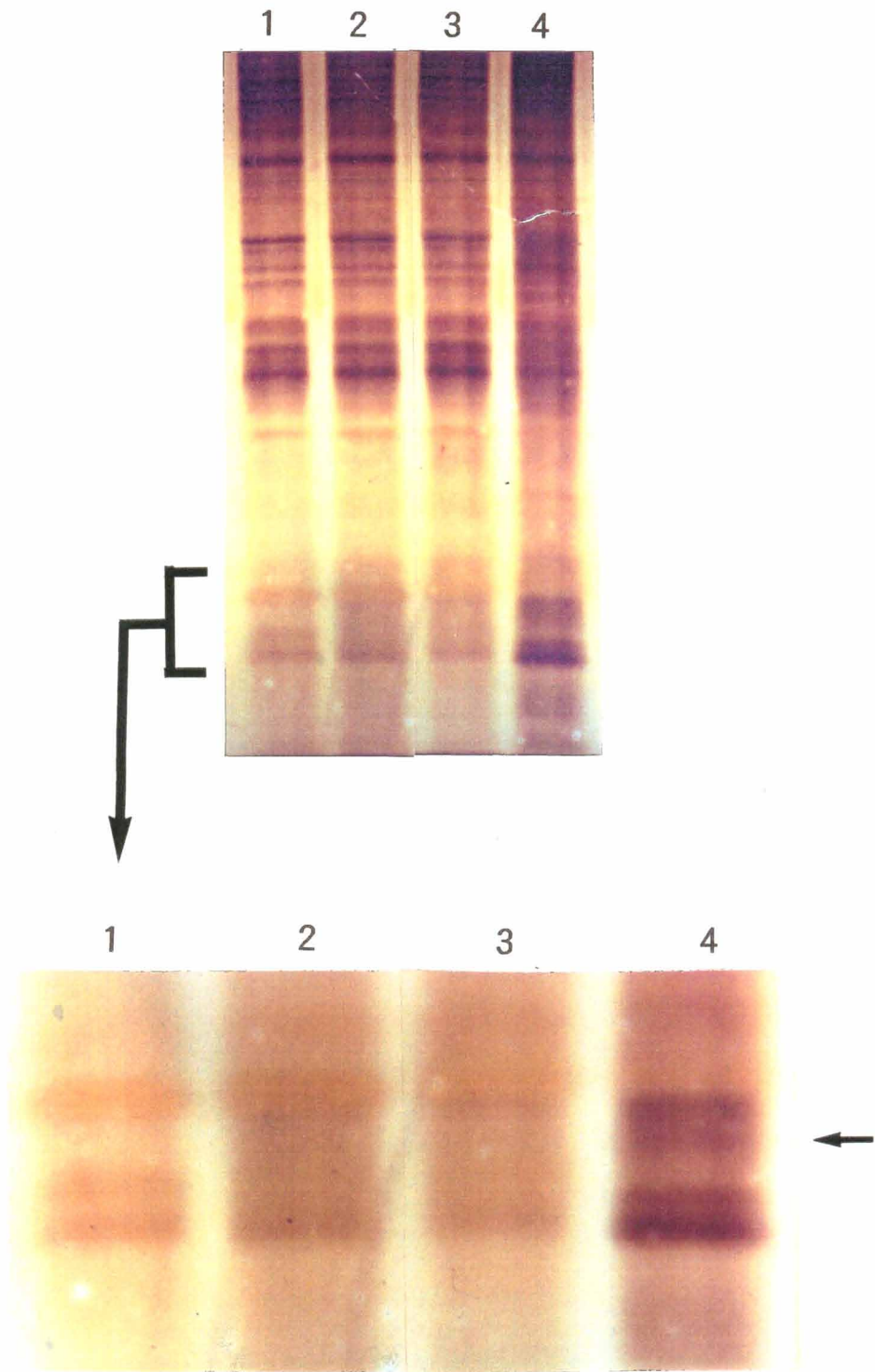
細胞膜タンパクのサイモグラムにおいて、供試した2品種ともに、前処理を施したものに共通して、濃く染色されるバンドや特異的なバンドが観察され、前処理の有無により、サイモグラムが異なることが認められた。

## 2) カルスからのプロトプラスト培養

### (1) 下胚軸および子葉由来カルスからのプロトプラスト培養

#### 材料および方法

種子の殺菌および播種は、子葉プロトプラストの培養時と同様の方法で行った。播種後7~14日目の実生の下胚軸は5mmに、子葉は2~3等分し、1/2MSに2% サッカロース、100mg/ℓ イノシトール、500mg/ℓ カザミノ酸および1mg/ℓ NAAまたは1mg/ℓ NAA+0.1mg/ℓ BAを添加し、pHを5.5に調整後、2g/ℓ ゲルライトで固化したカルス継代用培地 (以後、CM培地という) に、2~3片ずつ置床しカルスを誘導した。培養は24°C、暗所、または24°C、蛍光灯3,000 lx、16時間照明下で行った。培養約1ヶ月後、誘導されたカルスを2mm大に細切し、カルス誘導時と同組成の培地に移植した。その後、2週間ごとに同様の継代操作を行い、カルスを維持、増殖した。プロトプラストの単離は、MS培地に1.5%メイセラーゼ (Meiji seika)、0.05%マセロザイムR10、0.5Mマンニトール、1%サッカロース、0.5%デキストラン硫酸カリウムを溶かしpHを5.5に調整した酵素液を用い、24°C暗所、40rpmで6時間振とう処理した。単離したプロトプラストを含む酵素液を、80μmのナイロンメッシュで濾過した後、100gで3分間遠心処理した。その後プロトプラストを0.6Mマンニトールを含むMS培地に懸濁し、100gで3分間遠心処理を2回行い、精製した。プロトプラストの培養は、MS培地に0.44Mマンニトール、2%サッカロースを加え、pHを5.5に調整したカルスプロトプラスト培養



第2-8図 前処理の有無による本葉の細胞膜タンパクのサイモグラム  
 1 : ‘雪まつり’ 無処理            2 : ‘雪まつり’ 前処理  
 3 : ‘先勝の雪’ 無処理            4 : ‘先勝の雪’ 前処理  
 ← 前処理によって特異的に現れたバンド

培地（以後、CPM培地という）を添加した直径3cmのプラスチックシャーレ中で、培養密度 $5 \times 10^4$ 個/㎖、24°C、暗所条件下で行った。1処理区につきシャーレ2個用いた。なお、酵素液および培地組成は適宜変更した。分裂率の調査は培養1週間後、コロニー形成数の調査は、培養約1ヶ月後、各シャーレごとに10細胞以上増殖している細胞塊を数えた。

#### (i) プロトプラストの単離条件の検討

1mg/ℓ NAA+0.1mg/ℓ BA添加のCM培地で継代した‘ホワイトワンダー’の下胚軸由来カルスの移植後9日目のものを用いた。酵素液として、9%マンニトール、1%サッカロース、0.5%デキストラン硫酸カリウム（②～④区に添加）を含むMS培地に、ペクチナーゼとして0.05%マセロザイムR10を加え、①1.5%メイセラゼ（デキストラン硫酸カリウム無添加）、②1.5%メイセラゼ③1.0%セルラーゼオノツカR10、④0.5%セルラーゼオノツカRS添加の計4処理区を用いた。各酵素液にカルスを細切し懸濁させ、単離処理した。プロトプラストの収量は、カルスの生体重1g当りで計算した。

#### (ii) プロトプラストの分裂条件の検討

##### ①カルス継代培地およびプロトプラスト培養培地形態の影響

1mg/ℓ NAA+0.1mg/ℓ BAおよび1mg/ℓ NAAを添加したCM培地で継代した‘先勝の雪’の下胚軸由来カルス（移植後11日目）を用いた。プロトプラスト培養培地としては、CPM培地に1mg/ℓ NAA+1mg/ℓ BAを添加した液体培地、2g/ℓ ゲルライトを加えた固形培地および1g/ℓ ゲルライトを添加した半固形培地の3種類を用いた。固形培地の場合は、プロトプラスト懸濁液を固形培地上に重層し、半固形培地の場合は、培地が固まる前に、プロトプラストを培地中に包埋した。

##### ②セルラーゼ、および培地の植物生長調節物質の影響

1mg/ℓ NAA+0.1mg/ℓ BA添加のCM培地で継代した‘先勝の雪’の子葉由来カルス（移植後12日目）を用いた。セルラーゼとして1.5%メイセラゼおよび0.75%セルラーゼオノツカR10の2種類を用い、他の条件は実験(ii)-①の通りとした。植物生長調節物質として、0.5mg/ℓ NAA+1mg/ℓ BA、1mg/ℓ NAA+1mg/ℓ BAおよび1mg/ℓ NAA+0.2mg/ℓ 2,4-D+1mg/ℓ BAをそれぞれCPM培地に添加した3処理区の培地を用い、セルラーゼの2処理区と組み合わせて、6処理区とした。

### ③培地の糖および植物生長調節物質の影響

1mg/ℓ NAA+0.1mg/ℓ BA添加のCM培地で継代した‘先勝の雪’の子葉由来カルス（移植後12日目）を材料とした。プロトプラストの培養は、CPM培地（サッカロース2%）および、CPM培地のサッカロースを1%にし、1%グルコースを加えたものの2処理を設け、さらに、植物生長調節物質として、0.5mg/ℓ NAA+1mg/ℓ BA、1mg/ℓ NAA+1mg/ℓ BAおよび1mg/ℓ NAA+0.2mg/ℓ 2,4-D+1mg/ℓ BAを添加した3処理を設け、これらを組み合わせた計6処理区で行った。

#### (iii) コロニー形成条件の検討

##### ①植物生長調節物質の影響

1mg/ℓ NAA+0.1mg/ℓ BA添加のCM培地で継代した‘ホワイトワンダー’の下胚軸由来カルス（移植後3日目）を用いた。プロトプラスト培養培地はCPM培地および、これに0.5mg/ℓ NAA+1mg/ℓ BA、1mg/ℓ NAA+0.5mg/ℓ BAおよび1mg/ℓ NAA+1mg/ℓ BA添加の4処理区とした。培養2週間後、マンニトールを除去したCPM培地に0.1mg/ℓ NAA+0.1mg/ℓ BAを添加した培地（L培地）、または1mg/ℓ NAA+1mg/ℓ BAを添加した培地（H培地）を各処理に0.3mℓずつ補充した。

##### ②品種および培地形態の影響

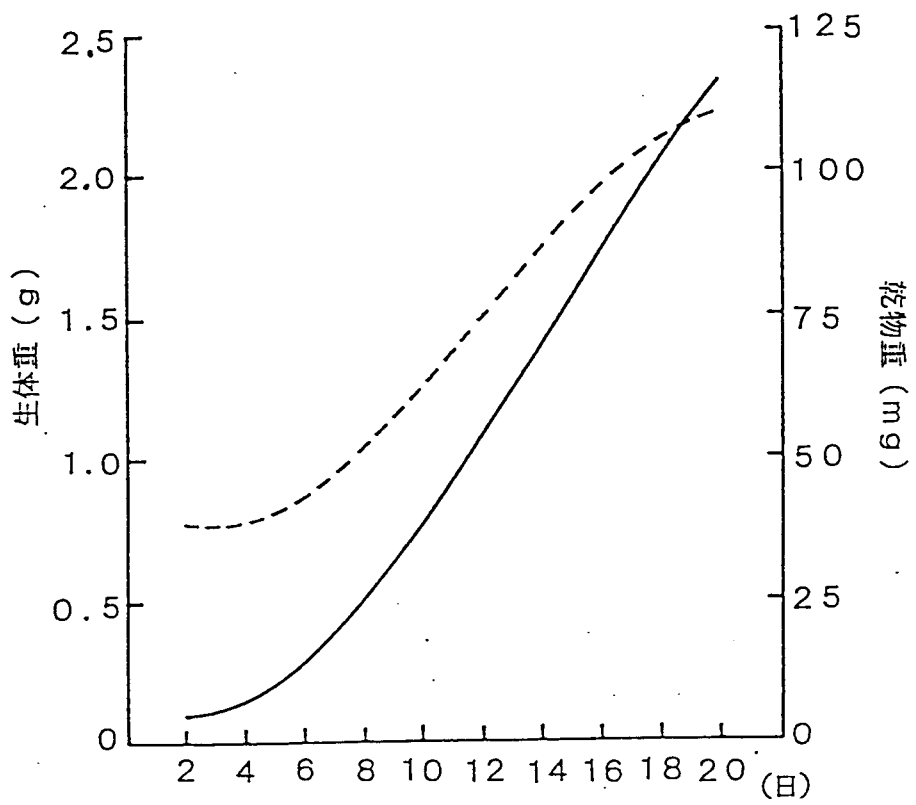
1mg/ℓ NAA+0.1mg/ℓ BA添加CM培地で継代した‘雪まつり’および‘ホワイトワンダー’の下胚軸由来カルス（移植後6日目）を用いた。培地としては実験(ii)-①と同様に液体、半固形、固形の3種類を用いた。2週間後、マンニトールを除去した培地に0.1mg/ℓ NAA+0.1mg/ℓ BAを添加したものを、各処理区ごとに0.3mℓずつ加えた。

## 結果

‘ホワイトワンダー’の下胚軸由来カルスを材料として、固形培地状で継代培養を行い、生長曲線に表したものを第2-9図に示したところ、6日目頃から増加が始まり、乾物重では16日目には飽和に達するのが認められた。

#### (i) プロトプラストの単離条件の検討（第2-2表）

最もプロトプラスト収量が高かった区は1.5%メイセラゼ（デキストラン硫酸カリウム添加）の区で $1.4 \times 10^5$ 個/F.W.gであった。セルラーゼオノヅカRS、R10も $0.6 \sim 0.8 \times 10^5$ 個/F.W.g.と高い収量を示したが、メイセラゼと比較して



第2-9図 ストックのカルス生長曲線  
 — 生体重    … 乾物重



破損した細胞の残渣が目立った。メイセラゼを用いた場合、デキストラン硫酸カリウム添加によりやや収量が増加した。

(ii) プロトプラストの分裂条件の検討

①カルス継代培地およびプロトプラスト培養培地形態の影響 (第2-10, 11図)

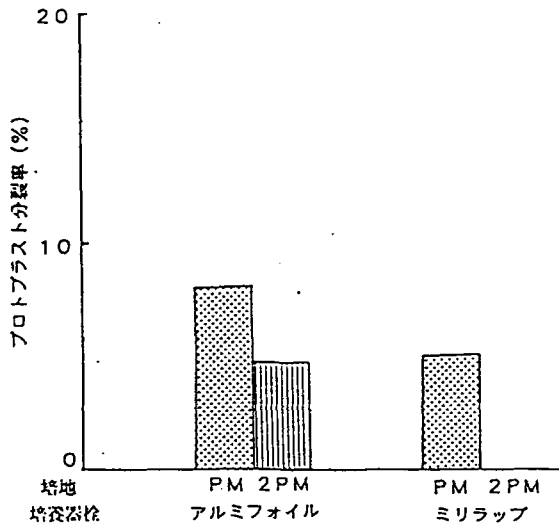
第2-10図に、材料の下胚軸由来カルス、カルスプロトプラストおよびその第一分裂を示した。カルスの外観は、1mg/ℓ NAA添加培地上で白っぽく、1mg/ℓ NAA+0.1mg/ℓ BA添加培地上でやや黄色を帯び、部分的に黄緑色を呈していた。いずれの処理区においても半数以上のプロトプラストは死滅し、分裂率は低かった。生存率 (培養7日間) は1mg/ℓ NAA+0.1mg/ℓ BA添加培地のカルスからのプロトプラストで高かった。培養に用いた3種類の培地のうちでは、固形培地において分裂率が高く、液体培地では低い傾向を示し、分裂率が必ずしも生存率と関連が深いとは言えなかった。

②セルラーゼおよび培地の植物生長調節物質の影響 (第2-12図)

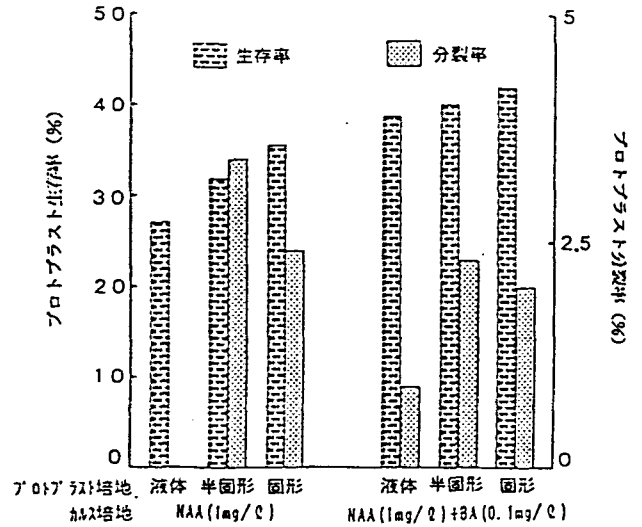
0.75%セルラーゼオノヅカR10で単離したプロトプラストは緑色を呈したまますべて収縮し、分裂はまったく認められなかった。一方メイセラゼで単離したプロトプラストもほとんどが死滅したが、全処理区でわずかであったが分裂が見られ、1mg/ℓ NAA+1mg/ℓ BA区で最も分裂率が高かった。

第2-2表 ストックの下胚軸由来カルスからのプロトプラストの単離に及ぼす酵素の影響

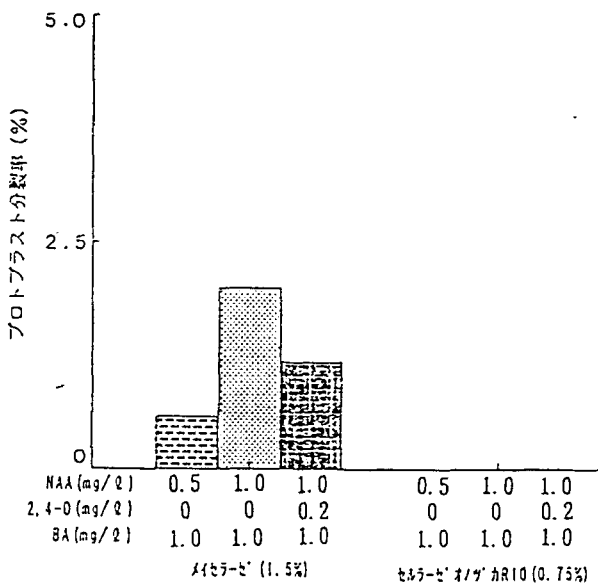
セルラーゼ	(%)	デキストラン硫酸カリウム	プロトプラスト収量 (個/F. W. g)
メイセラゼ	1.5	—	$1.12 \times 10^5$
	1.5	+	$1.39 \times 10^5$
セルラーゼ オノヅカR10	1.0	+	$0.84 \times 10^5$
セルラーゼ オノヅカRS	0.5	+	$0.59 \times 10^5$



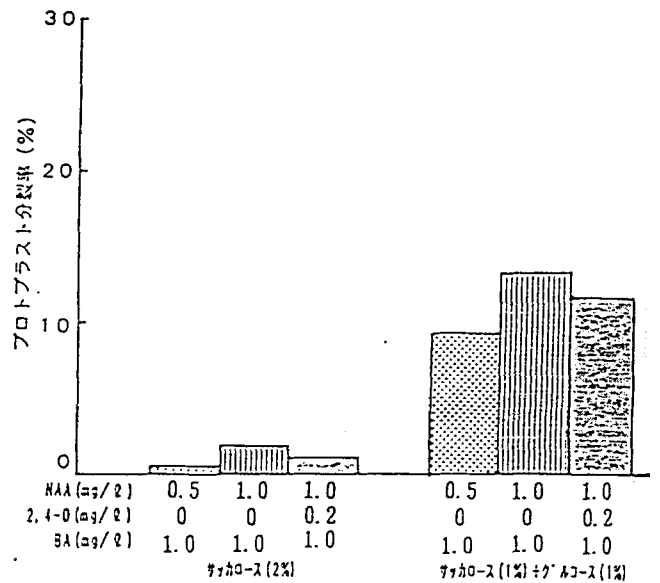
第2-7図 ストックの子葉プロトプラストの分裂に及ぼすプロトプラスト培地および培養器栓の影響 (培養1週間)  
z: 2PM=PM培地の無機塩のみ2倍にしたもの



第2-11図 ストックのカルスプロトプラストの生存および分裂に及ぼすカルス培地およびプロトプラスト培養培地の形態の影響 (培養1週間)



第2-12図 ストックのカルスプロトプラストの分裂に及ぼすセルラーゼおよび植物生長調節物質の影響 (培養1週間)



第2-13図 ストックのカルスプロトプラストの分裂に及ぼすおよび植物生長調節物質の影響 (培養1週間)  
\*セルラーゼは1.5%メイセラゼを使用

③培地の糖および植物生長調節物質の影響（第2-13図）

全ての植物生長調節物質の区において、サッカロース単独より、サッカロースとグルコースを組み合わせた培地で高い分裂率を示した。同じ糖組成の場合では、1mg/ℓ NAA+1mg/ℓ BA区で最も分裂率が高かった。

(iii) コロニー形成条件の検討

①植物生長調節物質の影響（第2-3表、第2-14図）

最初に1mg/ℓ NAA+1mg/ℓ BA添加培地で培養し、その後「L培地」を補充した区でコロニー形成数が26と最も多かった。また、最初に0.5mg/ℓ NAA+1mg/ℓ BA添加培地で培養し、次に「H培地」を補充した区ではコロニーは全く形成されなかった。いずれの一次培地においても、2週間後に「L培地」を添加した区の方が、「H培地」を添加した区よりコロニー数が優っていた。なお、第2-14図に形成されたコロニーの一例を示した。

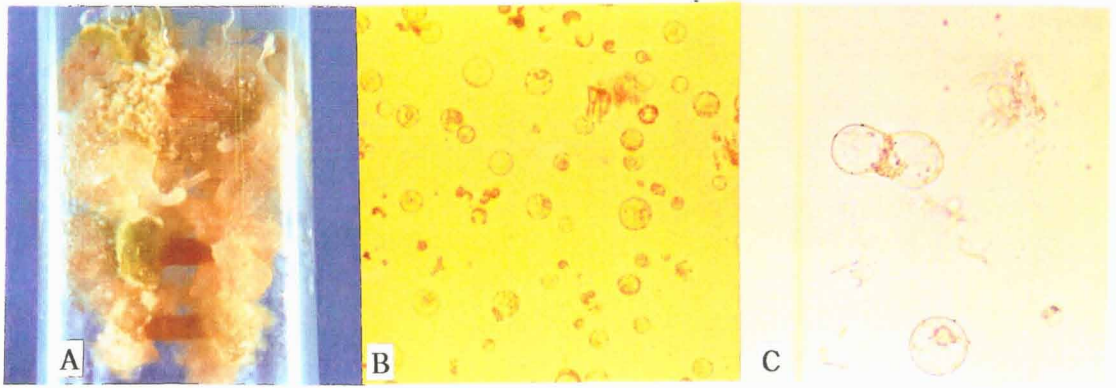
②品種および培地形態の影響（第2-4表）

両品種とも液体培地でコロニー数が多く、シャーレあたり6~8個なのに対し、半固形培地、固形培地は0.5~2.5個と著しく劣った。

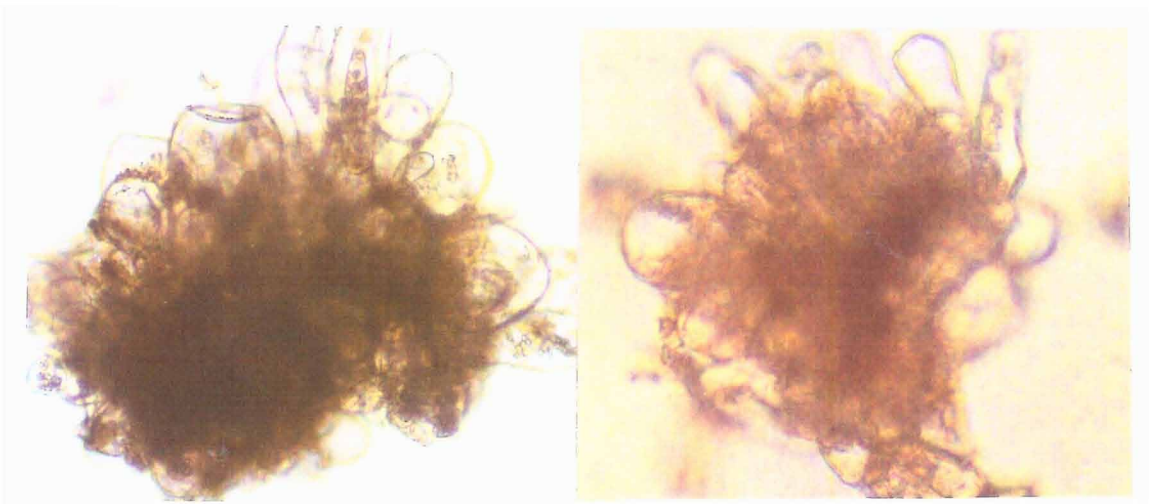
第2-3表 ストックの下胚軸由来のカルスプロトプラストのコロニー形成に及ぼす植物生長調節物質の影響（培養1ヶ月）

1次培地		補充培地 <sup>z</sup>	コロニー数/シャーレ (個)
NAA (mg/ℓ)	BA (mg/ℓ)		
0	0	L	10
		H	1
0.5	1.0	L	12
		H	0
1.0	0.5	L	8
		H	4
1.0	1.0	L	26
		H	2

Z: 1次培養2週間後にL培地およびH培地をシャーレ当たり0.3mℓを補充  
L培地…0.1mg/ℓ NAA+0.1mg/ℓ BA、H培地…1.0mg/ℓ NAA+1.0mg/ℓ BA



第2-10図 ストックの下胚軸からのカルス (A)、カルスプロトプラスト (B) およびその第一分裂 (C)



第2-14図 ストック‘ホワイトワンダー’のカルスプロトプラストからのコロニー形成



第2-15図 ストック‘クリスマスホワイト’の本葉由来カルスからのプロトプラストから形成されたカルス

第2-4表 ストックの下胚軸由来のカルスプロトプラストの  
コロニー形成に及ぼす培養培地の形態の影響 (培養1ヶ月)

品種	培地形態	コロニー数/シャーレ
‘雪まつり’	液体	6.0
	半固形	0.5
	固形	2.5
‘ホワイトワゴン’	液体	8.0
	半固形	1.0
	固形	1.0

## (2) 本葉由来カルスからのプロトプラスト培養

### 材料および方法

温室栽培の‘クリスマスホワイト’の開花前の中上位葉を1%次亜塩素酸ナトリウムで20分間表面殺菌後5mm角に切断し、1mg/ℓ NAAを添加したCM培地で3週間、明所(3,000 lx、14時間照明)および暗所下で培養しカルスを誘導した。プロトプラスト培養は、25°Cで蛍光灯3,500 lx、14時間照明下および暗黒下で行った。プロトプラスト単離は0.125%セルラーゼオノツカRS、0.125%マセロザイムR10、0.0125%ペクトリアーゼY23および0.6Mマンニトールの組成の酵素液中にカルスを静置し、暗所で行った。プロトプラストの精製は子葉および下胚軸カルスからのプロトプラストの場合と同様に行った。培養に当ってはプロトプラストの密度を $1 \times 10^5$ 個/mlに調整し、CPM培地に1.0mg/ℓ NAA+1.0mg/ℓ BAを添加し、プロトプラスト培養を行った。培地は、液体培地と2g/ℓゲルライトの固形培地の2種類を用いた。また培養器には直径6cmのプラスチックシャーレを用い、培養は、20°C蛍光灯下3,500 lx、24時間照明下で行った。プロトプラスト単離の酵素処理時間は、明所培養のカルスは16.5時間、暗所培養したカルスは17.5時間であった。

### 結果

プロトプラスト収量は明所培養のカルスから単離した方が高く、葉緑体を含んでいた。培養開始2日目から、暗所培養したカルスから単離したプロトプラストが固形培地上で分裂し始めた。その後分裂を続け、コロニーに生長した。1ヶ月

月後、コロニー培養中の培地に0.3mg/ℓ BAを含むPC液体培地を加え、さらに培養を続けたところ、3ヶ月後に肉眼で確認できる白色のカルスを形成した（第2-15図）。

## 2. ウォールフラワーのプロトプラスト培養

無菌播種、およびプロトプラストの単離・精製および培養は、ストックの子葉およびカルスからのプロトプラストの場合とほぼ同条件で行った。ただし、全酵素液に0.5%デキストラン硫酸カリウムを添加したなど、一部改変した。品種は‘オールダブル’を用いた。

### 1) 子葉からのプロトプラスト培養

#### 材料および方法

無菌播種後14日目の子葉を用いた。酵素液は第2-5表に示すような処理区を設けた。ただし、マンニトール濃度は0.7Mで行い、暗所に18.5時間静置し単離した。その他単離、培養方法は、ストックの場合と同様に行った。単離したプロトプラストを採集し、子葉生体重当りのプロトプラスト密度を計算した。

#### 結果

第2-5表に示したように、最も収量が高かったのは1.0%セルラーゼオノヅカR10+0.05%マセロザイムR10の区であった。メイセラーゼを使用した区は残さも少なく、比較的きれいなプロトプラストが単離された。セルラーゼオノヅカRSを用いた区は収量は高かったが残さが多く、精製の点でメイセラーゼよりも劣っていた。なお、第2-3図-C、Dに子葉プロトプラストとその第一分裂を示した。

### 2) カルスからのプロトプラスト培養

#### 材料および方法

#### (1) プロトプラストの単離条件の検討

1mg/ℓ NAA+0.1mg/ℓ BA添加したCM培地で継代した下胚軸由来カルス（移植後7日目）を用いた。酵素液は、MS培地に①1.5%メイセラーゼ（デキストラン硫酸カリウム無添加）、②1.5%メイセラーゼ、③1.0%セルラーゼオノヅカR10、

第2-5表 ウォールフラワーの子葉からのプロトプラストの単離に及ぼす酵素の影響

セルラーゼ (%)	ヘクチナーゼ (%)	プロトプラスト収量 (個/F.W.g)
メイセラゼ 0.5 1.0	マセロザイム R10 0.05 0.05	$7.7 \times 10^5$ $4.2 \times 10^5$
セルラーゼ オノツカR10 1.0	マセロザイム R10 0.05	$9.6 \times 10^5$
セルラーゼ オノツカRS 0.05 0.1 0.1	マセロザイム R10 0.1 0.05 0.1	$7.7 \times 10^5$ $4.7 \times 10^5$ $7.7 \times 10^5$

④0.5%セルラーゼオノツカRS添加した4処理区とし、すべての区に0.05%マセロザイムR10、0.6Mマンニトール、1%サッカロースを、また、①を除いた区に0.5%デキストラン硫酸カリウムを添加した。プロトプラストの単離はカルスを細切してから懸濁し、24°C暗所、40rpmで6.5時間振とう処理することによって行った。プロトプラストの収量は、カルスの生体重1g当りで計算した。

## (2)コロニー形成条件の検討

### ①植物生長調節物質の影響

1mg/ℓ NAAを含む固形のCM培地で下胚軸を1ヶ月培養し、カルスを誘導した後、1mg/ℓ NAA+0.1mg/ℓ BA添加のCM液体培地でカルスの振とう培養を行い、2週間ごとに継代維持し、継代後3日目のカルスを用いた。酵素液は0.75%セルラーゼオノツカR10+0.05%マセロザイムR10を用い、他の条件は2)-(1)の場合と同様とした。プロトプラスト培養培地は①CPM培地、CPM培地+②0.5mg/ℓ NAA+1mg/ℓ BA、③1mg/ℓ NAA+0.5mg/ℓ BAおよび④1mg/ℓ NAA+1mg/ℓ BAの4処理区とした。培養2週間後、0.1mg/ℓ NAA+0.1mg/ℓ BA添加、マンニトール除去のCPM培地を各シャーレにつき0.3mℓずつ加えた。培地添加2週間目に各シャーレごと形成されたコロニー数を数えた。さらに培養2週間後、コロニーを1mg/ℓ NAA+1mg/ℓ BA添加のCM固形培地に1個ずつ移植した。

### ②カルス継代培地およびプロトプラスト培養培地の形態の影響

1mg/ℓ NAAを含むCM培地で下胚軸を1ヶ月培養し、カルスを誘導した後、1mg/ℓ NAA+0.1mg/ℓ BAを添加したCM固形培地およびCM液体培地でそれぞれ継代培養し、

継代後7日目のカルスを用いた。単離条件は①と同様であった。培地は、CPM培地の液体、固形、半固形培地を用いた。

## 結果

### (1) プロトプラストの単離条件の検討 (第2-6表、第2-16図)

収量が最も高かったのは、1.5%メイセラゼを用いたものであった。0.5%セルラーゼオノツカRSではプロトプラスト単離が不十分で、また1.0%セルラーゼオノツカR10では、単離後破損したプロトプラストが多く見られた。メイセラゼを使用した場合にデキストラン硫酸カリウムの添加により、収量が高まった。第2-16図に材料である下胚軸由来カルス、カルスプロトプラストおよびその第一、二分分裂の例を示した。

### (2) コロニー形成条件の検討

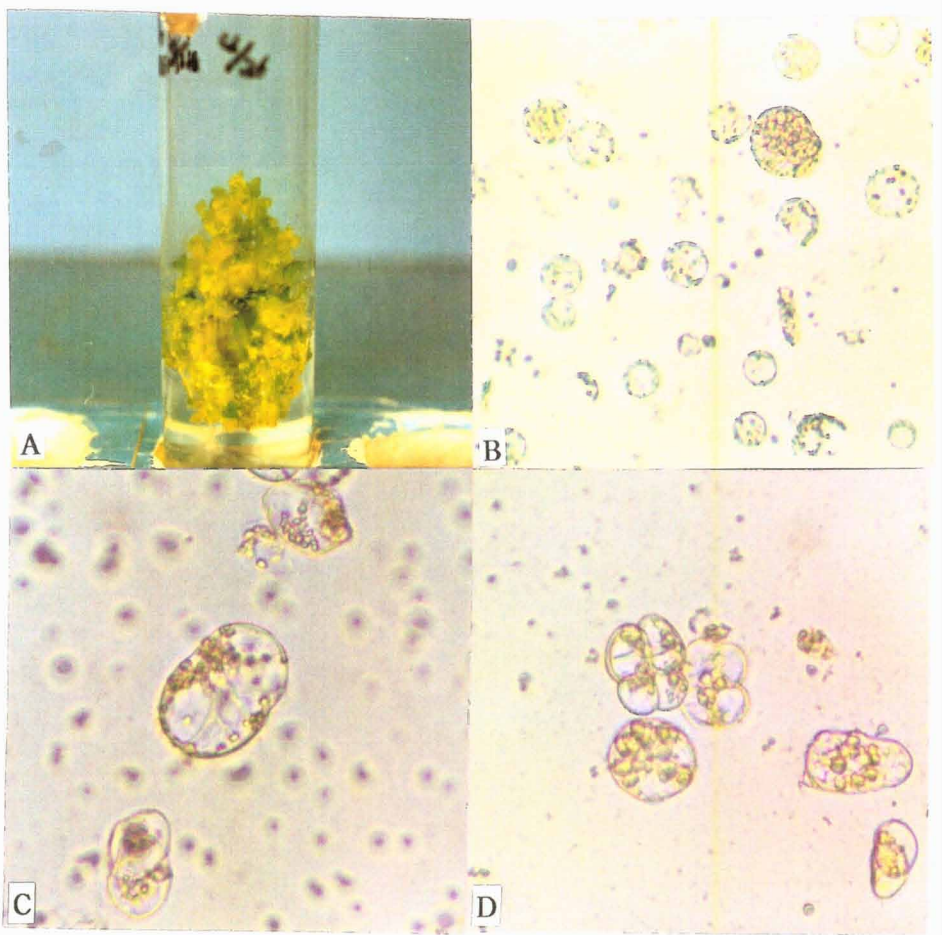
#### ① 植物生長調節物質の影響 (第2-7表、第2-17図)

全ての処理区において分裂が見られ、1mg/ℓ NAA+1mg/ℓ BA区では10細胞以上のコロニーが14個形成され、次いで、無添加区で6個形成された。移植したコロニーはほとんどが生長を停止したが、1mg/ℓ NAA+1mg/ℓ BA区では6個、無添加区では1個のコロニーが50から100細胞程度に生長した。

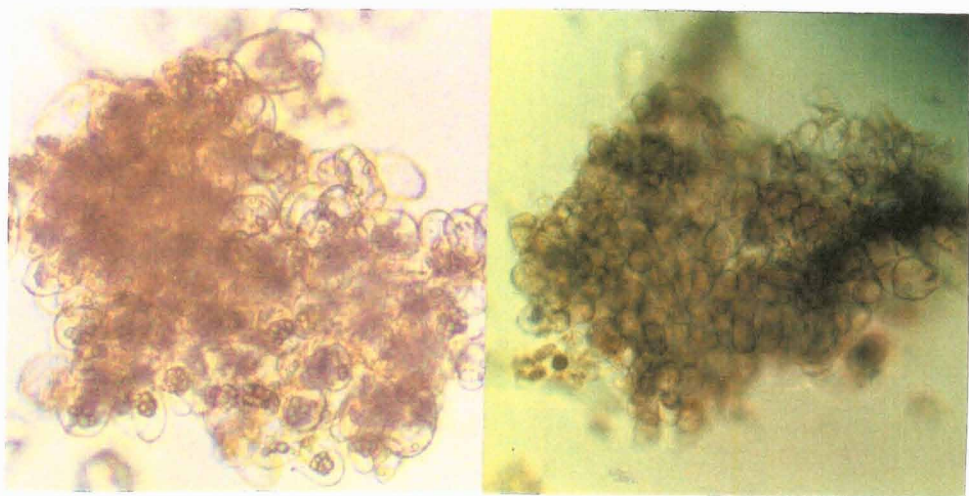
第2-6表 ウォールフラワーの下胚軸由来カルスからのプロトプラストの単離に及ぼす酵素の影響

セルラーゼ	(%)	デキストラン硫酸カリウム	プロトプラスト収量 (個/F. W. g)
メイセラゼ	1.5	—	$0.50 \times 10^5$
	1.5	+	$0.95 \times 10^5$
セルラーゼ オノツカR10	1.0	+	$0.50 \times 10^5$
セルラーゼ オノツカRS	0.5	+	$0.79 \times 10^5$





第2-16図 ウォールフラワーの下胚軸からのカルス (A)、カルスプロトプラスト (B) およびその第一、二分裂 (C、D)



第2-17図 ウォールフラワーのカルスプロトプラストからのコロニー形成の状況

②カルス継代培地およびプロトプラスト培養培地の形態の影響（第2-8表）

固形培地上で継代培養されたカルスからのプロトプラストを培養した場合、液体培地で最も多くのコロニー（14個）を形成し、次いで半固形培地で6個形成されたが、固形培地では形成されなかった。液体培地で継代したカルス由来のプロトプラストは、液体および半固形培地で各1個ずつコロニーを形成したのみで、他はほとんど分裂も見られなかった。培養2週間後に、0.1mg/ℓ NAA+0.1mg/ℓ BA添加のCM液体培地を0.3ml添加してさらに培養を続けたところ、培養1ヶ月後には、液体培地で継代したカルス由来プロトプラストから形成されたコロニーは褐変した。また、固形培地からのコロニーも50細胞以上に生長したものは3個だけで、他は生長が停止した。

第2-7表 ウォールフラワーのコロニー形成に対する植物生長調節物質の影響（培養1ヶ月）

NAA (mg/ℓ)	BA (mg/ℓ)	コロニー数/シャーレ
0	0	6
0.5	1.0	1
1.0	0.5	1
1.0	1.0	14

第2-8表 ウォールフラワーカルスプロトプラストのコロニー形成に及ぼすカルスの継代培地およびプロトプラスト培養培地の形態の影響（培養1ヶ月）

カルス継代培地	プロトプラスト培養	コロニー数/シャーレ
液体	液体	1
	半固形	1
	固形	0
固形	液体	14
	半固形	6
	固形	0

## 第2節 ストックおよびウォールフラワーの細胞融合

### 1. 子葉プロトプラストにおける細胞融合の検討

#### 材料および方法

ストック‘リトルゼムホワイト’とウォールフラワー‘オールダブル’を供試し、無菌播種後10日目の子葉から、本章第1節で用いた方法によってプロトプラストを単離した（ただし、ウォールフラワーの単離酵素液中のマンニトールは0.7Mとした）。単離したプロトプラストは、パーコールの密度勾配遠心によってプロトプラストを含んだ層の部分を取り出して、2.5mMのCaCl<sub>2</sub>、0.6Mマンニトール（ウォールフラワーは0.7M）を含む溶液（pH5.5）に懸濁させ、100gで2分間の遠心処理によって洗浄した。その後の融合にもこの溶液を用いた。

融合には、細胞電気融合装置（島津、SSH-1）および融合チャンバー（島津、SSH-C02；容積0.4mL、電極間隔1mm）を使用した。

本実験では、プロトプラスト融合の最適条件を見いだす目的から下記の物理的条件について検討した。

#### 1) パールチェーン形成に及ぼすプロトプラスト密度および高周波電界強度の影響

パールチェーンとは、プロトプラストが高周波電界場において静電的に泳動し、電流の方向にそって移動、並列してできたプロトプラストの鎖を意味し、融合のための前提条件となる。

ストックは、プロトプラスト密度  $5 \times 10^4$  および  $1 \times 10^5$  個/mL、高周波電界強度 1MHz、100、150 および 200V/cm に、ウォールフラワーは、プロトプラスト密度  $1 \times 10^5$  および  $2 \times 10^5$  個/mL、高周波電界強度 1MHz、100、150 および 200V/cm に設定し、印加時間は20秒として、パールチェーンを形成させ、その形成能をストックとウォールフラワーで単独に調べた。各処理に対し、計数したプロトプラストの数は約1,000個であった。

#### 2) プロトプラスト融合に及ぼす直流パルスの影響

融合率に及ぼす直流パルスの電界強度およびパルス幅の影響について調べた。ストックおよびウォールフラワーのプロトプラスト密度を  $1 \times 10^5$  個/mL とし、

高周波電界強度1MHz、150V/cmで20秒間印加し、パールチェーン形成後、直流パルス 1.0、1.5、2.0kV/cm、パルス幅30、50、70 $\mu$ sをそれぞれ組み合わせて、ストック同士およびウォールフラワー同士について融合処理を行った。各処理において、計数したプロトプラストの数は約1,000個であった。

## 結果

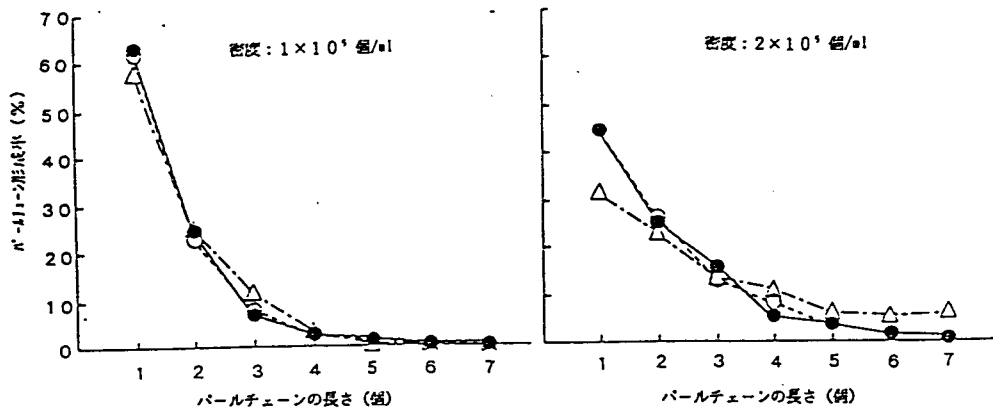
### 1) パールチェーン形成に及ぼすプロトプラスト密度および高周波電界強度の影響 (第2-18、19、20図)

ストックのプロトプラスト密度および高周波電界強度とパールチェーン形成との関係を第2-18図に示した。また第2-20図-A、Bはパールチェーン形成の状況を示したものである。プロトプラスト密度が等しい場合は、高周波電界強度の値に関わらず、パールチェーン形成の傾向はほぼ同じであった。しかし、密度が異なる場合、高い方がパールチェーン形成に関与しているプロトプラストの割合が高くなり、1個のまま存在するプロトプラストの割合は、密度が低い場合 ( $5 \times 10^4$ ) は60%前後であったのに対し、高い場合 ( $1 \times 10^5$ ) は40~50%程度と低く、3~4個の長いパールチェーンを形成する割合が増加する傾向があった。

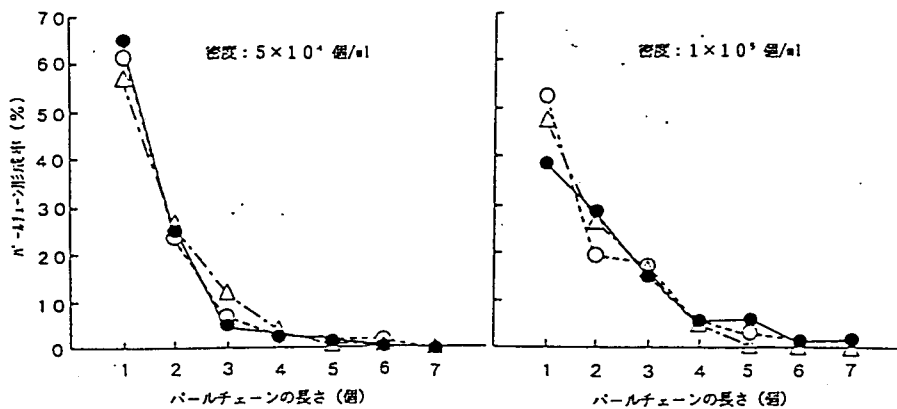
次にウォールフラワーの結果を第2-19図に示した。ウォールフラワーの子葉プロトプラストはストックに比べて小さいため、密度を高くして実験を行ったが、ストックとほぼ同じ傾向を示した。本実験より目的とするプロトプラスト2個の融合条件としてストックの場合は密度  $1 \times 10^5$  個/ $\text{m}^2$ 、高周波電界強度1MHz、150V/cm、ウォールフラワーの場合、密度  $1 \times 10^5$  個/ $\text{m}^2$ 、高周波電界強度1MHz、100V/cmが好適であった。

### 2) プロトプラスト融合に及ぼす直流パルスの影響 (第2-9、10表、第2-21図)

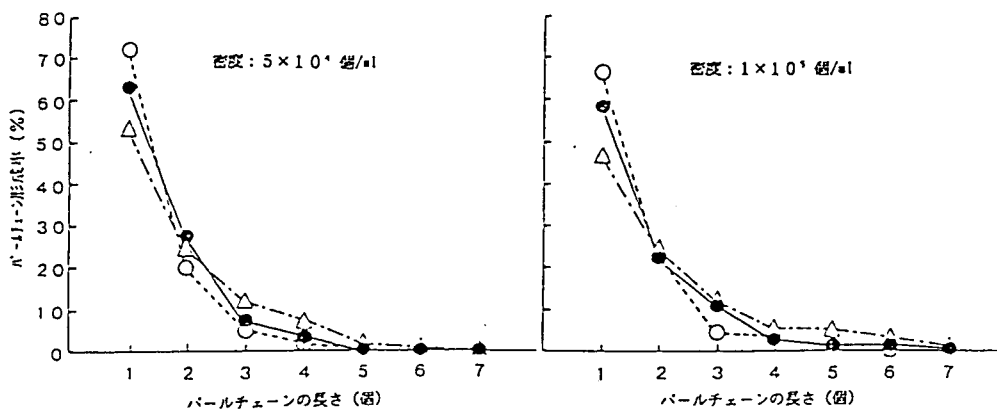
ストックの場合 (第2-9表)、同じ電界強度では、パルス幅が長いほど融合するプロトプラストの割合は高くなったが、破損する割合も高くなり、2.0kV/cm、70 $\mu$ sでは43.7%のプロトプラストが壊れた (第21図-D)。また一方、同じパルス幅の場合は、電界強度が大きいほど、融合する割合は高くなる傾向が見られたが、破損する割合も高くなった。2個のプロトプラストが融合 (第21図-A) した割合の最も高かったのは、パルス電圧1.5kV/cm、パルス幅70 $\mu$ sにおける3.5%であった。



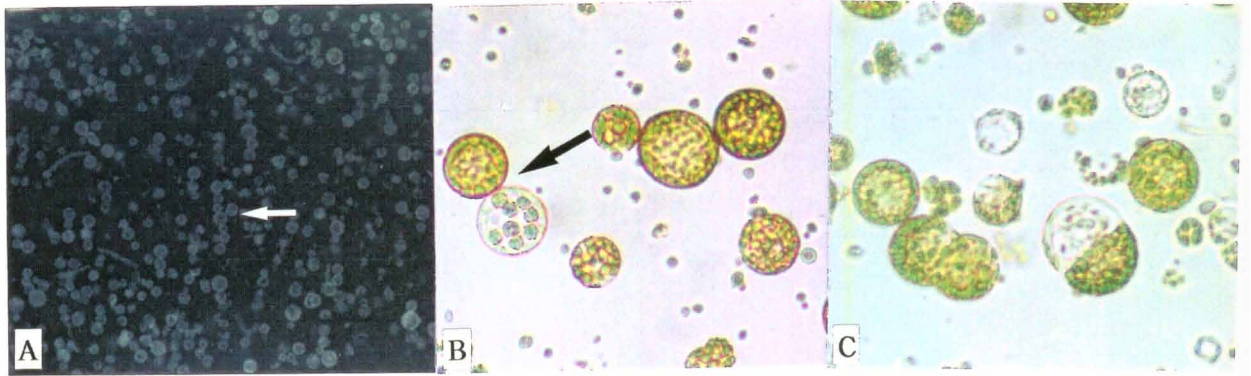
第2-18図 ストックの子葉プロトプラストのパールチェーン形成に及ぼす高周波電界強度の影響  
電界強度 ○-100V/cm ●-150V/cm △-200V/cm



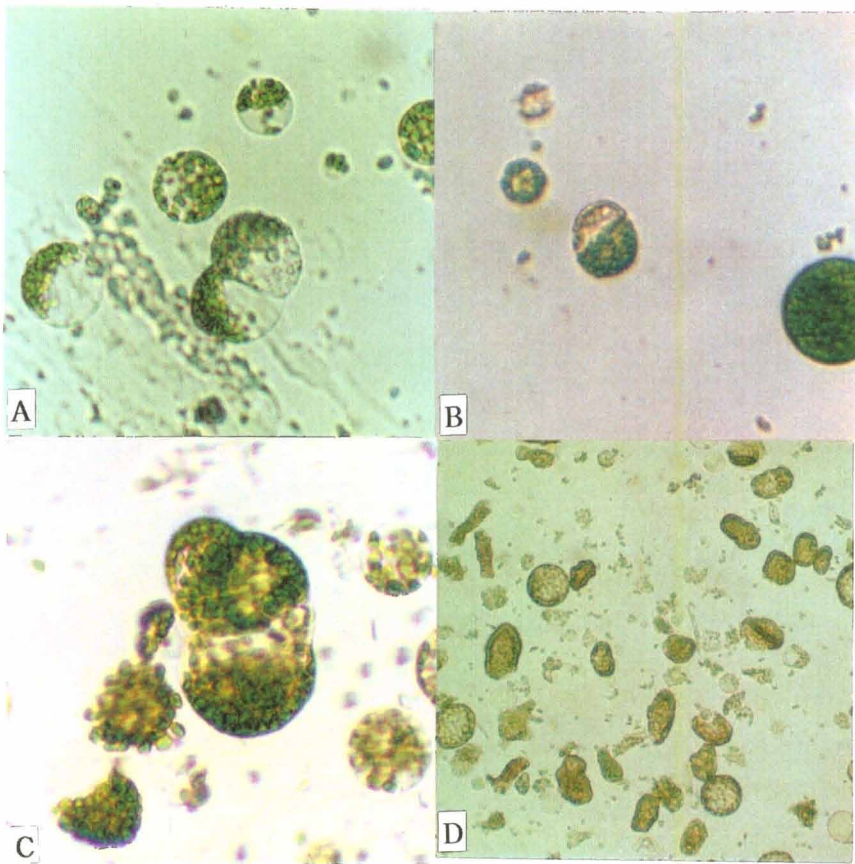
第2-19図 ウォールフラワーの子葉プロトプラストのパールチェーン形成に及ぼす高周波電界強度の影響  
電界強度 ○-100V/cm ●-150V/cm △-200V/cm



第2-22図 ストックのカルスプロトプラストのパールチェーン形成に及ぼす高周波電界強度の影響  
電界強度 ○-200V/cm ●-300V/cm △-400V/cm



第2-20図 ストックの子葉プロトプラストのパールチェーン形成および融合の状況  
 A : パールチェーン形成    B : シングルペア    C : 融合の状況



第2-21図 子葉プロトプラストの融合状況  
 A : ストック子葉プロトプラスト同士の融合  
 B : ウォールフラワー子葉プロトプラスト同士の融合  
 C : 多細胞の融合 (ウォールフラワー)  
 D : 融合処理により破損したプロトプラスト (ストック)

第2-9表 ストックの子葉プロトプラストの融合および破損に及ぼす  
直流パルス (VDC) およびパルス幅 (PW) の影響  
(密度:  $1 \times 10^5$ 個/㎖)

VDC (kV/cm)	PW ( $\mu$ s)	2細胞間 の融合 (%)	多細胞間 の融合 (%)	非融合 (%)	破損 (%)
1.0	30	0.3	0	84.3	15.4
	50	0.5	0.1	81.1	18.4
	70	1.2	0	73.8	25.1
1.5	30	1.8	0	67.7	30.5
	50	2.7	0	62.1	35.2
	70	3.5	0.2	65.6	30.7
2.0	30	2.3	0.4	61.3	36.2
	50	2.9	0.2	55.5	41.7
	70	2.3	0.1	53.9	43.7

次にウォールフラワーの場合 (第2-10表)、電界強度およびパルス幅が大きくなるにつれて融合率、破損率が高くなる傾向は、ストックの場合と同様であったが、ストックと比較して、融合する割合が非常に高く、3個以上で融合する割合も増加した (第21図-C)。また、2.0kV/cm程度の強い電圧に対する破損率はストックと比較して低く、2.0kV/cm、70 $\mu$ sでは33.8%とストックよりも10%低かった (第2-10表)。ウォールフラワーの場合、2個のプロトプラストが融合 (第21図-B) した割合の最も高かったのは、2.0kV/cm、30 $\mu$ sにおける16.2%であった。

## 2. ストックのカルスプロトプラストの融合に関する検討

### 材料および方法

融合には細胞融合遺伝子導入装置 (日本医化、F1-700) および融合チャンバー (島津、SSH-C02;容積0.4ml、電極間隔1mm) を用いた。‘ホワイトワンダー’を供試し、前述のカルスからのプロトプラスト単離で述べた方法によって、下胚軸由来のカルスを誘導し、1mg/l NAA+0.1mg/l BA添加のCM固形培地で2週間毎に継代したカルスからプロトプラストを単離した。酵素液はMS培地に1.5%メイセラゼ、0.05%マセロザイムR10、0.5%デキストラン硫酸カリウムおよび0.6Mマンニトールを添加したものをを用いた。プロトプラストの単離は2.5mMの

第2-10表 ウォールフラワーの子葉プロトプラストの融合および破損に及ぼす  
直流パルス (VDC) およびパルス幅 (PW) の影響  
(密度:  $1 \times 10^5$  個/ml)

VDC (kV/cm)	PW ( $\mu$ s)	2細胞間 の融合 (%)	多細胞間 の融合 (%)	非融合 (%)	破損 (%)
1.0	30	9.4	2.1	74.2	14.2
	50	12.0	2.2	68.4	17.5
	70	13.4	2.9	64.4	19.3
1.5	30	9.8	1.6	57.4	31.2
	50	10.0	2.2	55.7	32.2
	70	10.0	1.9	48.2	39.5
2.0	30	16.2	3.2	55.2	25.5
	50	12.4	3.5	54.4	29.4
	70	12.7	1.7	54.4	33.8

CaCl<sub>2</sub>、0.6Mマンニトール溶液 (pH5.5) に懸濁させ、100gで2分間遠心処理し洗浄した。プロトプラストの融合にも、同組成の培養液を用いた。

1) バールチェーン形成に及ぼすプロトプラスト密度および高周波電界強度の影響

プロトプラスト密度を  $5 \times 10^4$  および  $1 \times 10^5$  個/ml の2段階とし高周波電界強度を1MHz、200、300および400V/cmの3段階についてバールチェーン形成能を調べた。印加時間は20秒とした。各処理において計数したプロトプラストの数は約1,000個であった。

2) プロトプラスト融合に及ぼす直流パルスの影響

直流パルスの電界強度およびパルス幅と融合率との関係について調べた。密度を  $1 \times 10^5$  個/ml とし、高周波電界強度1MHz、300V/cmで20秒間印加し、バールチェーン形成後、電界強度 1.67および2.0kV/cmとパルス幅32、64、128 $\mu$ sを組み合わせて融合処理した。各処理に対して、計数したプロトプラストの数は約1,000個であった。

## 結果

1) バールチェーン形成に及ぼすプロトプラスト密度および高周波電界強度の影響 (第2-22図)



プロトプラスト密度が同一の場合ではパールチェーン形成は同様の傾向を示し、高周波電界強度を高めた場合3個以上で接着する割合がやや増加し、その割合は密度の高い $1 \times 10^5$ 個/ $\text{ml}$ に調整したものの方が高かった。望ましいシングルペアの割合の高かった処理区は、密度 $5 \times 10^4$ 個/ $\text{ml}$ 、高周波電界強度1MHz、 $300\text{V}/\text{cm}$ であった。

## 2) プロトプラスト融合に及ぼす直流パルスの影響 (第2-11表)

プロトプラスト密度が $1 \times 10^5$ 個/ $\text{ml}$ の場合、同じパルス電圧の場合には、パルス幅が長いほど融合に関わったプロトプラストの割合が高くなった。 $5 \times 10^4$ 個/ $\text{ml}$ の場合は破損率は高かったが、一方融合率も高くなった。また、同じパルス幅の場合は、パルス電圧が大きいほど、融合する割合は高くなる傾向が見られ、また破損する割合も高くなった。2個のプロトプラストが融合した割合の最も高かったのは、密度 $1 \times 10^5$ 個/ $\text{ml}$ の場合のパルス電圧 $2.0\text{kV}/\text{cm}$ 、パルス幅 $128\mu\text{s}$ における14.9%であった。

第2-11表 ストックのカルスプロトプラストの融合および破損に及ぼす直流パルス (VDC) およびパルス幅 (PW) の影響

密度 (個/ $\text{ml}$ )	VDC ( $\text{kV}/\text{cm}$ )	PW ( $\mu\text{s}$ )	2細胞間 の融合 (%)	多細胞間 融合 (%)	非融合 (%)	破損 (%)
$5 \times 10^4$	1.67	30	11.5	1.9	79.1	7.5
		64	13.8	2.9	73.1	10.2
		128	8.7	2.7	75.0	13.7
	2.0	30	13.3	2.5	71.9	12.3
		64	12.1	2.7	67.4	16.9
		128	12.0	2.9	63.9	21.2
$1 \times 10^5$	1.67	30	5.5	0.9	88.6	5.0
		64	7.3	1.1	85.9	5.6
		128	8.8	1.5	80.7	9.1
	2.0	30	9.1	2.9	80.4	7.7
		64	11.7	2.5	77.2	8.6
		128	14.9	2.4	73.0	9.7

### 3. ストックとウォールフラワーの細胞融合

#### 材料および方法

融合には細胞融合遺伝子導入装置（日本医化、F1-700）および融合チャンパー（島津、SSH-C02;容積0.4ml、電極間隔1mm）を用いた。

材料は、ストックでは‘雪まつり’、‘ホワイトワンダー’の播種後7~10日目の子葉および‘ホワイトワンダー’の下胚軸由来カルスを、またウォールフラワー‘オールダブル’では播種後7~10日目の子葉および下胚軸由来カルスを用いた。なお、いずれの品種も1mg/l BA+1mg/l NAA添加のCM培地でカルス誘導し、継代培養したカルス（継代後3~7日目）をプロトプラスト単離に用いた。

融合実験として、プロトプラスト単離用酵素の濃度、および融合時の直流パルス幅がプロトプラスト融合に及ぼす影響を見るために以下の2処理区を設けて行った。

① ストック‘雪まつり’の子葉、‘ホワイトワンダー’のカルスおよびウォールフラワー‘オールダブル’の子葉とカルスからのプロトプラストを用いた。単離の条件は、両種の子葉は、0.3%セルラーゼオノヅカRS+0.3%マセロザイムR10で6時間、静置処理し、カルスは0.75%セルラーゼオノヅカRS+0.05%マセロザイムR10で行った。

融合は、ストックとウォールフラワーの子葉間、カルス間、両種の子葉とカルス間の相互の融合の4組合せで行った。融合条件は、高周波電界強度、1MHz、200V/cm、30秒処理後、直流パルス、1.67kV/cm、64 $\mu$ sを印加した。

② ストック‘ホワイトワンダー’の子葉とカルス、およびウォールフラワー‘オールダブル’の子葉とカルスからのプロトプラストを用いた。子葉からのプロトプラストの単離は、1.0%セルラーゼオノヅカR10+0.05%マセロザイムR10で、またカルスからのプロトプラストの単離は、0.75%セルラーゼオノヅカRS+0.05%マセロザイムR10で行った。

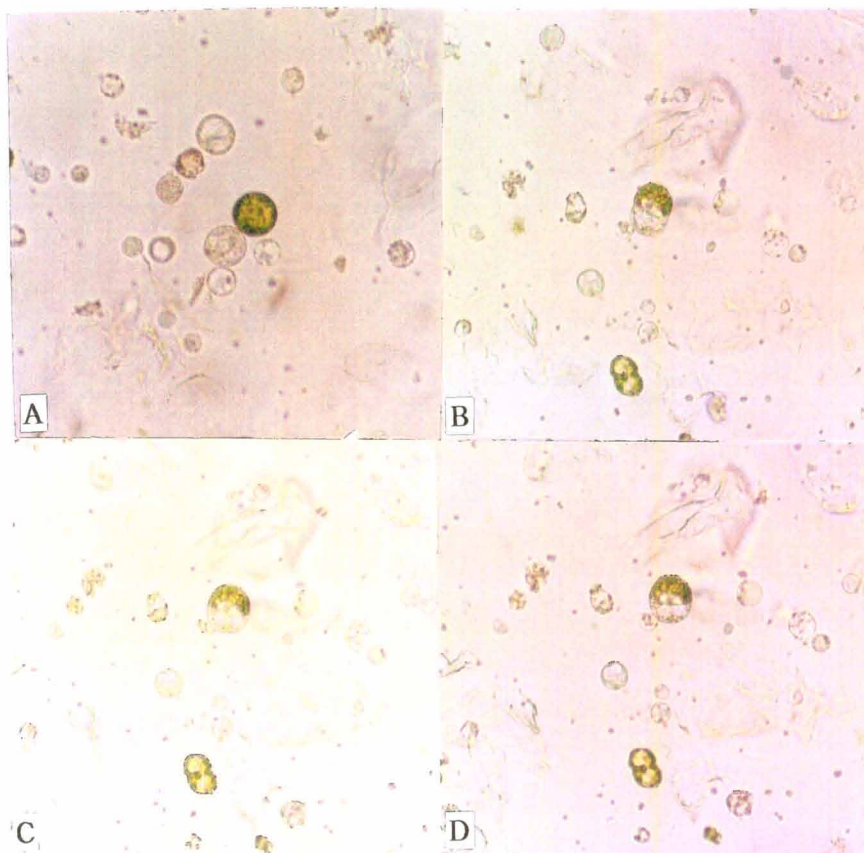
融合は、①と同じ4組合せで行った。融合条件は、高周波電界強度、1MHz、200V/cm、30秒処理後、直流パルス、1.67kV/cm、32 $\mu$ Sで行った。

#### 結果

①酵素処理時間をカルスと等しくするため、子葉はやや高濃度の酵素で単離処

理を行ったため、ストックの子葉では壊れたプロトプラストが多く観察された。子葉同士の融合は直流パルス印加後、ストックのプロトプラストの大部分が破損したため、パルス幅を $32\mu\text{s}$ に変更したが、この条件でも破損が激しく、そのため $16\mu\text{s}$ に変更した。しかしながら、この条件では融合は観察されなかった。両種のカルス同士の融合は、 $16\mu\text{s}$ で成立したが、ストックカルス由来プロトプラストの破損が多く観察された。ストックの子葉プロトプラストとウォールフラワーのカルスプロトプラストの場合は、子葉同士の場合と同じく、 $16\mu\text{s}$ でも子葉プロトプラストは印加によってほとんど破損したため、融合できなかった。ストックのカルスプロトプラストとウォールフラワーの子葉プロトプラストの融合は、パルス幅 $64\mu\text{s}$ では、ウォールフラワーの子葉プロトプラストの破損が多かったため、 $32\mu\text{s}$ に変更したところ、第2-23図に示したように、両種間で速やかに融合が成立した。融合処理後のプロトプラストは、 $1\text{mg}/\text{L}$  BA +  $1\text{mg}/\text{L}$  NAA および0.15%ゲルライトを添加したCPM培地に包埋して、 $24^{\circ}\text{C}$ 、暗所で培養したところ、4日目に第一分裂が観察された（第2-24図）。しかしながら、その後の分裂は認められなかった。

②子葉プロトプラストは16時間、静置処理することで、比較的きれいに単離できた。子葉間およびカルス間の融合は、 $32\mu\text{s}$ で成立したが、その後の培養で、プロトプラストがすべて収縮し枯死した。‘ホワイトワンダー’の子葉プロトプラストとウォールフラワーのカルスプロトプラストは、直流パルスのパルス幅が $32\mu\text{s}$ では、ウォールフラワーのカルスプロトプラストの一時的な膜の破損が起こらないため、ストックの子葉プロトプラスト同士の融合は起こっても、異種間の融合は成立しなかった。従って、パルス幅を $64\mu\text{s}$ に変更したところ、ストックの子葉プロトプラストの破損が激しく、融合できなかった。ストックのカルスプロトプラストとウォールフラワーの子葉プロトプラストの融合は、 $32\mu\text{s}$ で異種同士の融合も観察され、培養4日目には第一分裂が観察された。しかしながら、その後の分裂は認められなかった。



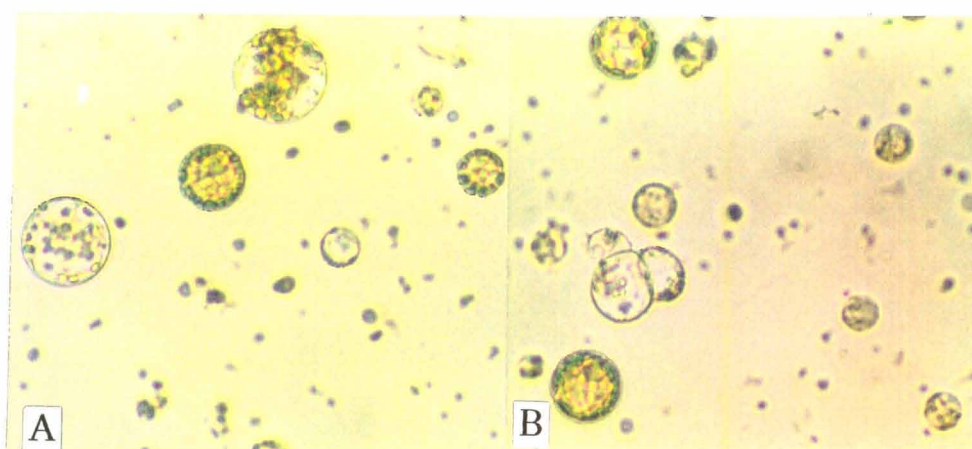
第2-23図 ストックのカルスプロトプラストとウォールフラワーの子葉  
プロトプラストの融合

A : パールチェーン形成中

B : 直流パルス印加直後

C : 融合処理5分後

D : 融合処理15分後



第2-24図 ストックのカルスプロトプラストとウォールフラワー子葉  
プロトプラストの融合

A : 融合前

B : 融合処理後4日目の第一分裂

## 考察

本実験ではプロトプラスト培養の材料として、子葉、本葉および培養細胞（カルス）を用いたが、一般にプロトプラストの単離および分裂頻度は、供試材料の生育環境と生理的條件によって大きく影響されることが知られている。

本実験ではストック、ウォールフラワーともに本葉からは安定したプロトプラストを単離することが困難であった。本葉を材料として用いる場合には、栽培環境が大きな問題となり、ハクランやサトイモでは、晴天、曇天および雨天のそれぞれの日採取した葉からプロトプラストの単離処理をしたとき、両種とも晴天の日には十分なプロトプラストが単離されたが、曇天、雨天日では単離が不十分であった（大澤・高柳, 1984）。このように屋外や温室などで栽培中の植物を用いる場合、光強度、日長、温度、湿度、土壌養分などの外的環境が大きく影響するため、安定した材料を得ることは困難である。従って、十分なプロトプラストを単離できた時は、その植物体の栽培条件および葉の生理状態を把握しておくことが、再現性を高める上から必要である。このような点から、安定した材料を得るためにはファイトロンなどの人工制御の可能な施設、または *in vitro* で生育した材料を用いることが好ましいと考えられる。

*In vitro* の子葉、本葉、様々な部位からのカルスは安定して得られる材料として好適であるが、*in vitro* の植物体においても、培養環境条件がプロトプラストの収量に大きな影響を及ぼすことが認められている。本実験でプロトプラスト単離に用いた子葉は、培養器栓としてアルミフォイルまたはミリラップを用いた培養器に無菌播種した実生から得たが、プロトプラストの分裂率はアルミフォイルの方が高い結果となり、ミリラップを用いた方が胚軸も伸長し子葉も大きくなったが分裂率では劣っていた。このように供試植物体の生育環境とプロトプラスト分裂能との間に関係が認められた。またプロトプラストの単離および分裂に及ぼす単離前の材料の処理効果が報告されており、本実験でも、水に浸漬するという前処理を行った結果、非常に高いプロトプラストの分裂率を得ることができた。また、5°Cの低温前処理を行うことにより、25°Cで行うよりさらにより結果が得られた。Araiら（1989）はカーネーションの葉肉プロトプラストの培養において、葉片あるいは植物体自体を5°Cの低温、および5°Cの水またはABA溶液への浸漬前処理が、プロトプラストの分裂→コロニー形成に対

して有効であることを示した。これらのプロトプラストの分裂活性が高くなった理由として、Wallinら（1977）は前処理（主に低温）によって引き起こされた膜タンパクの変化により、細胞膜の化学組成が強度を保つ方向に変化し、そのためにプロトプラスト単離に必要な酵素の細胞膜に対する葉害が減少することを示唆した。Mohapatraら（1988）は、アルファルファの実生を低温およびABA溶液処理し2次元電気泳動を行い、前処理したものに無処理の実生の膜タンパクとは異なるスポットを見だし、低温あるいはABA処理によって細胞膜の安定化に寄与する新しいポリペプチド鎖が形成される可能性を示唆した。ストックにおいても、5°Cの水への水浸漬前処理を行った本葉および無処理の本葉からそれぞれ細胞膜タンパクを抽出し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法に供したところ、前処理を行ったものに特異的なバンドが見られ、前処理により新しい膜タンパクが合成されたことが予想される。

またプロトプラスト単離材料としてカルスを供試する場合、カルスの培養条件および継代何日目のカルスを材料に用いるかがプロトプラスト単離および培養にとって重要である。ストックの下胚軸由来カルスの生長曲線から判断して、このようなカルスを材料とする場合、移植6~12日目の増殖が盛んなカルスをプロトプラスト単離のための材料とすることが必要条件となる。本実験では、MS培地に1mg/l NAA、および1mg/l NAA+0.1mg/l BA添加の2種類の培地を用いてプロトプラスト単離のためのカルスを誘導した。この培地の種類によって、形成されたカルスの外観は異なり、増殖速度は1mg/l NAA単独区が早かったが、プロトプラスト単離後の分裂およびコロニー形成は、BA添加区のカルスが良かった。NAA単独区のカルスは、BA添加区のカルスより分裂期間が短く老化のスピードが速いことが予想された。さらに、プロトプラストの収量や分裂に対して、カルスの誘導段階での光の影響がみられ、蛍光灯3,000 lx、14時間明期10時間暗期および24時間暗期の2つの区を設けて比較した結果、プロトプラストの収量は明所で高い値となったが、プロトプラストの分裂は暗所で優っていた。明所と暗所のカルスは細胞壁および細胞膜の物理性や生理的機能の面で異なることが考えられ、これがプロトプラストの収量にも影響していることが考えられる。

Fukunaga・King（1978）は、プロトプラスト単離に及ぼす細胞培養培地の窒素源について種々の植物について検討したところ、細胞の生長には、硝酸態窒素

( $\text{NO}_3^-$ -N)が適していたのに対し、プロトプラスト単離には硫酸アンモニウムが適しており、 $\text{NO}_3^-$ -N添加培地で生長した細胞はプロトプラスト単離の酵素活性を低下させる性質を持っていることを示唆した。

またプロトプラスト培養に及ぼす培地の窒素源についてみると、タバコプロトプラスト培養などでは、アンモニア態窒素 ( $\text{NH}_4^+$ -N)を全く含まない培地が適していることが報告されているが (Zepata, 1981)、ストックの子葉プロトプラストでは、 $\text{NH}_4^+$ -N無添加よりも $\text{NH}_4\text{NO}_3$ を400mg/ℓ含んだ場合に、分裂率が最も高い結果となった。西尾ら (1986) は、アブラナ科のハクランおよびカリフラワーの葉肉プロトプラストの培養において、1/2MS培地の $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 濃度を 0、100、200、400、800 (1/2MSと同じ濃度)、1600および3200mg/ℓの6段階に変えたところ、ハクラン、カリフラワーとも $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 濃度が100または200mg/ℓのときに最も高い分裂率を示した事を報告している。また有機態窒素の効果を見るために、ニンジン (Kamada・Harada, 1978) の培養細胞からの不定胚誘導に効果の見られたグルタミンを用いてみたところ、10mMグルタミンの添加培地において分裂率が最も高く、グルタミンがプロトプラストの分裂に有効であることが示唆された。このことから、他の幾つかのアミノ酸 (グルタミン酸、アスパラギン、アスパラギン酸、アラニン等) についても、プロトプラストの分裂に対して有効である可能性が示唆される。

プロトプラスト培養の培地に添加する糖は炭素源 (グルコース、サッカロース) とともに浸透圧調整剤 (マンニトール、ソルビトール) の役割をもっており、ほとんどのプロトプラスト培養において複数の糖を用いている。本実験の子葉プロトプラスト培養で、浸透圧調整剤としてマンニトールを用い、炭素源としてサッカロース単独またはサッカロースとグルコースを混合して用いた場合は、2種の糖を混合した場合の方がプロトプラストの分裂率が高く、ストックのカルスからのプロトプラストの培養には1%サッカロース+1%グルコースが好適であった。またサッカロース濃度を1、2、4%とした場合、サッカロース濃度が高くなるにつれて、分裂率も高くなった。このことから、子葉プロトプラストの初期分裂には高濃度の糖が必要であることが予想される。

プロトプラストの分裂、コロニー形成にとって直接的な作用をもつ植物生長調節物質の影響についてみると、ストックでは0.5mg/ℓ NAAおよび1mg/ℓ BAを添

加した区で分裂率が高く、分裂率においてゼアチンはNAAの濃度に関わらず一定の高い値を示したのに対し、BAはその濃度に対して適したNAA濃度が存在し、オーキシンよりサイトカイニン濃度による影響が大きいように思われる。またコロニー形成については、培養2週間後に添加した培地中の植物生長調節物質の濃度レベルを、初代培地のそれよりも1/10程度に低下させた場合、形成されたコロニー数が多くなった。西尾ら(1986)は、NAAとBAを用いて、キャベツ葉肉プロトプラストを培養した結果、5mg/l NAAと0.2または0.5mg/l BAを含む培地で分裂率が高く、0.2mg/l NAAでは、BAの濃度に関係なく分裂が見られなかったことを報告している。この場合、プロトプラスト分裂率はNAA濃度の差によって大きく異なり、BA濃度の影響は少なかったとしている。

培地の形態もプロトプラスト分裂にとって重要な要因となり、Hosoki・Ando(1989)はプロトプラストを0.6%のアガロースで包埋し、培養することでコロニー形成に成功した。本実験では、カルスプロトプラストにおいて、液体、固形、半固形にして包埋するという3種類の方法を試みた結果、液体培地でコロニー形成数が最も多かった。ただし、子葉プロトプラストは、液体培地の場合、凝集がひどく、分裂の妨げとなっているので、それを防ぐためには、半固形状態の培地に包埋することが効果的であると考えられる。

以上より、ストックの子葉プロトプラストは第1~2分裂までの誘導は確立されたが、それ以後コロニー形成までは至らなかった。カルスからのプロトプラストは、分裂を経てコロニー形成まで至り、一部、1mm程度のカルスにまで生長したが、その後停止した。今後はコロニーおよびカルスの生長に最適な培地および培養環境について、さらに詳細に検討することが必要である。

ウォールフラワーのプロトプラストについては、子葉および下胚軸由来のカルスを材料としたが、ウォールフラワーの子葉は、ストックと比較して硬質で、表面が毛に覆われているため、酵素の種類および処理時間はストックと異なった。セルラーゼとしてセルラーゼオノツカRSよりセルラーゼオノツカR10の方が有効で、デキストラン硫酸カリウム無添加ではプロトプラストが単離できなかった。デキストラン硫酸カリウムは細胞膜を強化する作用をもつと言われており、Passiatore・Sink(1981)はデキストラン硫酸カリウムを添加することで、プロトプラストのダメージを最小限にできることを報告している。ウォールフ



ラワーの子葉プロトプラストの場合も、プロトプラストの単離にデキストラン硫酸カリウム添加が大変有効であると思われる。しかしながら、プロトプラストの分裂はわずかに見られる程度であった。一方カルスプロトプラストの場合、材料であるカルスは白色と緑色が混在した状態で、単離する場合の酵素組成もストックとは異なり、デキストラン硫酸カリウムの要求性が高かった。カルスプロトプラスト培養培地は、 $1\text{mg}/\ell$  NAA+ $1\text{mg}/\ell$  BA添加が適しており、この点においてもストックと異なっていた。

細胞融合による体細胞雑種の作出技術は、従来の交配で不可能な組合せにおいて雑種を得ることを可能にした。プロトプラストの融合は、一般的にポリエチレングリコール (PEG) 法 (Kao, 1975; Kao・Michayluk, 1980) や高pH-高Ca法 (Pirrie・Power, 1986) が行われ、育種に利用されてきた。一方、Zimmermann (1981) によって報告された電気刺激による細胞融合法は、従来の化学的方法より操作が容易で、融合率も高く、対合するプロトプラストの数をコントロールすることができるため2細胞の融合率を高めることができ、また短時間に大量の融合が可能であり、さらにPEGのような毒性をもつ物質を利用しない等の多くの利点をもっていることから、現在植物および動物の細胞融合に広く利用されている。

電気融合は、まず高周波電界 ( $0.5\sim 1.5\text{MHz}$ 、 $100\sim 300\text{V}/\text{cm}$ の範囲が一般的) によって、プロトプラストの接着 (パールチェーン形成: 電極の+方向に平行にプロトプラストの鎖が形成される現象) をさせた後、直流パルスによって1時的に細胞膜を破壊し、その修復過程において融合を起こさせるという、2段階の手順で行われる。Tempelaar・Jones (1985) は、電気融合において、プロトプラスト密度、電界強度、直流パルスの条件を選べば、2細胞の融合頻度を高めることが可能であることを、また三浦ら (1988) はタバコ葉肉プロトプラストで、電界強度を $100\text{V}/\text{cm}$ に固定し、周波数を0.25、0.5、1、2MHzに変化させると、プロトプラストは0.25MHzでは泳動を行わず、0.5MHzでは回転しながら泳動し、1および2MHzで回転することなく泳動し、良好なパールチェーンを形成したことを示した。プロトプラストの回転現象はプロトプラスト間の接着を弱めて、融合を阻害する。この現象は一般的に0.1MHz以下の周波数で多く観察される。

本章では、ストックとウォールフラワー子葉またはカルスプロトプラストの

融合の基礎資料を得るため、まず同種間の融合実験を行い融合条件を検討した。プロトプラスト懸濁液は $2.5\text{mM}\text{CaCl}_2 + 0.6\text{M}$ マンニトール液とし、プロトプラスト密度をストックでは $5 \times 10^4$ および $1 \times 10^5$ 個/ $\text{mL}$ 、ウォールフラワーの場合は $1 \times 10^5$ および $2 \times 10^5$ 個/ $\text{mL}$ でそれぞれパールチェーンの形成を行ったところ、ストックの場合は高周波電界強度、 $1\text{MHz}$ 、 $150\text{V}/\text{cm}$ 、ウォールフラワーの場合は $100\text{V}/\text{cm}$ で、いずれの密度においてもシングルペアの割合が最も高かった。ストックのカルスプロトプラストの場合は、子葉プロトプラストと同じ電界強度条件では泳動しにくく、 $100\text{V}/\text{cm}$ ではほとんど泳動が見られなかったため、電界強度を $200$ 、 $300$ 、 $400\text{V}/\text{cm}$ に上げて行った。また、融合時の直流パルスに関しても、最適条件が子葉プロトプラストの場合より高い値となった。電界強度が高くなるほど、プロトプラストの損傷が起こりやすい (Bate, 1985) ので、電界強度を高くすることよりも、プロトプラスト密度を上げて、パールチェーン形成率を高め、プロトプラストに及ぼす損傷を最小限にする方が好ましいと考えられる。今回はストックとウォールフラワーを個別に行ったが、実際に両方のプロトプラストを混合するときは、プロトプラストが受けるダメージを考えて、電界強度の低い方に合わせる方がよいと思われる。

山口ら (1989) はカーネーションとカワラナデシコの融合で、プロトプラスト懸濁液中の抵抗値のパールチェーン形成に対する影響について調査し、 $0.5\text{M}$ のマンニトールに懸濁した場合、 $1 \times 10^5$ 個/ $\text{mL}$ では抵抗値が、 $1900\Omega$ 、 $2 \times 10^5$ 個/ $\text{mL}$ では $1300\Omega$ 、 $4 \times 10^5$ 個/ $\text{mL}$ では $700\Omega$ となり、パールチェーンの形成は良好であったが、 $0.5\text{M}$ マンニトール+CPW塩液では $50\Omega$ 以下になり融合しなかったと報告し、これは、高濃度の塩によって懸濁液の導電率が上昇し、細胞膜表面の分極能が低下し、プロトプラストが泳動しにくくなるためであることを示唆している (Bate, 1985)。

パールチェーン形成後の融合の頻度は直流パルスの電界強度とパルス幅によって決定される。西尾ら (1987) によると、キャベツとコマツナの融合において、 $2.35\text{kV}/\text{cm}$ 、 $30\mu\text{s}$ のパルスを2回与えると融合率が高く、その後もカルス化し、不定芽を再分化したが、 $2.35\text{kV}/\text{cm}$ 、 $30\mu\text{s}$ のパルスを3回与えると、プロトプラストが大量に破壊されたと報告している。またBate (1985) は *Nicotiana* 属のプロトプラストの融合において、直流パルスの電界強度が $1.0 \sim 2.0\text{kV}/\text{cm}$ の

間では融合率に差はないが、高い電界強度 (2.0kV/cm) を印加すると3個以上のプロトプラストの融合 (Multinucleate cell) の率が高くなり、目的とする2個の融合 (Binucleate cell) 率が減少することを報告している。本実験も、プロトプラスト2個の融合を目的として行ったが、2個の融合率の最も高かった条件は、子葉プロトプラストの場合、パルス回数は1回とし、ストックでは1.5kV/cm、70 $\mu$ s、ウォールフラワーでは2.0kV/cm、30 $\mu$ sであった。融合時に起きる一過的膜破壊に必要な電界強度は、一般にプロトプラストの半径に反比例すると言われている。ストックとウォールフラワーの場合は、後者のプロトプラストの方がやや小さいため、その融合にはストックより強い直流パルスを必要としたものと考えられる。このことから、電界強度の最適値が異なる2種のプロトプラストの融合を行う場合は、低い方の電界強度、すなわち今回の場合はストックの1.5kV/cmに合わせる方が望ましいと思われる。子葉プロトプラストでは、ウォールフラワーに比べてストックの融合率が低かった。これは単離時のプロトプラストの状態に影響されたと考えられ、単離技術の向上にともなってストックの融合率も上がると予想される。

ストックのカルスプロトプラストの場合でも、電界強度が高くなるほど、また同電界強度ではパルス幅が大きくなるほど、破損率は高くなり子葉プロトプラストの場合と同じ傾向を示した。5 $\times 10^4$ 個/mlでの最適条件は2.0kV/cm、128 $\mu$ sであり、子葉プロトプラストに比較して高い値となり、また破損率は子葉プロトプラストの場合よりもかなり低率となり、最高でも20%程度にとどまった。このことより、カルスプロトプラストは子葉プロトプラストよりも融合にはより高電圧の電界強度が必要であった。これは、プロトプラストの大きさも関係していると考えられるが、十分なプロトプラストを単離する時の酵素組成や処理方法の違いから判断して、子葉プロトプラストとカルスプロトプラストでは細胞膜の強度 (安定性) に違いがあるものと思われる。ウォールフラワーのカルスプロトプラストについては詳しい条件の検討を行っていないが、プロトプラストの大きさはストックよりやや小さめであることから、直流パルスの電界強度についてはやや高めであることが予想される。

ストックの子葉およびカルスからのプロトプラスト、ウォールフラワー‘オールダブル’の子葉およびカルスからのプロトプラストの4種類を用い、ストッ

クとウォールフラワーを組み合わせて、実際に融合を行った。子葉同士の融合は、条件を低い方に合わせて、プロトプラスト密度、 $1 \times 10^5$ 個/ $\text{mL}$ 、1MHz、100V/cmで30秒間処理しパールチェーン形成後、1.67kV/cm、32 $\mu\text{s}$ で融合処理し培養したが、培養24時間後にほとんどのプロトプラストが破損している状態であった。しかしながら、ストックカルスとウォールフラワー子葉のプロトプラストの融合を、プロトプラスト密度、 $5 \times 10^4$ 個/ $\text{mL}$ 、1MHz、300V/cm、30秒間 → 1.67kV/cm、32 $\mu\text{s}$ で融合処理し、培養したところ、4日後にわずかであるが分裂が観察された。融合後に分裂した細胞が異種の融合細胞（ヘテロカリオン）であるかどうかの確認はカルス形成まで至っていないためできないが、融合直後の観察で、異種同士の融合が多数確認されたことよりヘテロカリオンの可能性が充分期待できるものと思われる。

本実験では、ストックとウォールフラワーの属間雑種作出のための電氣的細胞融合法によって、パールチェーンの形成および融合の最適条件について検討し、2個のプロトプラストが高い頻度で接着する条件、およびこれらのプロトプラストが効率よく融合する条件についての基礎的知見を得ることができたが、その後の融合細胞の培養では低頻度の分裂が観察されたのみで、コロニー形成さらにカルス形成にまで至ることはできなかった。しかしながらストックの単独のプロトプラスト培養によりカルス形成がみられたことから、詳細な検討をさらに加えていくことで目的とする新花色を有する体細胞雑種の獲得の可能性が開けるものと考えられる。

## 摘要

ストックとウォールフラワーの電氣的細胞融合法による属間雑種の作出を目的として、プロトプラストの単離、培養および細胞融合の最適条件を検討した。

### 第1節 プロトプラスト培養

1. スtockの子葉プロトプラストの分裂を誘導する初期条件として、基本培地 (1/2MS) に、①サッカロース4%、マンニトール0.6M添加区が適していた。②培地のチッ素形態は、 $\text{KNO}_3$ とともに、 $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 濃度を1/2倍程含んだ場合、良好であった。また無機態チッ素をグルタミン (10mM) を添加した場合、好結果が得られた。③植物生長調節物質は、BAの影響が大きく、1mg/l添加したときに高い分裂率が得られ、またゼアチンの添加効果も認められた。④プロトプラスト単離の材料となる育成段階で、培養器栓としてミリラップ栓よりアルミフویلの方が、その後のプロトプラスト分裂は高かった。⑤プロトプラスト単離前の子葉を5℃水浸漬し、前処理することにより、分裂率が高まった。この場合、プロトプラスト培養温度は30℃より24℃が適していた。

2. スtockの子葉および下胚軸由来カルスからのプロトプラストの分裂およびコロニーおよびカルス形成を高める条件として、①NAA (1mg/l) + BA (0.1mg/l) 添加培地で誘導されたカルスからのプロトプラストが生存率は高かった。②酵素処理は、セルラーゼは0.75%セルラーゼオノツカRSよりも1.5%メイセラゼを使用した方が、その後の分裂率はやや良好であった。③培地組成のうち、サッカロース単独よりもサッカロースとグルコースを組み合わせた場合に高い分裂率を示した。④培地形態では、液体・半固形よりも固形の方が分裂率が高かった。⑤NAA (1mg/l) + BA (1mg/l) 添加した液体培地で培養し、その後、NAA (0.1mg/l) + BA (0.1mg/l) を含む培地を添加する事で最もコロニー数が多く形成され、カルス形成にまで至った。⑥葉片由来カルスプロトプラストは、明所培養したプロトプラストが固形培地で分裂し、1ヶ月後、BA (0.3mg/l) 添加の液体培地で培養したところ、カルスに生長した。

3. ウォールフラワーの子葉プロトプラストの単離条件を検討した。1.0%セルラーゼオノツカR10+0.05%マセロザイムR10を用いることで、高いプロトプラスト収量が得られた。

4. ウォールフラワーの下胚軸由来カルスからのプロトプラストの単離、培養について検討したところ、①0.5%デキストラン硫酸カリウム、1.5%メイセラゼ+0.05%マセロザイムR10を添加した区で最も収量が高かった。②コロニー形成は、1/2MS培地にNAA(1mg/ℓ)+BA(1mg/ℓ)添加区で最も良好で、③培地形態は液体培地が適し、NAA(0.1mg/ℓ)+BA(0.1mg/ℓ)を含む培地を添加し培養を続けたところ、カルス形成まで至った。

## 第2節 ストックおよびウォールフラワーの細胞融合

1. 電氣的細胞融合におけるパールチェーン形成に際し、子葉プロトプラストにおいて、高い割合でシングルペアを生じる条件は、ストックでは高周波電界強度、1MHz、150V/cm、ウォールフラワーでは、1MHz、100V/cmに設定し、密度はいずれも $1 \times 10^5$ 個/mlとした場合であった。また、2細胞の融合が起こる最適直流パルスは、ストックでは、パルス電圧1.5kV/cm、パルス幅70 $\mu$ sでウォールフラワーは2.0kV/cm、30 $\mu$ sであった。

2. ストックの下胚軸由来カルスのプロトプラストでは、パールチェーン形成は、高周波電界強度1MHz、300V/cm、プロトプラスト密度 $5 \times 10^4$ 個/mlの条件下でシングルペアの割合が最大であった。また、2細胞の融合率はパルス電圧2.0kV/cm、パルス幅128 $\mu$ sで最も高かった。

3. ストックとウォールフラワーの子葉およびカルスプロトプラストを材料とし、両種間の電氣的細胞融合を行った。ストック「カルスプロトプラスト」とウォールフラワー「子葉プロトプラスト」の融合は、高周波電界強度、1MHz、200V/cm処理でパールチェーン形成後、パルス電圧1.67kV/cm、パルス幅32 $\mu$ sを印加すると、速やかに融合し、培養4日目に第一分裂が認められた。

### 第3章 ストックの種苗生産における組織培養法の利用

#### 緒言

ストック (*Matthiola incana* R. Br.) の花には一重咲と八重咲があり、八重咲花は雄ずいと雌ずいが花弁化しているため種子を得ることができない。花弁の豪華な八重咲花は商品価値が高く、市場に流通しているものはほとんど八重咲花であるが、現在の品種の大部分は一重咲株と八重咲株が1:1に分離する品種である(斉藤, 1969)。そのため生産者は、子葉の色彩、葉形、苗の大きさなどから一重咲株と八重咲株を選別し(横井, 1978)、幼苗のうち八重咲株を選抜する作業を行っている。そのためこの作業には多くの労力が要求されている。この問題を解決する手段として、八重咲個体の組織培養を用いた大量増殖が考えられる。

また第1および2章で行った研究から優良な形質をもった八重咲個体や系統が作出された場合、①種子繁殖による増殖では長期間を要する、または②種子繁殖が極めて困難である、さらには③種子繁殖では形質分離を起こし目的の均一な個体を大量に得ることが不可能であるといった場面が想定される。従ってこのような場面においても、組織培養を利用した種苗生産が考えられる。

組織培養を利用した種苗生産の利点として、①遺伝的に均質な種苗を生産できる、②無病の苗(バクテリアおよびウィルスフリー株など)を大量に増殖できる、③生育スピードを制御し周年安定した種苗生産が望めるなどが挙げられる。

組織培養によるストックの種苗生産の試みは、福住(1986, 1988)、Gautamら(1983)によって試みられているが、現在までのところ、未だ有効な技術体系は確立されていない。その原因としては、①器官分化(特にシュート分化)の条件の解明が不十分、②個体再生における品種間差異が著しい、③高頻度の再生個体の形態異常(葉や茎の膨潤、肥厚、気孔の開閉調節の不全、クチクラ層の未発達による過蒸散など)、④馴化ステージにおける高い枯死率などが挙げられる。

本章では、ストックの組織培養による種苗生産のための最適培養条件を確立することを目的に、子葉、下胚軸、本葉および葯などを供試材料に用い、それ

ら各種組織からのカルスの誘導と増殖および器官形成に及ぼす種々の要因（培地成分、チッ素形態、植物生長調節物質、供試材料の種類など）の影響について検討した。なお、葯の培養は、葯内の半数性小孢子からの半数体および純系2倍体の作出による育種素材の拡大、および優良な八重咲株の種苗生産の二つの面から試みたものである。

本実験に共通した「材料および方法」について述べると、まず供試した種子、本葉などの材料はすべて、1%次亜塩素酸ナトリウム溶液（Tween20を数滴添加）中で20分間表面殺菌し、滅菌水で3回洗浄した。基本培地はMS培地（Murashige・Skoog, 1962、第3-1表）の無機塩類を1/2濃度にし、MSビタミン、100mg/lイノシトール、500mg/l カザミノ酸、2%サッカロースを加え、0.1NのNaOHまたはHClでpHを5.5に調整後、ゲル化剤（0.2%ゲルライト）を加えゲル化させた培地（以後、BM培地という）を用いた。培養器として試験管、三角フラスコ、および規格瓶を各試験により適宜使用した。また、培養器栓として2重のアルミフویلを使用した。培地は1.2kg/cm<sup>2</sup>、120℃でオートクレーブにより10分間加圧滅菌した。培養は主に25℃、白色蛍光灯3,000 lx、14時間照明下で行った。



## 第1節 葉片培養と器官分化

### 材料および方法

#### 1. 植物生長調節物質 (BAおよびNAA) の影響

‘クリスマスホワイト’ および ‘ピグミーホワイト’ を用い、葉片からの器官分化に及ぼすBAおよびNAAの影響をみた。

1) ‘クリスマスホワイト’ : 温室栽培の出蕾前に展開した中上位葉を用いた。培地はBM培地にBA 0、0.1および1.0mg/ℓとNAA 0、0.1、1.0および10.0mg/ℓをそれぞれ組み合わせ添加した12処理区を設け、試験管 (Ø2cm×長さ12cm) に10mlずつ分注し、傾斜培地とした。5mm角の葉片を1試験管に2片ずつ置床した。1区当り試験管10本を用いた。

2) ‘ピグミーホワイト’ : ファイトトン内 (自然光・20℃昼/15℃夜) で栽培し、開花初期の10~16葉位の展開葉を用いた。培地はBM培地にBA 0、0.1および1.0mg/ℓとNAA 0、0.1、および1.0mg/ℓをそれぞれ組み合わせ添加した9処理区を設けた。外植体の調製および培養は1) に準じた。

第3-1表 MS培地の組成

A	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650 (mg/ℓ)
B	KNO <sub>3</sub>	1900
C	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
	KI	0.83
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.25
	CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.025
D	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	440
E	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	370
	MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	22.3
	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	3.6
	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.025
F	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27.8
	Na <sub>2</sub> ·EDTA·2H <sub>2</sub> O	37.3
V	Nicotinic acid	0.5
	Pyridoxine HCl	0.5
	Thiamin HCl	0.1
	Glycine	2.0

## 2. 培地中のチッ素形態の影響

### 1) 無機態チッ素 ( $\text{NH}_4^+\text{-N}$ および $\text{NO}_3^-\text{-N}$ ) の影響

屋外で栽培した‘銀潮’および‘雪まつり’を用いた。栽培はパーミキュライトとピートモスを1:1で混合した培養土を入れたプランターで行い、‘銀潮’は50%遮光（黒寒冷紗1枚）、‘雪まつり’は75%遮光（黒寒冷紗2枚）処理をした。また、発芽後、週1回の割合で各プランターに1ℓずつ1/2倍大塚液肥（1/2液）を施用した。外植体として播種後約3か月の完全に展開した中上位葉を使用した。葉は殺菌後、5mm角に切断し、フラスコ当り4片ずつ置床した。供試培地はBM培地の $\text{NH}_4\text{NO}_3$ および $\text{KNO}_3$ を第3-2表に示した様に組合せて、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ と $\text{NO}_3^-\text{-N}$ の比率を変え、これに1mg/ℓ BAを添加した4種類のチッ素改変培地を用い、50mℓ三角フラスコに10mℓずつ分注した。品種と組み合わせ、8処理の試験区を設定した。

### 2) 有機態チッ素（アミノ酸）の影響

温室で栽培した開花前の‘クリスマススノー’Aおよび‘銀潮’の展開した中上位葉を用いた。培地はBM培地から $\text{NH}_4\text{NO}_3$ および $\text{KNO}_3$ を除き10および30mM L-グルタミン、30mMのL-グルタミン酸、L-アスパラギン酸、L-プロリン、DL-メチオニンをそれぞれ添加した6区、およびBM培地（アミノ酸無添加）の1区を加えて、計7区の培地を用いた。なお、全ての区に1.0mg/ℓ BAを添加した。

第3-2表 窒素改変培地の窒素組成

	$\text{NH}_4^+ : \text{NO}_3^-$	$\text{NH}_4\text{NO}_3$ (mM/ℓ)	$\text{KNO}_3$ (mM/ℓ)	KCl (mM/ℓ)
①	0 : 1	0	30	0
②	1 : 10	2.72	24.55	5.45
③	1 : 5	5	20	10
④	1 : 2 <sup>z</sup>	10	10	20

z : 1/2MS培地と同じ窒素組成

### 3. 外植体の葉齢の影響

ファイトトロン（自然光・20℃昼/15℃夜）内で栽培した‘クリスマスホワイト’の開花前の下位葉、中位葉、および展開し始めの上位葉を用いた。供試培地としてBM培地に植物生長調節物質、①無添加、②1.0mg/ℓ NAA、③0.1mg/ℓ 2,4-D、④0.5mg/ℓ 2,4-D、⑤0.5mg/ℓ ゼアチン（Sigma）、⑥1.0mg/ℓ ゼアチン添加の6処理区を設けた。

## 結 果

### 1. 植物生長調節物質（BAおよびNAA）の影響

1) ‘クリスマスホワイト’（第3-3表）：カルス形成は全処理区において見られ、カルスの形状は生長調節物質濃度によって異なっていた。10mg/ℓ NAA添加区で最もカルスの生長が良好で、葉片の周囲を包むように形成され、半透明の柔らかいカルスであった。一方NAA無添加区では、葉片の切り口から形成され、緑色の球状の堅いカルスであった。

シュート形成は、0.1mg/ℓ BA単用区で95%と最も高く、1葉片当たり2.5本のシュートを形成した。次いで1.0mg/ℓ BA単用区および生長調節物質無添加区（55%）で良好であった。NAA添加はシュート形成を抑制し、特に1.0mg/ℓ BA添加区ではシュートを形成しなかった。得られたシュートはすべて水浸状を呈し、緑色でやや光沢を帯び、葉は正常の葉よりも多肉質で厚くクチクラの発達は見られずロゼット状を呈していた。

発根は、1.0および10.0mg/ℓ NAA単用区および0.1mg/ℓ BA+1.0mg/ℓ NAA区において、全葉片からカルス全体を包むような短い綿状の根が形成された。発根はNAA添加によって促進され、BA添加はNAAによる発根促進を抑制する傾向を示した。

2) ‘ピグミーホワイト’（第3-4表）：カルス形成は全処理区において認められ、高い形成率を示した。カルスの形状は‘クリスマスホワイト’と同じく生長調節物質濃度により異なり、生長は0.1および1.0mg/ℓ NAA単用区で良好であった。NAA添加区のカルスは半透明で柔らかであった。一方、NAA無添加のカルスは濃緑色の直径1mm程度の球状の堅いカルスの集まりで、葉片の切り口に形成された。

シュートは1.0mg/ℓ BA単用区でのみ形成された(30%)。これらのシュートは葉切片の切断面の球状カルスから形成された。

発根はNAA単用区、および0.1mg/ℓ BA+1.0mg/ℓ NAA区で認められ、NAA単用区ではカルス全体を細根が包んでいた。

第3-3表 葉片からの器官形成に及ぼすBAおよびNAAの影響  
(品種:クリスマスホワイト) (培養2ヶ月)

BA (mg/ℓ)	NAA (mg/ℓ)	カルス形成 <sup>z</sup>	シュート形成率 <sup>y</sup> %	シュート数 <sup>x</sup>	発根率 <sup>w</sup> %
0	0	++	55 (11/20)	1.6	10 (2/20)
0	0.1	++	10 (2/20)	2.0	80 (16/20)
0	1.0	+++	5 (1/20)	1.0	100 (20/20)
0	10.0	+++	15 (3/20)	1.3	100 (20/20)
-----					
0.1	0	++	95 (19/20)	2.5	10 (2/20)
0.1	0.1	+++	40 (8/20)	1.3	70 (14/20)
0.1	1.0	+++	5 (1/20)	1.0	100 (20/20)
0.1	10.0	++++	10 (2/20)	1.0	50 (10/20)
-----					
1.0	0	++	55 (11/20)	2.7	10 (2/20)
1.0	0.1	+++	10 (2/20)	1.0	30 (6/20)
1.0	1.0	+++	0 (0/20)	0	10 (2/20)
1.0	10.0	++++	0 (0/20)	0	20 (4/20)

z : カルス形成=直径 ++0.5~1.0cm +++1.0~1.5cm ++++1.5~2.0cm  
y : シュート形成率=シュート形成した葉片数/置床した葉片数×100  
x : シュート数=1処理区内(20片)のシュート数合計/シュート形成した葉片数  
w : 発根率=発根した葉片数/置床した葉片数×100

第3-4表 葉片からの器官形成に及ぼすBAおよびNAAの影響  
(品種:ヒグミーホワイト) (培養6週間)

BA (mg/ℓ)	NAA (mg/ℓ)	カルス形成 <sup>z</sup>	シュート形成率 <sup>y</sup> %	シュート数 <sup>x</sup>	発根率 <sup>w</sup> %
0	0	+	0 (0/10)	0	0 (0/10)
0	0.1	++++	0 (0/10)	0	100 (10/10)
0	1.0	++++	0 (0/10)	0	80 (8/10)
-----					
0.1	0	++	0 (0/10)	0	0 (0/10)
0.1	0.1	+++	0 (0/10)	0	0 (0/10)
0.1	1.0	+++	0 (0/10)	0	20 (2/10)
-----					
1.0	0	++	30 (3/10)	5.7	0 (0/10)
1.0	0.1	+++	0 (0/10)	0	0 (0/10)
1.0	1.0	+++	0 (0/10)	0	0 (0/10)

z : カルス形成=直径 +0.1~0.5cm ++0.5~0.8cm +++0.8~1.0cm ++++1.0~1.5cm  
y, x, w : 第3-3表参照

## 2. 培地中のチッ素形態の影響

### 1) 無機態チッ素 ( $\text{NH}_4^+\text{-N}$ および $\text{NO}_3^-\text{-N}$ ) の影響 (第3-5表)

すべての培地で葉片の肥大現象が認められた。‘雪まつり’は100%、‘銀潮’は75~100%と高いカルス形成率を示した。カルスは球状の堅いカルスであった。シュートはこれらのカルスから形成され、‘雪まつり’(80~100%)が、‘銀潮’(50~80%)よりも高いシュート形成率を示した。‘銀潮’の場合、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ のみの①の培地で80%と最も高いシュート形成率を示し、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ を添加した②、③および④の培地では、シュート形成率が低下した。このことは、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ の添加がシュート形成に対して抑制的に働く傾向を示していた。‘雪まつり’の場合では低濃度の $\text{NH}_4^+\text{-N}$ の添加は葉片当りのシュート数の増加に対して促進的に働く傾向を示し、品種間で $\text{NH}_4^+\text{-N}$ に対する反応に差が認められた。形成されたシュートは、すべて水浸状を示し、発根は全く認められなかった。

### 2) 有機態チッ素 (アミノ酸) の影響 (第3-6表)

カルス形成はプロリンおよびアスパラギン酸添加区でみられ(100%)、黄色の柔らかいカルスであった。30mMグルタミン添加区では外植体は褐変枯死し、グルタミン酸およびメチオニン添加区では白変枯死した。

シュートの形成は両品種において、アミノ酸無添加区で10~20%形成されたのみで、アミノ酸添加区では認められなかった。

第3-5表 葉片からの器官形成に及ぼす無機態チッ素の影響  
(培養12週間)

品種	$\text{NH}_4^+ : \text{NO}_3^-$	カルス形成率 <sup>z</sup>	シュート形成率 <sup>y</sup>	シュート数 <sup>x</sup>
銀潮	① 0 : 1	100 (10/10)	80 (8/10)	3.5
	② 1 : 10	75 (6/8)	50 (4/8)	2.8
	③ 1 : 5	100 (8/8)	50 (4/8)	2.8
	④ 1 : 2	90 (9/10)	50 (5/10)	2.5
雪まつり	① 0 : 1	100 (10/10)	100 (10/10)	4.5
	② 1 : 10	100 (10/10)	100 (10/10)	6.5
	③ 1 : 5	100 (10/10)	100 (10/10)	6.3
	④ 1 : 2	100 (10/10)	80 (8/10)	5.0

z : カルス形成率 = カルスを形成した葉片数 / 置床した葉片数 × 100

y : シュート形成率 = シュートを形成した葉片数 / 置床した葉片数 × 100

x : シュート数 = 1処理区 (10片) のシュート数合計 / シュート形成した葉片数

第3-6表 葉片からの器官形成に及ぼす有機態チッ素（アミノ酸）の影響  
（培養2ヶ月）

品種	アミノ酸	カルス形成 <sup>z</sup>	カルス形成率 <sup>y</sup> %	シュート形成率 <sup>x</sup> %	シュート数 <sup>w</sup>	褐変枯死率 <sup>v</sup> %
クリスマス スノー-A	無添加	+	50 (5/10)	20 (2/10)	1	0
	グルタミン (10mM)	-	0	0	0	0
	グルタミン (30mM)	-	0	0	0	100 (10/0)
	グルタミン酸 (30mM)	-	0	0	0	100 (10/0)
	アスパラギン酸 (30mM)	++	100 (10/10)	0	0	0
	プロリン (30mM)	+++	100 (10/10)	0	0	0
	メチオン (30mM)	-	0	0	0	100 (10/0)
銀潮	無添加	+	40 (4/10)	10 (1/10)	1	0
	グルタミン (10mM)	-	0	0	0	0
	グルタミン (30mM)	-	0	0	0	100 (10/0)
	グルタミン酸 (30mM)	-	0	0	0	100 (10/0)
	アスパラギン酸 (30mM)	++	100 (10/10)	0	0	0
	プロリン (30mM)	+++	100 (10/10)	0	0	0
	メチオン (30mM)	-	0	0	0	100 (10/0)

z : カルス形成=直径 +0.1cm~0.3cm ++0.3cm~0.5cm +++0.5cm~0.8cm

y : カルス形成率=カルスを形成した葉片数/置床した葉片数×100

x : シュート形成率=シュートを形成した葉片数/置床した葉片数×100

w : シュート数=1処理区内のシュート数合計/シュート形成した葉片数

v : 褐変枯死率=褐変枯死した葉片数/置床した葉片数×100

### 3. 外植体の葉齢の影響（第3-7表）

植物生長調節物質を添加しない区では、中位葉で切り口から白い球形のカルスが形成され、上、下位葉ではわずかにカルス化したのみで、やや褐変した。1.0mg/ℓ NAA添加区は、全ての葉位の葉片でカルス形成が見られ、カルスは半透明で柔らかかった。全処理区の中で最も生長が盛んで、最も大きなカルスを形成したのは中位葉であった。0.1mg/ℓ 2,4-D区では、すべての葉片においてNAA区の場合よりもやや小さい黄色のカルスを形成し、中、下位葉で良好であった。0.5mg/ℓ 2,4-D処理区では、葉片がすべて白変、枯死した。0.5mg/ℓ ゼアチン区では、中位葉と下位葉の葉片がわずかにカルス化し、上位葉は葉片自体が大きく肥大したのみであった。また、1.0mg/ℓ ゼアチン区は、0.5mg/ℓ 区同様、中位葉と下位葉の葉片がわずかにカルス化し、上位葉と中位葉は葉片自体が肥大したのみで、下位葉は黄変した。

シュート形成は生長調節物質無添加区およびオーキシン添加区では認められず、サイトカイニン（ゼアチン）添加区において中位葉および下位葉の葉片の切り口から認められた（25%）。しかしながらいずれも水浸状のシュートであった。また、根の形成は、生長調節物質無添加区および1.0mg/ℓ NAA添加区で認められ、特にNAA添加区の上位および下位葉では綿状の細根が外植体全体を被っていた。

## 第2節 子葉培養と器官分化

### 材料および方法

#### 1. 子葉片からの器官分化

##### 1) 植物生長調節物質（BAおよびNAA）の影響

BM培地に播種後10日目の‘クリスマスホワイト’の、実生の子葉を用いた。培

第3-7表 葉片からの器官形成に及ぼす葉齢の影響  
（品種：クリスマスホワイト）（培養7週間）

生長調節物質 (mg/ℓ)	葉位	カルス形成 <sup>z</sup>	シュート形成率 <sup>y</sup>	シュート数 <sup>x</sup>	発根 <sup>w</sup>
無添加	上位葉	+	0	0	+
	中位葉	++	0	0	-
	下位葉	+	0	0	+
NAA (1.0)	上位葉	++	0	0	++
	中位葉	+++	0	0	+
	下位葉	++	0	0	++
2,4-D (0.1)	上位葉	++	0	0	-
	中位葉	+++	0	0	-
	下位葉	+++	0	0	-
ゼアチン (0.5)	上位葉	-	0	0	-
	中位葉	+	25 (1/4)	1	-
	下位葉	+	0	0	-
ゼアチン (1.0)	上位葉	-	0	0	-
	中位葉	+	25 (1/4)	1	-
	下位葉	+	25 (1/4)	1	-

z : カルス形成 = - 形成せず 直径 +0.1~0.5cm ++0.5~1.0cm  
+++1.0~1.5cm

y : シュート形成率 = シュート形成した葉片数 / 置床した葉片 × 100

x : 1処理区内 (4片) のシュート数合計 / シュート形成した葉片数

w : 発根 = - 形成せず + わずか ++ ほとんどのカルスで形成

地はBM培地に0、0.1および1.0mg/ℓ BAと0、0.1、1.0 および10.0mg/ℓ NAAをそれぞれ組み合わせ添加した12処理区を設けた。1試験管に子葉切片1枚ずつ置床し、1区当り試験管10本とした。

## 2) 培地濃度の影響

‘ヒグミーホワイト’ および ‘先勝の雪’ の無菌播種後2週間目の実生の子葉切片を供試した。培地としてBM培地およびBM培地の無機塩類のみ2倍にした培地（2BM培地）を用い、これに0、0.1および1.0mg/ℓ NAAをそれぞれ組み合わせ添加した6処理区を設けた。なお、各区ともゼアチン0.1mg/ℓ を添加した。培地は、50mℓ の三角フラスコに15mℓ ずつ分注し、フラスコ当り5片ずつ置床した。

## 2 子葉由来カルスからの器官分化

### 1) カルスの誘導

‘ハイランドホワイト’ および ‘リトルゼムイエロー’ の、BM培地上で無菌発芽した実生の子葉切片を、BM培地に0、0.1、1.0および10.0mg/ℓ NAA、または0、0.1、1.0および10.0mg/ℓ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D, 東京化成工業) をそれぞれ添加した7処理区に置床した（一次培地）。培地は試験管に10mℓ ずつ分注し、2等分した子葉片を1試験管に5片ずつ置床した。

### 2) カルスの増殖

実験2-1)で得られた、培養約1ヶ月後のカルスを直径約3mmに分割し、フラスコ当り10片ずつ置床し、BM液体培地（二次培地）に移植し、振とう培養（60回/分）を行った。

### 3) カルスからのシュート形成

実験2-2)の振とう培養で増殖させた培養3週間後のカルスを直径約5mmに分割し、BM培地に1.0mg/ℓ BAまたは0.1mg/ℓ ゼアチンを添加した培地（三次培地）に移植した。培養6週間後に同組成の培地に継代し12週間培養した。

### 4) シュートの移植

カルスから分化したシュートを順次移植した。培地はBM培地のゲルライト濃度を0.3%に改変したのものを用い、試験管に10mℓ ずつ分注し、1試験管に1シュート置床し、通気性の高いミリラップフィルム（日本ミリポア・リミテッド）を用いて栓をした。



## 5) シュートからの発根

発根が認められなかった水浸状シュートをBM培地(0.3%ゲルライト)に1.0 mg/ℓ IBA ( $\beta$ -Indolebutyric acid, 東京化成工業)を添加した培地に移植した。

### 結果

#### 1. 子葉片からの器官分化

##### 1) 植物生長調節物質(BAおよびNAA)の影響(第3-8表)

カルス形成は10mg/ℓ NAA区で最も盛んで、半透明の柔らかいカルスを形成した。カルスの性状は生長調節物質濃度の組み合わせによって異なる傾向を示した。シュート形成は、1.0mg/ℓ BA添加区で30%の形成率を示し、1~10mg/ℓの高濃度のNAAの添加はシュート形成を抑制する傾向を示した。

第3-8表 子葉片からの器官形成に及ぼすBAおよびNAAの影響  
(品種:クリスマスホワイト) (培養7週間)

BA (mg/ℓ)	NAA (mg/ℓ)	カルス形成 <sup>z</sup>	シュート形成率 <sup>y</sup> %	シュート数 <sup>x</sup>	発根率 <sup>w</sup> %
0	0	+	0	0	30 (3/10)
0	0.1	++	10 (1/10)	1.0	100 (10/10)
0	1.0	+++	0	0	80 (8/10)
0	10.0	+++	0	0	0
0.1	0	+	10 (1/10)	1.0	0
0.1	0.1	++	10 (1/10)	1.0	90 (9/10)
0.1	1.0	+++	0	0	70 (7/10)
0.1	10.0	++++	0	0	0
1.0	0	+	30 (3/10)	1.3	0
1.0	0.1	++	10 (1/10)	0	10 (1/10)
1.0	1.0	+++	0	0	0
1.0	10.0	+++	0	0	0

z : カルス形成 = 直径 +0.1~0.3cm ++0.3~0.6cm +++0.6~0.9cm  
++++0.9cm~1.2cm

y : シュート形成率 = シュート形成した子葉数 / 置床した子葉数 × 100

x : シュート数 = 1処理区内(10片)のシュート数合計 / シュート形成した子葉数

w : 発根率 = 発根した葉片数 / 置床した葉片数 × 100

## 2) 培地濃度の影響 (第3-9表)

‘先勝の雪’では、カルス形成は認められず、シュート形成は2BM培地において子葉片から直接形成された。一方‘ヒグミーホワイト’ではカルスおよび根の形成が見られたが、シュート形成はいずれの区においても見られなかった。また発根は2BMよりBM培地で良好で、0.1~1.0mg/ℓ NAA区で80~100%の発根率を示し、5~10mm程の根を多数形成した。このようにカルス形成、シュート形成および根の形成にたいする反応が品種間で異なっていた。

## 2. 子葉由来カルスからの器官分化

### 1) カルスの誘導 (第3-10表、第3-1図)

供試した各品種とも、全処理区においてカルス形成が見られた。カルスの生長はNAA添加区で良好であり、2,4-Dは高濃度になるにつれてカルス形成を抑制した。カルスの性状は、無添加およびNAA添加区では、半透明の柔らかいカルスであった。一方2,4-D添加区では淡黄色カルスであった。また、NAA添加区ではカルスを包むように綿状の細根が多数見られた。

第3-9表 子葉片からの器官形成に及ぼすNAAおよび培地濃度の影響  
(培養6週間)

品種	培地濃度	2,4-D (mg/ℓ)	NAA (mg/ℓ)	カルス形成* %	カルス形成率 <sup>y</sup> %	シュート形成率 <sup>x</sup> %	シュート数 <sup>w</sup>	発根率 <sup>v</sup> %
先勝の雪	BM	0.1	0	-	0	0	0	0
		0.1	0.1	-	0	0	0	20 (1/5)
		0.1	1.0	-	0	0	0	0
	2BM <sup>u</sup>	0.1	0	-	0	20 (1/5)	1	0
		0.1	0.1	-	0	20 (1/5)	1	0
		0.1	1.0	-	0	40 (2/5)	1	0
ヒグミー ホワイト	BM	0.1	0	+	20 (1/5)	0	0	40 (2/5)
		0.1	0.1	-	0	0	0	80 (4/5)
		0.1	1.0	+	40 (2/5)	0	0	100 (5/5)
	2BM	0.1	0	+	40 (2/5)	0	0	40 (2/5)
		0.1	0.1	+	40 (2/5)	0	0	40 (2/5)
		0.1	1.0	-	0	0	0	0

z : カルス形成 = - 形成せず + 直径 0.1~0.3cm

y : カルス形成率 = カルス形成した子葉数 / 置床した子葉数 × 100

x : シュート形成率 = シュート形成した子葉数 / 置床した子葉数 × 100

w : シュート数 = 1処理区内 (5片) のシュート数合計 / シュート形成した子葉数

v : 発根率 = 発根した子葉数 / 置床した子葉数 × 100

u : BM培地の無機塩類のみ2倍にした培地

第3-10表 子葉片からのカルス形成に及ぼすNAAおよび2, 4-Dの影響  
(培養4週間)

品種	培地 (mg/l)	カルス形成 <sup>z</sup>	発根率 <sup>y</sup>	
ハイランド ホワイト	無添加	++	100	
	NAA	0.1	* <sup>x</sup>	*
		1.0	++++	100
		10.0	+++++	100
	2, 4-D	0.1	++++	0
		1.0	+++	0
10.0		+	0	
雪まつり	無添加	++++	100	
	NAA	0.1	++++	100
		1.0	+++	100
		10.0	++++	100
	2, 4-D	0.1	++++	0
		1.0	+++	0
10.0		+	0	
リトルセム イエロー	無添加	+++	100	
	NAA	0.1	+++++	100
		1.0	++++	100
		10.0	++++	100
	2, 4-D	0.1	+++	0
		1.0	+++	0
10.0		+	0	

z : カルス形成 = - 形成せず 直径 +0.1cm~0.25cm ++0.25cm~0.5cm

+++0.5cm~0.75cm ++++0.75cm~1.0cm +++++ 1.0cm以上

y : 発根率 = 発根した外植体数 / 置床した外植体数 × 100

x : 汚染のため調査不可能

## 2) カルスの増殖 (第3-11表、第3-2図)

供試した両品種とも、一次培地において生長調節物質無添加区および0.1mg/l NAA区で誘導されたカルスを用いた場合、二次培地において球形の緑色の堅いカルス (第3-2図-C)、および淡白色の柔らかいカルス (第3-2図-A) に、また、一次培地において2, 4-D添加区で誘導されたカルスは、振とう培養によって、1~

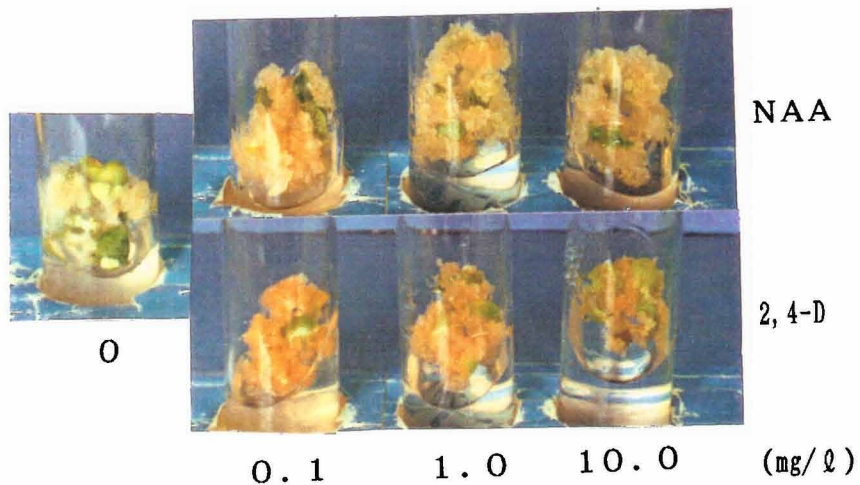
‘ハイランドホワイト’



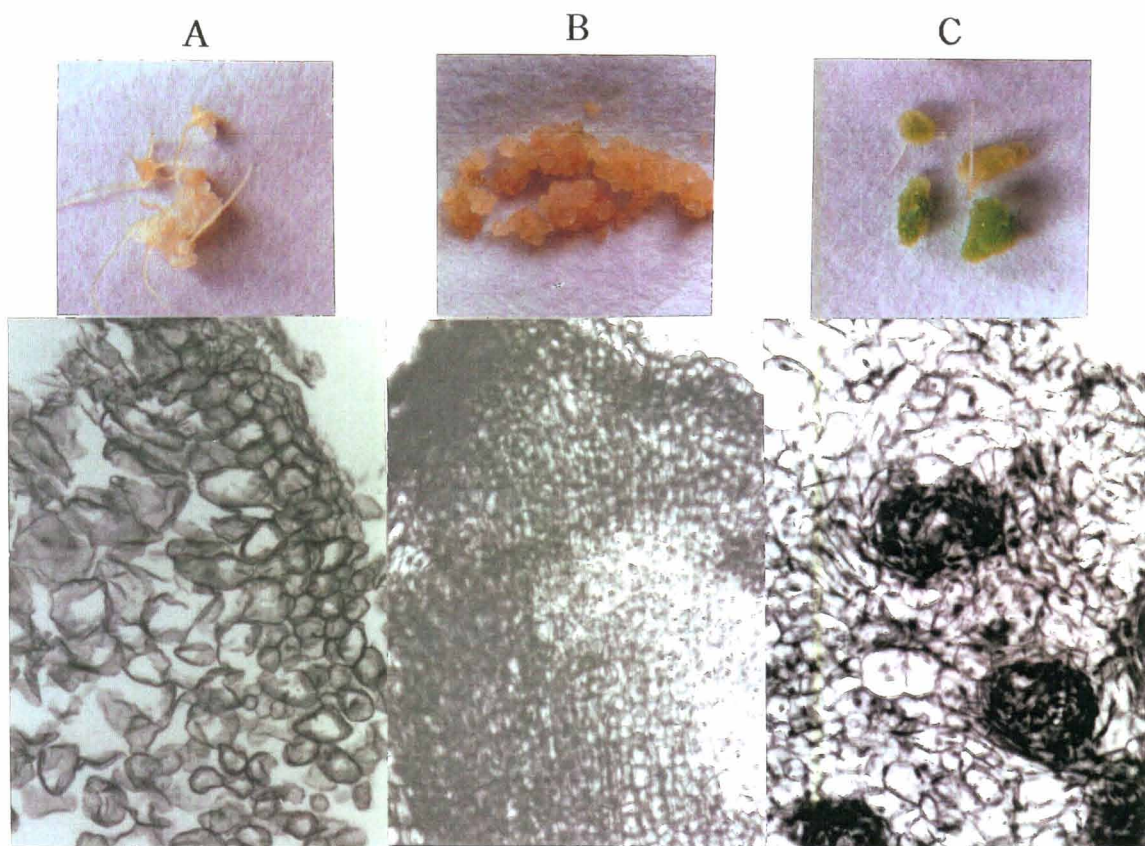
‘雪まつり’



‘リトルゼムイエロー’

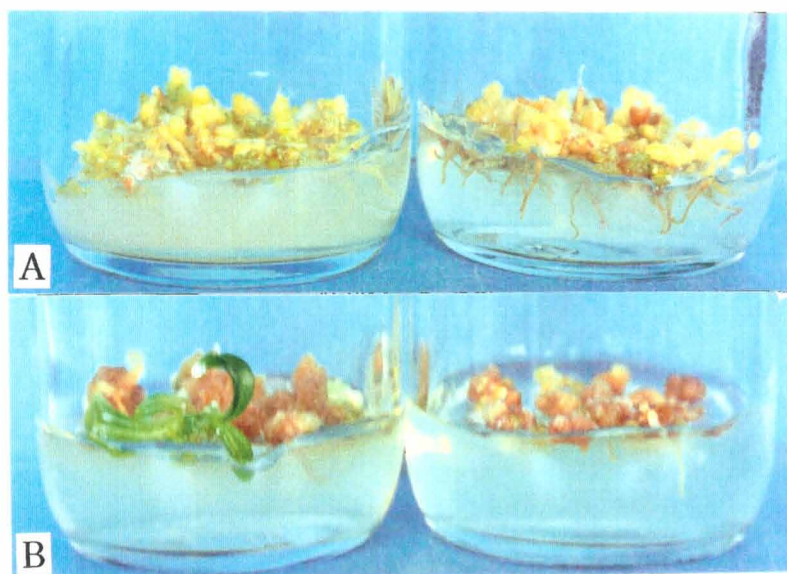


第3-1図 子葉からのカルス形成に及ぼすNAAおよび2,4-Dの影響  
(培養4週間)



第3-2図 子葉由来カルスとその組織縦断切片

A : 白くてもろいカルス B : 黄色の粒状カルス C : 緑色の堅いカルス



第3-3図 子葉由来カルスからのグリーンスポットの形成  
およびグリーンスポットからのシュート形成

左 : 1mg/L BA添加 右 : 0.1mg/L ゼアチン添加  
A : グリーンスポットの形成 B : シュート形成



第3-4図 グリーンスポットの  
縦断切片

3mmの粒状のカルスに分散し増殖した（第3-2図-B）。根の形成は、無添加区およびNAA添加区でみられ、1cm程度の根がカルスから1～数本形成された。2,4-D添加区では発根は見られなかった。

### 3) カルスからのシュート形成（第3-12表、第3-3図）

シュートの形成は三次培地にBAを添加した区で認められ、‘雪まつり’は一次培地が0.1mg/ℓ NAA区で90%、‘リトルゼムイエロー’では1.0mg/ℓ NAA区で10%認められた。得られたシュートはすべて水浸状を呈していた。

### 4) シュートの移植

‘リトルゼムイエロー’のシュートは奇形化し、その後褐変枯死した。また‘雪まつり’のシュートは新しい葉が形成されるが、節間伸長がみられずロゼッ

第3-11表 液体培地（二次培地）における子葉由来カルスの増殖（培養6週間）

品種	カルス誘導培地 <sup>z</sup> (mg/ℓ)		カルスの状態 <sup>y</sup>	発根率 <sup>x</sup>	
雪まつり	無添加		C+F	100	
	NAA	0.1	C+F	100	
		1.0	F	100	
		10.0	F	100	
	2,4-D	0.1	* <sup>w</sup>	*	
		1.0	E	0	
		10.0	E	0	
	リトルゼム イエロー	無添加		C+F	100
		NAA	0.1	*	*
1.0			F	100	
10.0			F	100	
2,4-D		0.1	E	*	
		1.0	*	*	
		10.0	E	0	

z : 子葉片培養の一次培地

y : カルスの状態 F=柔らかいカルス C=堅いカルス E=粒状カルス

x : 発根率 = 発根した移植片 / 置床した移植片 × 100

w : 汚染のため調査不可能

第3-12表 子葉由来カルスからのシュート形成に及ぼすBAおよびゼアチンの影響  
(品種：雪まつり)

カルス誘導培地 (mg/l)	三次培地 (mg/l)	カルスの 形成 <sup>z</sup>	グリーン スポット <sup>y</sup>	シュート形成率 <sup>x</sup> %	シュート数 <sup>w</sup>
無添加	BA 1.0 ゼアチン 0.1	+++ ++++	++ ++	0 0	0 0
NAA 0.1	BA 1.0 ゼアチン 0.1	++ +++	- +	90 (9/10) 0	28 0
NAA 1.0	BA 1.0 ゼアチン 0.1	+++ ++++	++ +	0 0	0 0
NAA 10.0	BA 1.0 ゼアチン 0.1	++++ ++++	- -	0 0	0 0
2,4-D 0.1	BA 1.0 ゼアチン 0.1	++++ ++++	- -	0 0	0 0
2,4-D 1.0	BA 1.0 ゼアチン 0.1	+ +	- -	0 0	0 0

(品種：リトルゼアマイロー)

カルス誘導培地 (mg/l)	三次培地 (mg/l)	カルス 形成 <sup>z</sup>	グリーン スポット <sup>y</sup>	シュート形成率 <sup>x</sup> %	シュート数 <sup>w</sup>
無添加	BA 1.0 ゼアチン 0.1	++++ +++	+++ +++	0 0	0 0
NAA 1.0	BA 1.0 ゼアチン 0.1	+++ ++++	++ +	10 (1/10) 0	2 0
NAA 10.0	BA 1.0 ゼアチン 0.1	+++ +++	+++ ++	0 0	0 0
2,4-D 0.1	BA 1.0 ゼアチン 0.1	++++ ++++	+ -	0 0	0 0
2,4-D 10.0	BA 1.0 ゼアチン 0.1	++++ ++++	- -	0 0	0 0

z : カルス形成 = 直径 +0.1~0.25cm ++0.25~0.5cm +++0.5~0.75cm  
++++7.5~1.0cm +++++1.0cm以上  
y : グリーンスポット数 = - なし +1~10個 ++11~20個 +++21個以上  
x : シュート形成率 = シュート形成したカルス数 / 置床したカルス数 × 100  
w : シュート数 = 1処理区内シュート数合計

第3-13表 子葉カルス由来のシュートからの幼植物再生  
(培養4週間)

品種	幼植物体再生率 <sup>z</sup> %	( 正常 %	水浸状 % )
雪まつり	36.8 (7/19)	( 57.1 (4/7)	42.9 (3/7) )

$z$  : 幼植物体再生率 = 発根したシュート数 / 置床したシュート数  $\times$  100  
発根の見られなかったシュートはすべて水浸状を呈していた。

ト状を示した。しかしながら水浸状から回復するシュートもみられ、回復したシュートの中には節間伸長するものもみられた。発根は、回復個体および水浸状化個体の両方で認められた。幼植物体再生率（発根したシュート数/置床したシュート数）は23.1%（6/26）であった。

#### 5) シュートからの発根（第3-13表）

2-4)で発根が見られなかったシュートを、1mg/ℓ IBA添加培地で培養したところ、36.8%（7/19）の発根が観察され、根はシュート基部に形成されたカルスより発生した。発根した個体のなかで水浸状化から回復した正常個体は57%（4/7）で、残りは水浸状を呈したままであった。

### 第3節 下胚軸培養と器官分化

#### 材料および方法

#### 1. 下胚軸切片からの器官分化

##### 1) 植物生長調節物質（BAおよびNAA）の影響

無菌播種して得られた播種後2週間目の‘雪まつり’の実生の上部と下部をそれぞれ約3mm取り除いた後、約3mmの切片を調製した。供試培地として、BM培地に0、0.1および1.0mg/ℓ BAおよび0、0.1および1.0mg/ℓ NAAをそれぞれ組み合わせて添加した9処理区を設けた。試験管当り2切片ずつ置床し、1処理区当り試験管10本とした。



## 2) 培地濃度の影響

‘ヒグミーホワイト’の無菌播種して得られた実生の下胚軸切片を用いた。外植体の調製は1-1)に準じた。供試培地として0.1mg/ℓゼアチン添加のBM培地および2BM培地(MS無機塩濃度のみ2倍)に、0、0.1および1.0mg/ℓNAAをそれぞれ組み合わせ添加した6処理区を設けた。

## 3) 抗オーキシンの影響

‘雪まつり’および‘紫鵬’の播種後2週間目の下胚軸切片(約5mm)を用いた。培地は①BM培地およびBM培地に②0.1mg/ℓ7-aza indole (AZI, nacalai tesque)、③0.1mg/ℓ2,3,5-トリヨード安息香酸(TIBA, 片山化学工業)、④0.5mg/ℓゼアチン、⑤0.5mg/ℓゼアチン+0.1mg/ℓAZI、⑥0.5mg/ℓゼアチン+0.1mg/ℓTIBAを添加した6処理区設けた。

## 4) 培地中のチッ素形態の影響

### (1) 無機態チッ素 ( $\text{NH}_4^+$ および $\text{NO}_3^-$ )の影響

‘リトルゼムイエロー’および‘雪まつり’の実生の下胚軸を用いた。なお、発芽処理中‘リトルゼムイエロー’は無遮光、‘雪まつり’は黒寒冷紗1枚(50%遮光)で培養器を被い遮光処理を施した。供試培地は、第3-2表に示した4種類のチッ素改変培地を用い、品種と組み合わせ計8処理区とした。1区当り試験管10本とした。

### (2) 有機態チッ素(アミノ酸)の影響

‘ハイランドホワイト’、‘雪まつり’および‘リトルゼムホワイト’を用い、播種後2週間目の下胚軸を用いた。培地としてBM培地(アミノ酸無添加区)およびBM培地から $\text{NH}_4\text{NO}_3$ および $\text{KNO}_3$ を除きプロリン、グルタミン、グルタミン酸およびアスパラギン酸をそれぞれ30mM添加した5処理区を設けた。1処理区当り試験管10本とした。

## 2. 下胚軸由来カルスからの器官分化

### 1) カルス形成に及ぼすNAAおよび2,4-Dの影響

‘ハイランドホワイト’、‘雪まつり’および‘リトルゼムイエロー’の無菌播種後8日目の実生の5mmに切断した下胚軸切片を外植体として用いた。培地はBM培地に0、0.1、1.0、10mg/ℓNAAおよび0.1、1.0、10mg/ℓ2,4-Dをそれぞれ添

加した7処理区を設けた。

## 2) カルスの増殖

‘ハイランドホワイト’、‘雪まつり’および‘リトルゼムイエロー’の実験2-1)で得られた培養約1ヶ月目のカルスを直径5mm程度に分割して用いた。培地はBM培地に0、0.1mg/ℓ BAおよび0、0.1mg/ℓ NAAをそれぞれを組み合わせ添加した4処理区を設けた。培養は20℃、ツイン蛍光灯6,000 lx、連続照明下で行った。

## 3) カルスからのシュート形成

### (1) BAおよびNAAの影響

‘先勝の雪’、‘雪まつり’、‘ピグミーホワイト’および‘紫鵬’の播種後4週間目の下胚軸の切片(1cm)を、BM培地に1.0mg/ℓ BA+3.0mg/ℓ NAAを添加した培地上で1週間培養しカルスを誘導させ、このカルスの白く透明な部分を3mm大に切断して外植体として用いた。カルス培養の培地は、BM培地に0、0.1、1.0mg/ℓ BAおよび0、0.1、1.0mg/ℓ NAAをそれぞれ組み合わせて添加した9処理区を設けた(一次培養)。また培養器栓として2重のアルミフویلおよびミリラップ(通気性膜,日本ミリポアリミテッド)の2種類を使用した。

### (2) BAおよびゼアチンの影響

‘ハイランドホワイト’、‘雪まつり’および‘リトルゼムイエロー’の実験2-2)の増殖培地で増殖した培養3週間後の直径約5mmに分割したカルスを用いた。培地としてBM培地に1.0mg/ℓ BAまたは0.1mg/ℓ ゼアチンをそれぞれ添加したものをを用いた。培養後6週間目に移植し12週間培養した。

### (3) 品種間差異

実験3)-(1)で一次培養を6週間行った後、‘先勝の雪’では1mg/ℓ NAA区、0.1mg/ℓ BA区および1mg/ℓ BA+0.1mg/ℓ NAA区で、また‘雪まつり’および‘ピグミーホワイト’では1mg/ℓ BA区で形成された8~10mm大のカルスを、シュート発生が多数観察された1.0mg/ℓ BAおよび1.0mg/ℓ BA+0.1mg/ℓ NAA添加培地に移植した(二次培養)。

### (4) ポリアミン類(プトレスシンおよびスベルミジン)の影響

‘先勝の雪’および‘ピグミーホワイト’の下胚軸片から0.1mg/ℓ BA+1.0mg/ℓ NAA添加培地上でカルス誘導した後、0.1mg/ℓ NAA+1.0mg/ℓ BA添加培地に移植

し、6週間経過したカルスを約5mm大に切断して用いた。培地はBM培地、およびBM培地にPutrescine Dihydrochloride (プトレスシン, 半井化学薬品) およびSpermidine (スベルミジン, nacalai tesque) をそれぞれ 0.005、0.05および0.5mM添加した7処理区を設けた。なお全処理区に1.0mg/ℓ BAを添加した。

#### 4) シュートの移植

カルス由来のシュート (水浸状) をBM培地に移植したところほとんど発根が見られなかったため、さらに1.0mg/ℓ IBAを添加したBM培地 (ゲルライト0.3%) に移植した。シュートは試験管当り1本ずつ移植し、培養器栓としてミリラップを用いた。

## 結果

### 1. 下胚軸切片からの器官分化

#### 1) 植物生長調節物質 (BAおよびNAA) の影響 (第3-14表)

良好なカルス形成はNAA存在下で、BA無添加または低濃度 (0.1mg/ℓ) 添加区において認められ、高濃度の1mg/ℓ BAはカルス形成を抑制する傾向を示した。NAA濃度によりカルスの性状が異なり、0.1mg/ℓ NAA添加区ではカルス全体が根毛で覆われ、1.0mg/ℓ NAA添加区では白色の半透明で柔らかいカルスであった。また、0.1mg/ℓ BA単用区は下胚軸の切り口に緑色の2mm大の堅い球状カルスを形成し、その部位からシュートの形成が見られた (10%) が、水浸状を呈していた。

#### 2) 培地濃度の影響 (第3-15表)

カルス形成は全ての処理区でみられ、NAA添加により生長が促進された。シュート形成は両培地ともゼアチン単用区 (NAA無添加区) において認められた。シュートおよび根の形成率はBM培地が2BM培地よりやや高い値を示したが、大きな差異はなかった。

#### 3) 抗オーキシンの影響 (第3-16表)

カルス形成はAZIを添加により抑制される傾向を示した。シュート形成、根の形成ともAZIによる促進効果は見られなかった。TIBAでは、両品種ともカルス形成率は良好 (100%) であったが、カルスの生長は抑制された。またシュートおよび根の形成に対する促進効果は見られなかった。

第3-14表 下胚軸からの器官形成に及ぼすBAとNAAの影響  
(品種：雪まつり) (培養7週間)

BA (mg/l)	NAA (mg/l)	カルス形成 <sup>z</sup> %	カルス形成率 <sup>y</sup> %	シュート形成率 <sup>x</sup> %	シュート数 <sup>w</sup>	発根率 <sup>v</sup> %
0	0	-	0 (0/20)	0	0	0
0	0.1	+++	100 (20/20)	0	0	100 (20/20)
0	1.0	+++	100 (20/20)	0	0	100 (20/20)
-----						
0.1	0	+	30 (6/20)	10 (2/20)	1	0
0.1	0.1	++	100 (20/20)	0	0	0
0.1	1.0	+++	100 (20/20)	0	0	50 (10/20)
-----						
1.0	0	-	0 (0/20)	0	0	0
1.0	0.1	+	30 (6/20)	0	0	0
1.0	1.0	++	30 (6/20)	0	0	0

z : カルス形成 = - 形成せず 直径 +0.1cm~0.3cm ++0.3cm~0.5cm +++0.6cm~1.0cm  
y : カルス形成率 = カルス形成した下胚軸数 / 置床した下胚軸数 × 100  
x : シュート形成率 = シュート形成した下胚軸数 / 置床した下胚軸数 × 100  
w : シュート数 = 1処理区内のシュート数合計 / シュート形成した下胚軸数  
v : 発根率 = 発根した下胚軸数 / 置床した下胚軸数 × 100

第3-15表 下胚軸からの器官形成に及ぼすNAAおよび培地濃度の影響  
(品種：ビクミホイト) (培養6週間)

培地濃度	ゼアチン (mg/l)	NAA (mg/l)	カルス形成 <sup>z</sup> %	カルス形成率 <sup>y</sup> %	シュート形成率 <sup>x</sup> %	シュート数 <sup>w</sup>	発根率 <sup>v</sup> %
BM	0.1	0	+	100 (5/5)	80 (4/5)	3.0	40 (2/5)
	0.1	0.1	+++	100 (5/5)	0	0	80 (4/5)
	0.1	1.0	+++	100 (5/5)	0	0	100 (5/5)
2BM	0.1	0	+	100 (5/5)	60 (3/5)	2.5	40 (2/5)
	0.1	0.1	++	100 (5/5)	0	0	100 (5/5)
	0.1	1.0	+++	100 (5/5)	0	0	60 (3/5)

z : カルス形成 = 直径 +0.1cm~0.3cm ++0.3cm~0.5cm +++0.5cm~0.8cm  
y, x, w, v : 第3-14表参照

第3-16表 下胚軸からの器官形成に及ぼす抗オーキシシン (AZI, TIBA) の影響  
(培養12週間)

品種	ゼアチン (mg/l)	AZI (mg/l)	TIBA (mg/l)	カルス形成 <sup>z</sup>	カルス形成率 <sup>y</sup> %	シュート形成率 <sup>x</sup> %	シュート数 <sup>w</sup>	発根率 <sup>v</sup> %
紫鵬	0	0	0	+++	90 (9/10)	0	0	0
	0	0.1	0	++	20 (2/10)	0	0	0
	0	0	0.1	+	100 (10/10)	0	0	0
	0.5	0	0	+	50 (5/10)	10 (1/10)	2	10 (1/10)
	0.5	0.1	0	+	40 (4/10)	0	0	0
	0.5	0	0.1	白変枯死	-	-	-	-
雪まつり	0	0	0	+++	100 (10/10)	0	0	0
	0	0.1	0	+	50 (5/10)	0	0	0
	0	0	0.1	++	100 (10/10)	0	0	20 (2/10)
	0.5	0	0	++	40 (4/10)	20 (2/10)	1	0
	0.5	0.1	0	+	30 (3/10)	0	0	0
	0.5	0	0.1	白変枯死	-	-	-	-

z : カルス形成 +~0.1cm ++0.1~0.3cm +++0.3cm~0.5cm  
y, x, w, v : 第3-14表参照

#### 4) 培地中のチッ素形態の影響

##### (1) 無機チッ素形態 (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>およびNO<sub>3</sub><sup>-</sup>) の影響 (第3-17表)

①~④のいずれの培地においても‘リトルゼムイエロー’、‘雪まつり’とも80~100%と高いカルス形成率を示し、形成されたカルスは、緑色の球状カルスであった。シュートは球状カルスから形成された。‘リトルゼムイエロー’の場合、②の培地 (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>:NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 1:10) でシュート形成率が85%と最も高く、1切片当たりのシュート数も最も多く、チッ素比④の培地 (1/2MS培地と同じ組成) で、最も低いシュート形成率 (45%) を示した。一方、‘雪まつり’では、④の培地で85%ともっとも高いシュート形成率を示し、品種によって好適なチッ素組成に違いがみられた。形成されたシュートのほとんどは水浸状であった。

##### (2) 有機態チッ素 (アミノ酸) の影響 (第3-18表)

カルス形成は全処理区において見られたが、カルスの生長が良好であったのは、各品種ともグルタミン添加区で、次いでアスパラギン酸添加区が良好であった。無添加区 (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>+KNO<sub>3</sub>) では球状の堅いカルスを形成したのに対し、アミノ酸添加区では透明または淡黄色の柔らかなカルスを形成した。しかし、培養6週

間のうちにアミノ酸添加区のカルスはほとんど褐変した。またアミノ酸添加によるシュート形成の促進効果は認められなかった。

第3-17表 下胚軸からの器官形成に及ぼす無機態チッ素形態の影響  
(培養12週間)

品種	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> : NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	カルス形成率 <sup>z</sup> %	シュート形成率 <sup>y</sup> %	シュート数 <sup>x</sup>
リトルゼム イエロー	① 0 : 1	80 (16/20)	50 (10/20)	3.8
	② 1 : 10	95 (19/20)	85 (17/20)	8.2
	③ 1 : 5	90 (18/20)	55 (11/20)	7.5
	④ 1 : 2	85 (17/20)	45 (9/20)	4.0
雪まつり	① 0 : 1	85 (17/20)	15 (3/20)	2.7
	② 1 : 10	100 (20/20)	65 (13/20)	8.1
	③ 1 : 5	95 (19/20)	60 (12/20)	9.5
	④ 1 : 2	100 (20/20)	85 (17/20)	7.8

z : カルス形成率 = カルスを形成した下胚軸数 / 置床した下胚軸数 × 100  
y : シュート形成率 = シュートを形成した下胚軸数 / 置床した下胚軸数 × 100  
x : シュート数 = 1処理区 (20片) のシュート数合計 / シュート形成した下胚軸数

第3-18表 下胚軸からの器官形成に及ぼす有機態チッ素 (アミノ酸) の影響  
(培養6週間)

品種	アミノ酸	カルス形成 <sup>z</sup>	カルス形成率 <sup>y</sup>	褐変枯死率 <sup>x</sup>
ハイラント ホワイト	無添加	+	100 (10/10)	0 (0/10)
	グルタミン	+++	100 (10/10)	100 (10/10)
	グルタミン酸	++	100 (10/10)	100 (10/10)
	アスパラギン酸	++	100 (10/10)	50 (5/10)
	プロリン	+	100 (10/10)	70 (7/10)
雪まつり	無添加	+	100 (10/10)	0 (0/10)
	グルタミン	+++	100 (10/10)	50 (5/10)
	グルタミン酸	++	100 (10/10)	40 (4/10)
	アスパラギン酸	++	100 (10/10)	50 (5/10)
	プロリン	++	100 (10/10)	100 (10/10)
リトルゼム ホワイト	無添加	+	100 (10/10)	0 (0/10)
	グルタミン	+++	100 (10/10)	100 (10/10)
	グルタミン酸	++	100 (10/10)	40 (4/10)
	アスパラギン酸	+++	100 (10/10)	100 (10/10)
	プロリン	++	100 (10/10)	70 (7/10)

z : カルス形成 = 直径 +0.1cm~0.3cm ++0.3cm~0.5cm +++0.5cm~0.8cm  
y : カルス形成率 = カルスを形成した下胚軸数 / 置床した下胚軸数 × 100  
x : 褐変枯死率 = 褐変枯死した下胚軸数 / 置床した下胚軸数 × 100

## 2. 下胚軸由来カルスからの器官分化

### 1) カルス形成に及ぼすNAAおよび2,4-Dの影響 (第3-19表、第3-5図)

3品種とも全処理区でカルス形成が見られた。全品種を通して、カルスの大きさは、2,4-DよりもNAAの方が良好であり、NAA添加の場合は濃度に関係なく同程度であったが、2,4-D添加の場合は高濃度になるにつれて抑制された。カルスの形状は、無添加区と0.1mg/ℓ NAAのカルスは、部分的に淡緑色の堅いカルスを含む半透明の柔らかいカルスを、他のNAA添加区は部分的に褐変した半透明の柔らかいカルスを、また2,4-D添加区は黄色っぽい柔らかいカルスを形成した。発根はNAA添加区で多く見られ、カルス全体を包む綿のような根を形成した。品種間ではカルスの大きさおよび形状について顕著な差は認められなかった。発根率は‘リトルゼムイエロー’で2,4-D添加区(発根なし)を除いては大差がなかった。

### 2) カルスの増殖 (第3-20表)

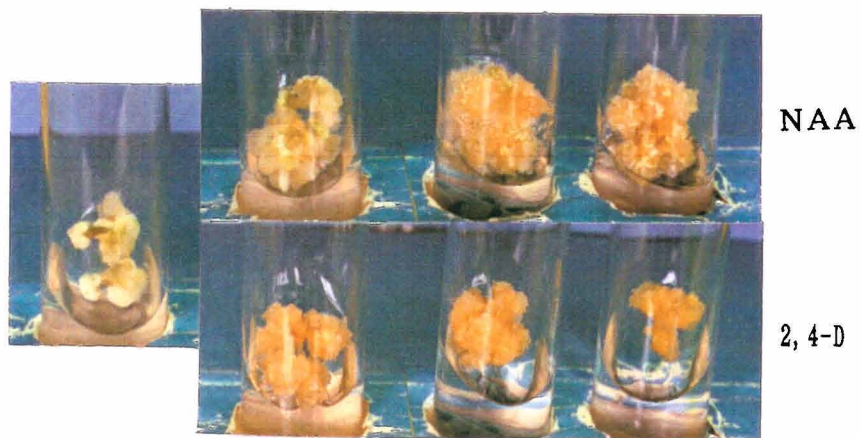
用いた3品種すべてにおいて、二次培地の種類とカルスの生長の間に、一定の傾向が認められなかった。しかし、一次培地にNAAまたは0.1mg/ℓ 2,4-D添加していた場合は生長が促進され、2,4-D 10mg/ℓ 添加していた場合には抑制された。カルスの形状は、3品種とも2,4-D 1.0および10.0mg/ℓ 添加区で黄色、粒状になり、他の区は一般に柔らかく半透明になる傾向が認められた。発根率は2,4-D添加区と比較して、NAA添加区で高くなり、品種間では‘ハイランドホワイト’が最も高かった。

### 3) カルスからのシュート形成

#### (1) BAおよびNAAの影響 (第3-21表)

カルス形成は、全品種ともBAの濃度に関わらず、NAAを0.1および1.0mg/ℓ 含む区で良好であった。シュート形成の見られたのは、‘先勝の雪’、‘ピグミーホワイト’、‘紫鵬’の3品種で、BA 1.0mg/ℓ 単用か、これに低濃度NAA (0.1mg/ℓ) を添加した場合であったが、形成率は低く10%であった。‘雪まつり’ではシュート形成はなかった。また、シュート形成は培養器栓により異なり、アルミフイルムよりミリラップフィルムでよい結果が得られた。発根率はBAの添加量が増すにつれて低下の傾向を示した。品種では‘紫鵬’が他の3品種に比べ

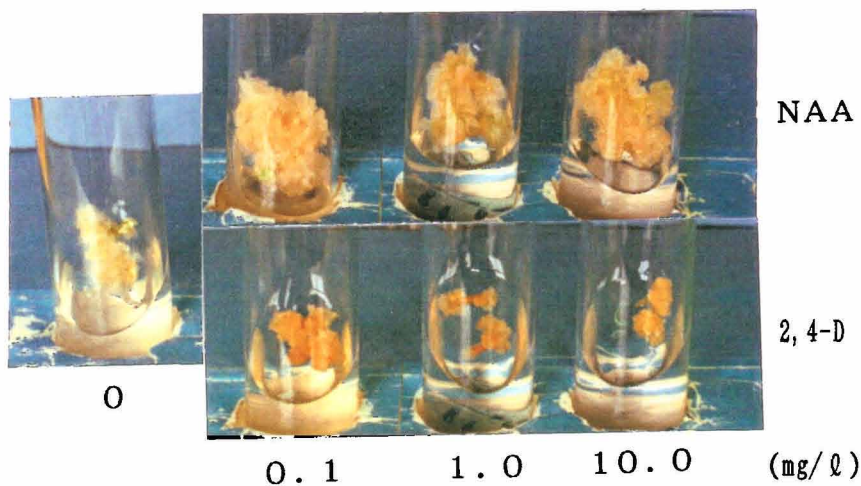
‘ハイランドホワイト’



‘雪まつり’



‘リトルゼムイエロー’



第3-5図 下胚軸からのカルス形成に及ぼすNAAおよび2,4-Dの影響  
(培養4週間)



第3-19表 下胚軸からのカルス形成に及ぼすNAAおよび2, 4-Dの影響 (培養4週間)

品種	培地組成 (mg/l)	カルス形成 <sup>z</sup>	発根率 <sup>y</sup> %	
ハイラント ホワイト	無添加	++	100	
	NAA	0.1	+++	100
		1.0	++++	100
		10.0	++++	100
	2, 4-D	0.1	++++	100
		1.0	+++	100
		10.0	++	0
雪まつり	無添加	++++	100	
	NAA	0.1	++++	100
		1.0	++++	100
		10.0	+++	100
	2, 4-D	0.1	++++	100
		1.0	+++	100
		10.0	++	0
リトルセム イエロー	無添加	+++	100	
	NAA	0.1	++++	100
		1.0	+++	100
		10.0	++++	100
	2, 4-D	0.1	+++	0
		1.0	++	0
		10.0	+	0

z : カルス形成 = - 形成せず 直径 +0.1cm~0.25cm ++0.25cm~0.5cm  
 +++0.5cm~0.75cm ++++0.75cm~1.0cm +++++ 1.0cm以上  
 y : 発根率 = 発根した下胚軸数 / 置床した下胚軸数 × 100

て、発根率および根の発達状況とも劣った。なお‘先勝の雪’および‘紫鵬’で得られたシュートは水浸状の徴候はなく、正常であった。

(2) BAおよびゼアチンの影響 (第3-22表)

移植後もカルスの生長が見られ、いずれの品種においても、カルスの大きさおよび色については、BAおよびゼアチン添加区の間で顕著な差は見られなかった。グリーンスポットはカルスからシュートを形成する場合の苗条原基様の構造を有する緑色の細胞塊で、培養3週間後より形成され始め、その数はBAとゼアチン間では差が認められなかったが、一次培地において2, 4-Dが高濃度であった

第3-20表 下胚軸由来カルスの生長に及ぼすNAAおよびBAの影響

カルス誘導 培地組成 <sup>z</sup> (mg/l) (培養4週間)	二次培地 組成 <sup>y</sup> (mg/l) (培養2週間)	ミランド初付			雪まつり			リトルマイクロ		
		カルス 形成 <sup>x</sup>	カルスの 状態 <sup>w</sup>	発根率 <sup>v</sup> %	カルス 形成	カルスの 状態	発根率 %	カルス 形成	カルスの 状態	発根率 %
無添加	無添加	+++	C	40	+++	F	0	++	C	0
	BA	+++	C	60	++	E	0	+	F	0
	NAA	+++	C	60	+++	E	20	++	F	20
	BA+NAA	+++	C	100	++++	F	40	++	F	40
NAA 0.1	無添加	++++	F	60	+++	F	0	++++	F	0
	BA	++++	F	90	+++	E	0	++++	E	0
	NAA	++++	F	80	+++	E	20	++++	F	20
	BA+NAA	++++	F	60	++++	F	50	++	F	40
NAA 1.0	無添加	++++	F	100	++++	F	70	++++	E	0
	BA	++++	E	100	++++	F	70	++++	F	0
	NAA	++	E	50	+++	E	50	+++	F	20
	BA+NAA	+++	E	100	++++	E	50	++++	F	50
NAA 10.0	無添加	++++	F	100	++++	F	80	++	E	70
	BA	+++	F	100	+++	F	30	+++	F	70
	NAA	+++	F	40	+++	F	60	++	F	50
	BA+NAA	+++	F	100	++++	F	50	+++	F	50
2, 4-D 0.1	無添加	++++	F	0	++++	F	0	++++	F	80
	BA	+++	F	20	++++	F	30	++++	F	30
	NAA	+++	F	10	++++	F	20	+++	F	60
	BA+NAA	++++	F	20	++++	F	50	++++	F	50
2, 4-D 1.0	無添加	++	F	0	+++	E	0	+	E	0
	BA	+++	E	0	+++	E	0	++	E	0
	NAA	+++	E	0	+++	E	0	+	E	0
	BA+NAA	+++	E	0	+++	E	0	+	E	0
2, 4-D 10.0	無添加	++	F	0	++	F	20	+	E	20
	BA	+	E	0	+	E	10	+	E	10
	NAA	+	E	0	++	E	0	+	E	0
	BA+NAA	++	E	0	++	E	0	+	E	0

z : カルス誘導・一次培地

y : BA, NAAの濃度はいずれも0.1mg/l

x : カルス形成=直径 +0.1cm~0.25cm ++0.25cm~0.5cm  
+++0.5cm~0.75cm ++++0.75cm~1.0cm

w : カルスの状態 F=柔らかいカルス C=堅いカルス E=粒状カルス

v : 発根率=発根したカルス数/置床したカルス数×100

第3-21表 下胚軸由来カルスからの器官形成に及ぼすBAおよびNAAの影響  
(培養6週間)

品種	BA (mg/l)	NAA (mg/l)	カルス形成 <sup>z</sup>		シュート形成率 <sup>y</sup> %		発根率 <sup>x</sup> %	
			アルミフイル	ミラップ <sup>a</sup>	アルミフイル	ミラップ <sup>a</sup>	アルミフイル	ミラップ <sup>a</sup>
先勝の雪	0	0	++	+	0	0	80	60
	0	0.1	++	++	0	0	10	90
	0	1.0	+++	+++	0	0	70	80
	0.1	0	++	++	0	0	30	60
	0.1	0.1	+++	++	0	0	30	60
	0.1	1.0	+++	+++	0	0	10	60
	1.0	0	++	++	0	10	60	60
	1.0	0.1	+++	+++	0	10	50	10
	1.0	1.0	+++	+++	0	0	0	10
雪まつり	0	0	+	+	0	0	60	70
	0	0.1	+++	+++	0	0	100	90
	0	1.0	+++	+++	0	0	70	80
	0.1	0	++	++	0	0	60	40
	0.1	0.1	++	+++	0	0	0	20
	0.1	1.0	+++	+++	0	0	70	50
	1.0	0	++	++	0	0	40	30
	1.0	0.1	+++	+++	0	0	20	10
	1.0	1.0	+++	+++	0	0	0	20
ピクミー ホワイト	0	0	+	+	0	0	60	30
	0	0.1	+++	+++	0	0	80	90
	0	1.0	+++	+++	0	0	80	80
	0.1	0	++	++	0	0	50	20
	0.1	0.1	+++	+++	0	0	40	10
	0.1	1.0	+++	+++	0	0	0	0
	1.0	0	+	++	10	10	20	20
	1.0	0.1	+++	+++	0	0	0	0
	1.0	1.0	+++	+++	0	0	10	0
紫鷗	0	0	+	+	0	0	10	30
	0	0.1	++	++	0	0	70	70
	0	1.0	+++	++	0	0	80	70
	0.1	0	++	+	0	0	30	30
	0.1	0.1	++	++	0	0	20	20
	0.1	1.0	+++	++	0	0	10	20
	1.0	0	++	+	0	10	20	30
	1.0	0.1	++	+++	0	0	10	0
	1.0	1.0	++	+++	0	0	20	10

z : カルス形成=直径 +0.1cm~0.5cm ++0.5cm~0.8cm +++0.8cm以上  
y : シュート形成率=シュート形成したカルス数/置床したカルス数×100  
x : 発根率=発根したカルス数/置床したカルス数×100

第3-22-1表 下胚軸由来カルスからのシュート形成に及ぼすBAおよびセアチンの影響  
(品種：ハイランドホワイト)

一次培地 ( $\text{mg}/\text{L}$ ) (培養4週間)	二次培地 <sup>z</sup> ( $\text{mg}/\text{L}$ ) (培養2週間)	三次培地 <sup>y</sup> ( $\text{mg}/\text{L}$ ) (培養5週間)	カルス形成 <sup>x</sup>	グリーン スポット数 <sup>w</sup>	シュート数 <sup>v</sup>
無添加	無添加	BA	+++	+	14
		セアチン	+++	+	0
		BA	+++	+	3
		セアチン	+++	+	0
		NAA	BA	++++	+
BA+NAA	セアチン	+++	+	0	
	セアチン	+++	+	0	
NAA 0.1	無添加	BA	+++	+	0
		セアチン	+++	+	0
		BA	+++	++	0
		セアチン	+++	+	0
		NAA	BA	++++	++
BA+NAA	セアチン	++++	+	0	
	セアチン	+++	++	22	
NAA 1.0	無添加	BA	+++	++	4
		セアチン	+++	+	0
		BA	+++	++	0
		セアチン	++++	+	0
		NAA	BA	*	*
BA+NAA	セアチン	*	*	0	
	セアチン	++	+++	6	
NAA 10.0	無添加	BA	+++	-	0
		セアチン	++++	++	0
		BA	++++	+	5
		セアチン	++++	+	0
		NAA	BA	*	*
BA+NAA	セアチン	*	*	*	
	セアチン	+++	++	0	
2,4-D 0.1	無添加	BA	++++	+	1
		セアチン	++++	+	0
		BA	++++	++	0
		セアチン	++++	+	0
		NAA	BA	+	-
BA+NAA	セアチン	+	-	0	
	セアチン	+++	+	3	
2,4-D 1.0	無添加	BA	+	-	0
		セアチン	+	-	0
		BA	++++	-	0
		セアチン	++++	-	0
		NAA	BA	++++	-
BA+NAA	セアチン	++++	-	0	
	セアチン	++++	-	0	
2,4-D 10.0	無添加	BA	+	-	0
		セアチン	+	-	0
		BA	++++	-	0
		セアチン	++++	-	0
		NAA	BA	+++	-
BA+NAA	セアチン	+++	-	0	
	セアチン	++++	-	0	

z : BAおよびNAAはいずれも0.1mg/L

y : BA 1.0mg/L, セアチン0.1mg/L

x : カルス形成 = 直径 + 0.1~2.5mm ++ 2.5~5.0mm +++ 5.0~7.5mm

++++ 7.5~10mm +++++ 10mm以上 \* : 汚染のため結果無し

w : グリーンスポット数 = -なし + 1~10個 ++ 11~20個 +++ 21個以上

v : シュート数 = 三次培地で12週間に形成された10外植体からのシュート総数

第3-22-2表 下胚軸由来カルスからのシュート形成に及ぼすBAおよびアチンの影響  
(品種：雪まつり)

一次培地 (mg/l) (培養4週間)	二次培地 <sup>z</sup> (mg/l) (培養2週間)	三次培地 <sup>y</sup> (mg/l) (培養5週間)	カルス形成 <sup>x</sup>	グリーン スポット数 <sup>w</sup>	シュート数 <sup>v</sup>
無添加	無添加	BA セ・アチン	++++	+	80
	BA	BA セ・アチン	++++	++	*
	NAA	BA セ・アチン	+++	+	100
	BA+NAA	BA セ・アチン	+++	-	00
				+++	+
NAA 0.1	無添加	BA セ・アチン	++	++	20
	BA	BA セ・アチン	+++	+	0*
	NAA	BA セ・アチン	+++	+	0*
	BA+NAA	BA セ・アチン	+++	+	00
				++	+
NAA 1.0	無添加	BA セ・アチン	+++	-	00
	BA	BA セ・アチン	++++	++	130
	NAA	BA セ・アチン	+++	++	050
	BA+NAA	BA セ・アチン	+++	++	000
				+++	+
NAA 10.0	無添加	BA セ・アチン	+++	+	110
	BA	BA セ・アチン	++++	+	000
	NAA	BA セ・アチン	++++	+	000
	BA+NAA	BA セ・アチン	+++	++	020
				++++	+
2,4-D 0.1	無添加	BA セ・アチン	++++	+	100
	BA	BA セ・アチン	++++	++	000
	NAA	BA セ・アチン	+++	+	000
	BA+NAA	BA セ・アチン	+++	++	030
				++++	+
2,4-D 1.0	無添加	BA セ・アチン	+	-	00
	BA	BA セ・アチン	+++	-	000
	NAA	BA セ・アチン	+++	-	000
	BA+NAA	BA セ・アチン	++++	-	000
				++++	-
2,4-D 10.0	無添加	BA セ・アチン	+	-	00
	BA	BA セ・アチン	+++++	-	000
	NAA	BA セ・アチン	++++	-	000
	BA+NAA	BA セ・アチン	+++++	-	000
				+++++	-

z, y, x, w, v : 第3-22-1表参照

第3-22-3表 下胚軸由来カルスからのシュート形成に及ぼすBAおよびゼアチンの影響  
(品種：リトルゼムイエロー)

一次培地 (mg/l) (培養4週間)	二次培地 <sup>z</sup> (mg/l) (培養2週間)	三次培地 <sup>y</sup> (mg/l) (培養5週間)	カルス形成 <sup>x</sup>	ク・リ・ン スポ・ット数 <sup>w</sup>	シュート数 <sup>v</sup>
無添加	無添加	BA	++	-	0
		ゼアチン	+++	+	0
		BA	++	-	0
		ゼアチン	++	+	0
		BA	++	-	0
BA+NAA	無添加	ゼアチン	+	-	0
		BA	+	-	0
		ゼアチン	+	-	0
NAA 0.1	無添加	BA	+++	++	44
		ゼアチン	+++	+	0
		BA	+++	-	0
		ゼアチン	++	++	0
		BA	++	-	0
BA+NAA	無添加	ゼアチン	++	-	0
		BA	+	-	0
		ゼアチン	+	-	0
NAA 1.0	無添加	BA	++	-	3
		ゼアチン	+++	++	0
		BA	++	-	5
		ゼアチン	++	+	0
		BA	+	-	0
BA+NAA	無添加	ゼアチン	+	+	0
		BA	++	-	0
		ゼアチン	++	+	0
NAA 10.0	無添加	BA	+++	+++	3
		ゼアチン	++++	++	0
		BA	++	-	0
		ゼアチン	++	-	0
		BA	+	-	0
BA+NAA	無添加	ゼアチン	+	-	0
		BA	++	-	0
		ゼアチン	++	+	0
2,4-D 0.1	無添加	BA	+++	-	0
		ゼアチン	+++	+	0
		BA	++	-	0
		ゼアチン	+++	+	0
		BA	++++	+++	15
BA+NAA	無添加	ゼアチン	++++	++	0
		BA	++++	+	0
		ゼアチン	++++	+++	0
2,4-D 1.0	無添加	BA	+	-	0
		ゼアチン	+	-	0
		BA	+	-	0
		ゼアチン	+	-	0
		BA	+++++	-	0
BA+NAA	無添加	ゼアチン	+++++	-	0
		BA	+++++	-	0
		ゼアチン	+++++	-	0
2,4-D 10.0	無添加	BA	+	-	0
		ゼアチン	+	-	0
		BA	+	-	0
		ゼアチン	+	-	0
		BA	+++++	-	0
BA+NAA	無添加	ゼアチン	+++++	-	0
		BA	+++++	-	0
		ゼアチン	+++++	-	0

z, y, x, w, v : 第3-22-1表参照

区は、グリーンスポットがまったく形成されなかった。植物体の再生は、グリーンスポットから培養5週間後より次々と見られた。植物体の再生はBA添加区のみで起こり、ゼアチン添加区ではグリーンスポットは形成されたにもかかわらずシュートは再生されなかった。また品種間では差がなかった。

### (3) 品種間差異 (第3-23表)

全品種および各処理区でシュート形成が見られ、最も高かったのは、‘ピグミーホワイト’で70%であり、‘先勝の雪’は、10%と最も低かった。また、シュート形成には至らなかったが、堅い球状カルスを形成するものが多かった。その後、シュート部分を分離し、BM培地を含む試験管に移植し、アルミフイルで栓をして培養した結果、シュートは、移植2~3週間後で褐変し始めるものが多く見られた。また、移植後、カルスの形成が促進されたが、シュート自体がカルス化してしまう場合もあった。移植後、葉が数枚増加し、褐変の程度が少ないものも少しは見られたが、節間が伸長せず、小さいままであった。水浸状化したシュートは、移植後もほとんど回復しなかった。

### (4) ポリアミン類 (プトレスシンおよびスベルミジン) の影響 (第2-24表)

‘ピグミーホワイト’のカルス生長はプトレスシン、スベルミジンでは効果がなく、スベルミジン0.5mMでは明らかに阻害し、シュートは、無添加区では全く形成されなかったが、スベルミジン0.005mMでは17%の形成率が得られた。発根はプトレスシン0.005mMでわずかに促進された。‘先勝の雪’のカルス生長はプトレスシン、スベルミジンの濃度が高い場合に阻害され、低濃度でも促進されることはなかった。発根はプトレスシン0.005mMでわずかに促進されたが、シュート形成は促進されなかった。

### 4) シュートの移植 (第3-25表)

発根率は25~55%の間で、‘リトルゼムイエロー’の下胚軸由来カルスから分化したシュートからの発根が最も高かった。なお、発根しなかったシュートの中で‘雪まつり’は33.3% (4/12) が水浸状を呈さない正常なシュートであった。

第3-23表 下胚軸由来カルスからのシュート形成における品種間差異  
(培養6週間)

品種	一次培地		二次培地		シュート形成率 <sup>z</sup> %	シュート数 <sup>y</sup>
	BA (mg/ℓ)	NAA (mg/ℓ)	BA (mg/ℓ)	NAA (mg/ℓ)		
先勝の雪	0	1.0	1.0	0.1	10 (1/10)	1.0
	0.1	0	1.0	0	10 (1/10)	1.0
	1.0	0.1	1.0	0.1	10 (1/10)	1.0
雪まつり	1.0	0	1.0	0	30 (3/10)	1.0
ピクミー	1.0	0	1.0	0	40 (4/10)	1.0
初作	1.0	0	1.0	0.1	70 (7/10)	1.0

z : シュート形成率 = シュート形成したカルス / 置床したカルス × 100

y : シュート数 = 1処理区内 (10片) のシュート数合計 / シュート形成したカルス数

第3-24表 下胚軸からの器官形成に及ぼすホリタミン (フ・トレスシン、ス・ルミジン) の影響  
(培養2ヶ月間)

品種	フ・トレスシン (mM)	ス・ルミジン (mM)	カルス形成 <sup>z</sup>	シュート形成率 <sup>y</sup> %	シュート数 <sup>x</sup>	発根率 <sup>w</sup> %
ピクミー ホワイト	0	0	+++	0	0	0
	0.005	0	++	5 (1/20)	2.0	10 (2/20)
	0.05	0	+++	0	0	0
	0.5	0	++	5 (1/20)	1.0	0
	0	0.005	++	17 (3/18)	3.0	0
	0	0.05	+++	0	0	0
	0	0.5	+	0	0	0
先勝の雪	0	0	+++	10 (2/20)	1.0	5 (1/20)
	0.005	0.1	+++	5 (1/20)	1.0	10 (2/20)
	0.05	0	+++	5 (1/20)	1.0	0
	0.5	0	++	10 (2/20)	1.5	0
	0	0.005	+++	0	0	0
	0	0.05	+++	5 (1/20)	1.0	0
	0	0.5	++	0	0	0

z : カルス形成 = 直径 +0.1cm ~ 0.5cm ++0.5cm ~ 1.0cm +++1.0cm ~ 1.5cm

y : シュート形成率 = シュート形成したカルス数 / 置床したカルス数 × 100

x : シュート数 = 1処理区内シュート数合計 / シュート形成したカルス数 × 100

w : 発根率 = 発根したカルス数 / 置床したカルス数 × 100



第3-25表 下胚軸カルス由来シュートからの幼植物再生  
(培養4週間)

品種	幼植物再生率 <sup>z</sup> %	( 正常 %	水浸状 % )
ハイランドホワイト	25.0 ( 4/16)	25.0 ( 4/16)	0 (0/16)
雪まつり	25.0 ( 3/12)	25.0 ( 3/12)	0 (0/12)
リトルゼムイエロー	55.0 (11/20)	55.0 (11/20)	0 (0/20)

z : 幼植物体再生率 = 発根したシュート数 / 置床したシュート数 × 100

#### 第4節 薬培養と器官分化

##### 材料および方法

##### 1. 薬からのカルス形成

1991年4月下旬播種、本葉が3~5枚展開した時3号ビニールポットに移植し、9週間後にファイトトロン(自然光・20℃昼/15℃夜)に入れて栽培し、播種から約13週間目に形成し始めた花蕾を順次採取し、本実験に供した。花蕾を殺菌後、薬を無菌的に取り出し、2等分した後、培地上に6~10片置床した。薬内の小胞子の発育段階を花蕾の長径により第3-26表のようにS、M、Lの3段階に分類した。また開花時期が進むにつれて、花蕾の大きさと小胞子の発育段階が必ずしも一致しなくなるため、採取時に薬を押しつぶし、顕微鏡により小胞子の発育段階を観察した。以下の実験には、MS培地(第3-1表)からNH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>を除き、KNO<sub>3</sub>を2500mg/lとし、100mg/lイノシトール、500mg/lのカザミノ酸を添加し、pH5.5に調整後、0.2%のゲルライトでゲル化した培地を基本培地とした。糖としてサッカロース2%および10%の2処理区を設け、植物生長調節物質は0.1mg/l NAA+0.1mg/l 2,4-Dおよび0.1mg/l NAA+0.1mg/l BAの2処理区とした。培養は3,000 lx、14時間照明、20℃および25℃条件下で行った。

実験は以下の項目について行った。

##### 1) 薬の発育度、培地中の糖濃度および植物生長調節物質の影響

(1) 20℃培養: 'ハイランドホワイト'、'クリスマスホワイト'、'リトルゼムイエロー'の3品種を用いた。

(2) 25℃培養: 'ハイランドホワイト'、'雪まつり'、'リトルゼムイエロー'の3品種を用いた。

第3-26表 葯培養に供試した花蕾の大きさ

花蕾の大きさ	花蕾の長径 (mm)	花粉の発育段階
S	< 3	1核期
M	3~5	1核期+2核期
L	> 5	2核期

## 2) 花蕾の培養前処理の影響

### (1) 低温浸水前処理の影響

‘ハイランドホワイト’ および ‘リトルゼムイエロー’ を用いた。蒸留水を入れた100ml容の三角フラスコに、採取直後の花蕾を入れ、アルミフイルでフラスコ全体を覆い冷蔵庫内（5℃）で24時間低温処理した。処理後25℃、3,000 lx、14時間照明下で培養を行った。

### (2) 高温前処理の影響

‘リトルゼムイエロー’ の葯片を前処理として30℃、3,000 lx、14時間照明下で24時間培養後、20℃および25℃、3,000 lx、14時間照明下で培養した。

## 2. 葯由来カルスからのシュート形成

実験1で得られた培養8週間のカルスを2等分して1.0mg/l BA添加したMS培地（+2%サッカロース）に移植した。

## 結果

### 1. 葯からのカルス形成

#### 1) 葯の発育度、培地中の糖濃度および植物生長調節物質の影響

##### (1) 20℃培養（第3-27表、第3-6図）

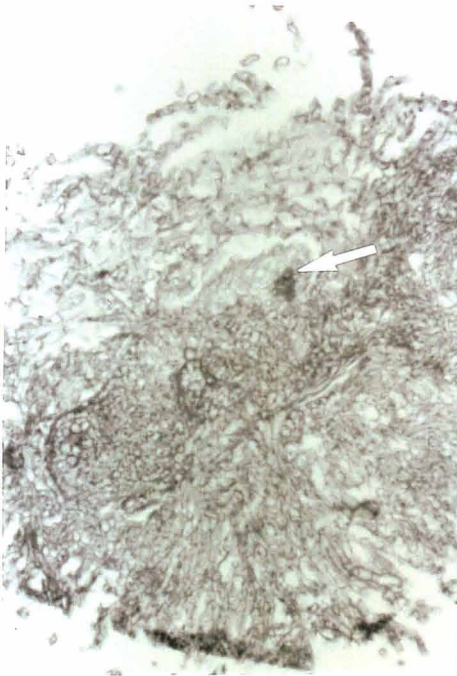
全ての品種で葯片から、白および黄緑色のカルスの形成がみられた。‘ハイランドホワイト’ と ‘リトルゼムイエロー’ は、花蕾の大きさがSのものが最もカルス形成率が良く、培地組成は‘ハイランドホワイト’ は、2%サッカロース、0.1mg/l NAA+0.1mg/l BA添加区、‘リトルゼムイエロー’ は10%サッカロース、0.1mg/l NAA+0.1mg/l 2,4-D添加区のもものが最も良かった。‘クリスマス



第3-6図 葯からのカルス形成  
(品種：ハイランドホワイト)



第3-7図 葯由来カルスから形成されたシュート  
(品種：ハイランドホワイト)



第3-11図 葯より形成されたカルス切片  
←は死滅した花粉粒

スホワイト’は、3品種間で最もカルス形成率が高く、全処理区において約30～80%のカルス形成率を示した。また花蕾の大きさとカルス形成には、はっきりした傾向は認められなかったが、培地組成は10%サッカロース、0.1mg/ℓ NAA+0.1mg/ℓ BA添加区のものが最も良かった。

(2) 25℃培養 (第3-28表)

供試したいずれの品種もカルス形成がみられた。‘ハイランドホワイト’については、カルス形成率と花蕾の大きさおよび培地組成との関係は明らかではなかったが、花蕾がSで10%サッカロース、0.1mg/ℓ NAA+0.1mg/ℓ BA添加区のものが、28.6%と最も高かった。‘雪まつり’と‘リトルゼムイエロー’は、花蕾の大きさはMが、また培地組成は10%サッカロース、0.1mg/ℓ NAA+0.1mg/ℓ 2,4-D添加区においてカルス形成率が高い傾向が認められた。カルスの形態は、薬片を包むように白い柔らかいカルスを形成するものと、薬片自体が緑色

第3-27表 薬からのカルス形成に及ぼす花蕾の大きさ、培地糖濃度および植物生長調節物質、花蕾の大きさおよび品種間差異の影響 (20℃培養)

サッカロース (%)	培地組成		花蕾の大きさ	カルス形成率 <sup>z</sup> %		
	ホルモン (mg/ℓ)			ハイランドホワイト	クリスマスホワイト	リトルゼムイエロー
2	NAA 2,4-D	0.1 0.1	L	0 (0/5)	40.0 (2/5)	4.5 (1/22)
			M	0 (0/6)	61.5 (8/13)	8.3 (1/12)
			S	0 (0/2)	44.4 (4/9)	11.1 (3/27)
			(合計)	0 (0/13)	51.8 (14/27)	8.2 (5/61)
2	NAA BA	0.1 0.1	L	0 (0/5)	60.0 (3/5)	4.5 (1/22)
			M	50.0 (3/6)	46.2 (6/13)	0 (0/3)
			S	50.0 (1/2)	44.4 (4/9)	18.5 (5/27)
			(合計)	30.8 (4/13)	48.1 (13/27)	11.5 (6/52)
10	NAA 2,4-D	0.1 0.1	L	0 (0/6)	66.6 (4/6)	30.4 (7/23)
			M	0 (0/6)	28.6 (4/14)	66.5 (8/12)
			S	66.7 (2/3)	53.8 (7/13)	37.0 (10/27)
			(合計)	13.3 (2/15)	45.5 (15/33)	40.3 (25/62)
10	NAA BA	0.1 0.1	L	0 (0/6)	83.3 (5/6)	0 (0/32)
			M	0 (0/5)	57.7 (8/14)	0 (0/40)
			S	25.0 (1/4)	72.7 (8/11)	8.3 (1/12)
			(合計)	6.7 (1/15)	67.7 (21/31)	2.1 (1/48)

z : カルス形成した薬数 / 置床した薬数 × 100

第3-28表 葯からのカルス形成に及ぼす花蕾の大きさ、培地糖濃度および植物生長調節物質、の影響  
(25°C培養)

培地組成 サッカロース (%)	ホルモン (mg/ℓ)	花蕾の 大きさ	カルス形成率* %		
			ハイラント・ホワイト	雪まつり	リトル・マイエロー
2	NAA 0.1 2,4-D 0.1	L	0 (0/11)	4.9 (2/41)	7.1 (3/42)
		M	20.0 (1/5)	6.3 (1/16)	13.5 (7/52)
		S	0 (0/3)	3.9 (1/26)	4.9 (3/61)
		(合計)	5.3 (1/19)	4.8 (4/83)	8.4 (13/155)
2	NAA 0.1 BA 0.1	L	10.0 (1/10)	0 (0/37)	8.3 (3/36)
		M	0 (0/6)	28.6 (4/14)	14.6 (8/55)
		S	0 (0/3)	0 (0/27)	6.6 (4/61)
		(合計)	5.3 (1/19)	5.1 (4/78)	9.9 (15/152)
10	NAA 0.1 2,4-D 0.1	L	8.3 (1/12)	15.0 (6/40)	10.8 (4/37)
		M	0 (0/5)	23.1 (3/13)	17.2 (11/64)
		S	0 (0/3)	33.3 (6/18)	17.8 (13/73)
		(合計)	5.0 (1/20)	21.1 (15/71)	16.1 (28/174)
10	NAA 0.1 BA 0.1	L	16.7 (2/12)	6.3 (2/32)	2.4 (1/42)
		M	0 (0/5)	13.3 (2/15)	1.9 (1/54)
		S	28.6 (2/7)	8.3 (1/12)	7.4 (5/68)
		(合計)	16.7 (4/24)	8.5 (5/59)	4.3 (7/164)

\* : カルス形成した葯数 / 置床した葯数 × 100

になり、肥大し、その端から黄緑の堅い球形カルスを形成するものが観察された。

## 2) 花蕾の培養前処理の影響

### (1) 低温浸水前処理の影響 (第3-29表)

前処理によりカルス形成は抑制された。前処理区のカルス形成は、花蕾の大きさがM、2%サッカロース、0.1mg/ℓ NAA+0.1mg/ℓ BA添加区、および10%サッカロース、0.1mg/ℓ NAA+0.1mg/ℓ 2,4-D添加区の2処理区のみでみられ、4.0~5.6%とわずかであった。一方、無処理区は8~45%のカルス形成率を示した。

### (2) 高温前処理の影響 (第3-30表)

20°Cの培養区では、前処理を行った方がカルス形成率が高まる傾向を示した。一方、25°Cの培養区では、30°Cの高温による前処理の効果は認められなかった。カルス形成に及ぼす培養温度は、前処理を行わなかったものは、20°Cよりも25°Cの方がやや良好であったが、前処理を行ったものについては20°Cの方が良好

であった。カルス形成に及ぼす花蕾の大きさおよび培地組成の影響には、全体を通して一定の傾向が認められなかった。

## 2. 薬由来カルスからのシュート形成 (第3-7図)

‘ハイランドホワイト’で45個のカルス中、6個体の、また‘リトルゼムイエロー’では157個のカルス中3個体のシュートが得られた。‘クリスマスホワイト’と‘雪まつり’ではシュート形成は認められなかった。シュートの形成は25°Cの培養区の方が20°Cの培養区より優っていた。また高温前処理を行った場合、前処理後20°Cで培養したもののみでシュートは得られた。

第3-29表 薬からのカルス形成に及ぼす浸水前処理の影響  
(品種：ハイランドホワイト)

培地組成			花蕾の 大きさ	カルス形成率 <sup>z</sup> %	
サッカロース (%)	ホルモン (mg/ℓ)			浸水前処理	
			無		有
2	NAA	0.1	L	11.1 (2/18)	0 (0/21)
	2,4-D	0.1	M	18.2 (2/11)	0 (0/18)
			S	11.1 (1/9)	0 (0/25)
			(合計)	13.2 (5/38)	0 (0/64)
2	NAA	0.1	L	25.0 (3/12)	0 (0/21)
	BA	0.1	M	45.5 (5/11)	5.6 (1/18)
			S	22.2 (2/9)	0 (0/24)
			(合計)	31.3 (10/32)	1.6 (1/63)
10	NAA	0.1	L	15.4 (2/13)	0 (0/21)
	2,4-D	0.1	M	25.0 (5/20)	4.0 (1/25)
			S	27.8 (5/18)	0 (0/24)
			(合計)	23.5 (12/51)	1.4 (1/70)
10	NAA	0.1	L	8.3 (1/12)	0 (0/21)
	BA	0.1	M	10.0 (1/10)	0 (0/25)
			S	22.2 (2/9)	0 (0/24)
			(合計)	12.9 (4/31)	0 (0/70)

<sup>z</sup> : カルス形成した薬数 / 置床した薬数 × 100

第3-30表 薬からのカルス形成に及ぼす高温前処理の影響  
(品種：リトルゼムイエロー)

サッカロース (%)	培地組成		蕾の 大きさ	カルス形成率* %			
	ナロン (mg/l)			20°C培養		25°C培養	
				無処理	30°C前処理	無処理	30°C前処理
2	NAA	0.1	L	0 (0/6)	33.3 (4/12)	0 (0/6)	0 (0/12)
	2,4-D	0.1	M	0 (0/6)	25.0 (3/12)	16.7 (1/6)	8.3 (1/12)
			S	33.3 (2/6)	33.3 (4/12)	50.0 (3/6)	8.3 (1/12)
			(合計)	11.1 (2/18)	30.6 (11/36)	22.2 (4/18)	5.6 (2/36)
2	NAA	0.1	L	16.7 (1/6)	16.7 (2/12)	50.0 (3/6)	41.7 (5/12)
	BA	0.1	M	16.7 (1/6)	41.7 (5/12)	0 (0/6)	25.0 (3/12)
			S	16.7 (1/6)	8.3 (1/12)	33.3 (2/6)	16.7 (2/12)
			(合計)	16.7 (3/18)	22.2 (8/36)	27.8 (5/18)	27.8 (10/36)
10	NAA	0.1	L	0 (0/6)	0 (0/6)	33.3 (2/6)	0 (0/12)
	2,4-D	0.1	M	0 (0/6)	8.3 (1/12)	16.7 (1/6)	0 (0/12)
			S	16.7 (1/6)	8.3 (1/12)	0 (0/6)	8.3 (1/12)
			(合計)	5.6 (1/18)	6.7 (2/30)	16.7 (3/18)	2.8 (1/36)
10	NAA	0.1	L	0 (0/6)	12.5 (2/16)	16.7 (1/6)	0 (0/12)
	BA	0.1	M	0 (0/6)	12.5 (2/16)	16.7 (1/6)	8.3 (0/12)
			S	16.7 (1/6)	8.3 (1/12)	0 (0/6)	0 (0/12)
			(合計)	5.6 (1/18)	11.4 (5/44)	11.1 (2/18)	2.8 (1/36)

z : カルス形成した薬数/置床した薬数×100

#### 第5節 電気泳動法による一重咲および八重咲株の識別

八重咲個体の種苗生産の効率化をはかるため、また薬培養によって半数体が得られた場合、開花前における一重と八重咲の識別を行う手段として、可溶性タンパクおよびパーオキシダーゼアイソザイムのバンドパターンによる解析を試みた。

#### 材料および方法

第1-7図に示した方法により可溶性タンパクおよびパーオキシダーゼアイソザイムの電気泳動を行った。装置にはポリアクリルアミドゲルスラブ電気泳動装置(ATTO、AE-6200型)を使用した。

①可溶性タンパク：‘雪まつり’、‘峰の雪’、‘安房の雪’、‘リトルゼムホワイト’、‘リトルゼムイエロー’の開花中の一重および八重咲の苗の中上位葉を用いた。

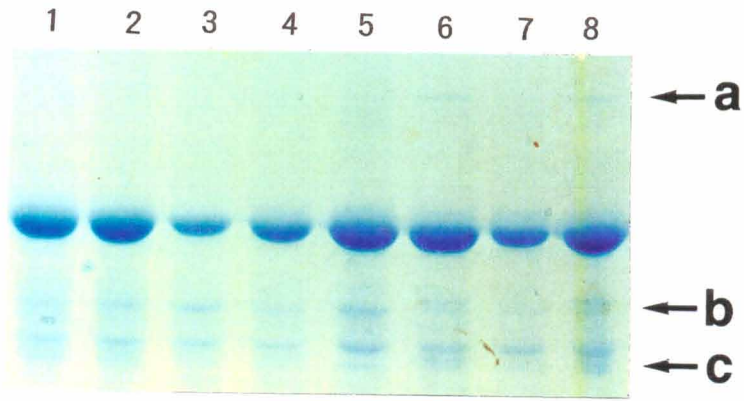
②パーオキシダーゼアイソザイム：‘峰の雪’、‘安房の雪’、‘リトルゼムホワイト’、‘リトルゼムイエロー’の開花中の一重および八重咲の苗の中上位葉を用いた。

### 結果

①可溶性タンパク（第3-8, -9図）：‘峰の雪’、‘安房の雪’では一重と八重間でバンドパターンに著しい違いが認められた。この2品種では、一重にのみ特有のバンドが3本存在した（a、b、c）。また‘雪まつり’、‘リトルゼムホワイト’、‘リトルゼムイエロー’では一重と八重間に異なるバンドは認められなかったが、‘雪まつり’では、一重で濃く染色されるバンドが多く存在した。

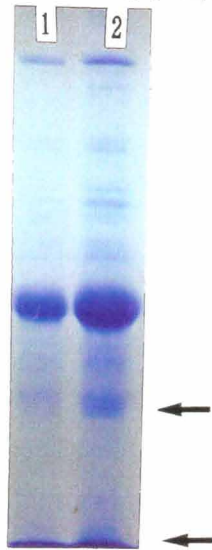
②パーオキシダーゼ（第3-10図）：4品種とも一重と八重間でバンドパターンに違いはみとめられなかったが、‘峰の雪’と‘安房の雪’では中央部に一重の方が濃いバンド（b）、また‘リトルゼムホワイト’と‘リトルゼムイエロー’では原点に近い部分に一重の方が濃いバンド（a）が存在した。





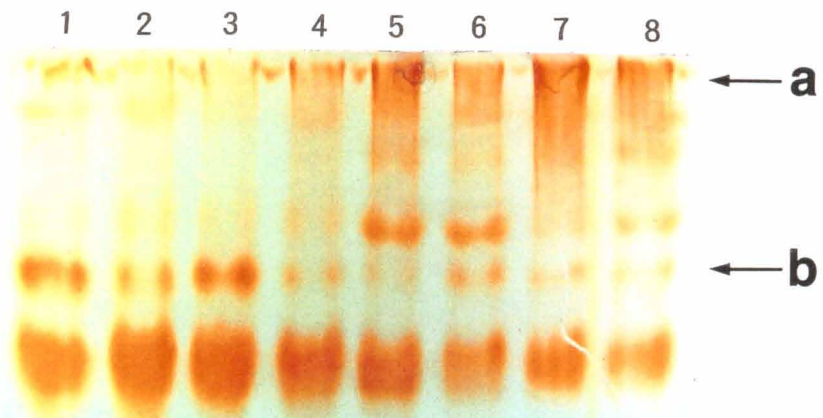
第3-8図 八重咲株と一重咲株の可溶性タンパクのサイモグラム

- 1 : 'リトルゼムイエロー' 八重    2 : 'リトルゼムイエロー' 一重  
 3 : 'リトルゼムホワイト' 八重    4 : 'リトルゼムホワイト' 一重  
 5 : '安房の雪' 八重                6 : '安房の雪' 一重  
 7 : '峰の雪' 八重                    8 : '峰の雪' 一重



第3-9図 '雪まつり'の八重咲株と一重咲株の可溶性タンパクのサイモグラム

- 1 : 八重                                2 : 一重



第3-10図 八重咲株と一重咲株のパーオキシダーゼアイソザイムのサイモグラム

- 1 : 'リトルゼムイエロー' 八重    2 : 'リトルゼムイエロー' 一重  
 3 : 'リトルゼムホワイト' 八重    4 : 'リトルゼムホワイト' 一重  
 5 : '安房の雪' 八重                6 : '安房の雪' 一重  
 7 : '峰の雪' 八重                    8 : '峰の雪' 一重

## 考察

組織培養による種苗生産の技術を確立する上で、培養組織片（外植体）の脱分化・再分化を制御する植物生長調節物質は、最も重要な要因の一つである。ストックの本葉、下胚軸および子葉培養において、カルスの形成はオーキシシン（NAAおよび2,4-D）によって促進され、半透明の柔らかいカルスを形成した。一方、サイトカイニン（BA,ゼアチン）単用では緑色の直径約1mmの球状の堅いカルスを多数形成し、オーキシシンとサイトカイニンのカルス形成に及ぼす影響が異なることを示唆していた。また、上記の外植体からの直接のシュート形成は、1.0mg/lおよび0.1mg/l BA添加区で多く見られ、BAが明らかにシュート形成を促進した。一方NAAはシュート形成を抑制する傾向を示し、特に高濃度のNAAで顕著であった。これはNAA添加がカルス形成を促進する方向に進み、結果的にシュート形成を抑制したものと考えられる。また、‘ヒグミーホワイト’の下胚軸培養でもゼアチン単用区で多数のシュートが形成され、NAAはシュート形成を抑制した。福住（1986）は‘先勝の雪’の5~6葉期の幼苗の本葉を用いて、1~2mg/l BA添加区で最高の不定芽形成率（88%）を示したことを、またGautamら（1983）は、BA 0.1~0.8 mg/l単用区で、30~43%のシュート形成率を得たことを報告している。また、Gautamら（1983）は、MS培地に1.0mg/lのアデニンを添加すると4%、カイネチン0.1mg/l添加すると8%のシュート形成率であったが、オーキシシンを添加するとシュート形成が抑制されることを報告している。また、発根に対しては、福住（1988）は、MS寒天培地に2mg/l BA添加した培地上でシュートを形成させ、寒天の代わりにジェランガム（ゲルライト）を用い1mg/l IBA添加した培地に移植することで良好な発根が見られることを示した。またMS培地に0.5mg/l NAAを添加すると50%程度の発根率は得られたが、根はもろく、NAAの濃度をさらに高めると、シュート自体がカルス化するため、シュートからの発根にはIBAがNAAより有効であることを示唆した。本実験でも、NAA単用で発根率が高く、BAとNAAともに含む場合発根率は低下した。また根の発育状態は、高濃度のNAAでは抑制された。1mg/l IBAを添加した培地にシュートを移植すると、50%以上の発根率を示した。

種苗生産を目的とする場合、均一な幼植物を大量に得る必要があり、そのた

め的手段として不定胚を利用する方法が考えられる。一般に不定胚は、始めにオーキシンを含む培地で外植体から不定胚形成能を持つカルス (embryo genic callus) を形成させ、その後オーキシンを除去した培地にカルスを移植することで誘導されることが幾つかの植物で知られている (鎌田, 1980)。そこでまず始めに、外植体として下胚軸および子葉を用い、カルス形成に及ぼすNAAおよび2, 4-Dの影響を調べた。カルス形成はNAAの方が2, 4-Dよりも良好で、2, 4-Dは低濃度では効果があるが、高濃度になるにつれカルスの生長が抑制された。また形成されたカルスの形状もNAAと2, 4-Dでは異なり、NAA添加では半透明の柔らかいカルスを、高濃度の2, 4-D (1.0, 10.0mg/l) 添加ではもろい粒状カルスを形成し、オーキシンの違いにより細胞の分裂、生長に時間的、空間的な差が生じる事が示唆された。次いでこれらのカルスを、オーキシン無添加または低濃度のオーキシンを含む培地に移植した。しかしながらストックでは不定胚の形成は見られず、カルスの生長が続いた。ストックにおいてはオーキシンを培地より除去する方法では、不定胚形成は誘導できなかつた。

オーキシンを除去した培地への移植によって不定胚形成がみられなかつたため、サイトカイニンを添加した培地を用いてカルスからのシュート形成を試みた。本実験では、サイトカイニンとしてBAおよびゼアチンを用いたところ、いずれもシュート原基様の緑色の細胞集塊 (グリーンスポット) を形成した。しかし、シュート形成はBA区のみで見られたことから、シュート形成にはBAが有効であることが示唆された。ただし、本実験に用いた濃度処理区が少ないことからBA、ゼアチンにおけるシュート形成に対する最適濃度についてはさらに検討する必要がある。シュート形成に及ぼすBAおよびゼアチンの影響については、Mustard (*B. juncea*) の子葉培養で、BAはシュート形成に有効であるがゼアチンは効果がないという報告 (George・Rao, 1980) と、Leaf - Mustard Cabbage (*B. juncea*) の下胚軸および子葉を用いた培養で、BAはゼアチンよりもシュート形成に効果的であるという報告がみられる (Hui・Zee, 1978)。また、カルス形成を誘導する植物生長調節物質とシュート形成との関係は、Chinese Kale (*B. alboglabra*) の下胚軸および子葉を用いた実験でNAAとBAを添加した培地ではシュートが形成され、2, 4-DとBAを添加した培地ではシュートが形成されなかつたというZee・Hui (1977) の報告がある。本実験においても、一次培地にお

いて2,4-Dを高濃度(1.0, 10.0mg/l)添加した培地で形成されたカルスからはシュートが形成されなかったことから、シュートを目的とした場合のカルス誘導において高濃度の2,4-Dは適さないと思われる。

振とう培養において得られた形状の異なるカルスの組織学的観察を行ったところ、2,4-D添加によって形成された粒状カルスは、緻密な細胞が規則正しく配列していて、分離しやすいことより、細胞分裂が主にカルスの表面で行われていることがうかがわれた(第3-2図-B)。またNAA添加により形成された柔らかいカルスは、細胞が肥大し細胞間隙も大きく、細胞がかなり老化していると考えられ(第3-2図-A)、また無添加による堅いカルスは、比較的小さな細胞群のなかに細胞分裂の盛んな小さな細胞小塊がカルスの比較的内部に点在していた(第3-2図-C)。また、グリーンスポットについても観察を行ったところ、比較的小さい細胞で構成されており、中心部に近い部分はより小さい細胞が存在し、その細胞群を取り囲むように同心円状に規則正しい細胞の配列が見られた(第3-4図)。

基本培地は外植体の生長に必須な種々の無機塩類および有機成分(糖、ビタミン、アミノ酸等)を含んでおり、培養に用いる植物にとってそれぞれ好適な多数の基本培地が作成されている。それらの中で本実験で使用したMS培地はタバコの茎から誘導したカルスの培養のために作成された基本培地であるが、現在最も多くの植物種で利用されている。しかしながら各植物種の培養においてその培地組成が好適かどうか十分検討されているわけではなく、ストックの培養においても同様で、そのため好適であるとは必ずしもいえない。本実験では基本培地のなかでも、最も重要な培地の必須要素の一つであるチッ素について検討した。チッ素源の種類( $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 、アミノ態-N)および濃度は、*in vitro*における外植体の生長および器官分化に大きく影響することが考えられ、一般の培養ではチッ素源として $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ などの無機態チッ素が広く利用されている。多くの植物では、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ が $\text{NH}_4^+\text{-N}$ に比較してチッ素源として優れているとされているが、 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 単用より、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ を少量添加した培地で外植体の生長が促進されることが報告されている。培地中の $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ 比が培養組織に与える影響については多くの報告がある(Frankら, 1951; Nickell・Burkholder, 1950; Nitsch・Nitsch, 1957)。ニンジンの根由来のカルスを用いて培地中のチ

チッ素源の比について検討した実験では、カルスの生長（乾物重の増加）は $\text{NO}_3^-$ -Nを含まない場合には、まったくみられず（Veliky·Rose, 1973） $\text{NO}_3^-$ -Nが必須であることが示されたが、 $\text{NH}_4^+$ -Nの添加は生長を促進する効果をもち、培地中の $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ が80:20のとき最大生長を示した。またニンジン葉柄由来のカルスからの不定胚形成においては、 $\text{NO}_3^-$ -Nを単独チッ素源とした場合、不定胚形成は非常に低率であったが、これにわずかな $\text{NH}_4^+$ -Nを添加することにより形成率を高めることが示された（Wetherrell·Dougall, 1976）。またイネ‘IR54’種子の未熟胚由来カルスの培養では、 $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ が85:15～50:50の広い範囲において幼植物再生がみられるが、両者の組成比によって再生植物の草丈や根の生長量に差が認められている（Haward·Hodges, 1990）。本実験では、下胚軸を材料としシュート形成に及ぼす培地のチッ素源の比について検討したが、その結果、下胚軸からのシュート形成にとっては、 $\text{NO}_3^-$ -Nが必須で、 $\text{NH}_4^+$ -Nの添加により $\text{NO}_3^-$ -Nを含んだ培地においてシュートの形成を促進する傾向を示した。 $\text{NH}_4^+$ -N添加の効果は品種によって異なり、‘雪まつり’が‘リトルゼムイエロー’に比べ多くの $\text{NH}_4^+$ -Nを要求する傾向が見られた。培地のチッ素源としては、この他に有機態チッ素があるが、その中でグルタミン酸、グルタミン、グリシン、アラニン、アスパラギン酸、アスパラギン、アラニン、尿素などが有効であるといわれている（Kamada·Harada, 1978）。ストックの葉片培養において、無機態チッ素を含むBM培地を用いた場合、外植体は緑色を保ち、カルスは緑色の球状を示し、その部位からシュートの発生が見られたのに対し、BM培地から無機態チッ素（ $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 、 $\text{KNO}_3$ ）を除き、各種アミノ酸を添加した培地では、プロリン、アスパラギン酸では黄色の柔らかなカルスを形成し、グルタミン、グルタミン酸、メチオニンではカルス形成は認められず、外植体は早くから褐変した。またアミノ酸添加の全培地においてシュートは全く形成されなかった。下胚軸培養でもアミノ酸添加によりカルス形成は促進され、特にグルタミン、アスパラギン酸で大きなカルスを形成したが、カルスは早期に褐変する割合が高く、シュート形成は認められなかった。従って、ストックの場合、チッ素源としてのアミノ態チッ素は、シュート形成を抑制し、組織の老化を促進する傾向を示すといえる。

ストックの器官形成においてシュート形成はサイトカイニンによって促進さ

れ、オーキシンは抑制する傾向を示したことから、シュート形成能が内生オーキシンレベルに影響されている可能性が示唆された。そこでシュート形成に及ぼす抗オーキシン (AZI, TIBA) の影響について検討した。本実験でAZIを添加した下胚軸培養では、AZI添加によりカルス形成率は低下し、カルスの発達も劣り、発根、シュート形成を抑制する傾向を示した。このことは抗オーキシンのAZIが内生オーキシンレベルを低下させ、その結果カルス形成を抑制したものである。Kochba・Roy (1977) は 'Shamouti' オレンジのカルスにAZIを添加したところ、AZI 0.001~3.0mg/l で不定胚形成が多く見られたが、TIBAを添加した場合はシュート形成、発根とも認められなかったとし、両者の間で効果がことなることを示した。またDetrzeら (1988) は、NAA、BAおよびTIBAを含むMS培地で無菌播種したサトウダイコンの実生の葉柄を、NAAおよびBAを含むMS培地で継代培養すると、多くの異常な水浸状のシュートを形成し、無菌発芽時のTIBA処理が葉柄からのシュートの形態形成に直接関与することを報告している。これらることより、器官形成における生長調節物質の影響の解析には、内生および外生の生長調節物質の質的および量的なバランスを考慮することが重要であろう。

ストックの各種組織からカルス経由で器官形成を行う場合、問題となる点は分化能をもったカルスの維持、増殖であるが、ストックの場合他の植物と比較してカルスの老化が早い傾向を示した。そのため分化能を有するカルスを長期間継代維持することが困難であった。そこで老化抑制物質として働くポリアミンの一種であるプトレスシンとスベルミジンの効果について検討した。これらの物質はタンパク質、核酸合成の盛んな組織中に多く見いだされ、細胞分裂や分化に重要な役割を果たしているといわれており (白幡, 1989)、Michaelら (1978) は、ニンジンの細胞を生長調節物質無添加の培地から2,4-Dを含む培地に移植すると、細胞の増殖に伴い、細胞内のプトレスシンとスベルミジンの濃度が高くなることを明らかにしている。また、Feirerら (1984) や、Montagueら (1978) は、プトレスシンやスベルミジンが胚形成時の細胞の分化に必要であることを報告している。これらのポリアミン類はエチレン生成の抑制を通じて、老化を抑制し器官形成を促進することが考えられる。本実験では、低濃度のスベルミジンの添加により、'ピグミーホワイト' でシュート形成に効果が認められた。しかしながら高濃度では、カルス、シュート形成を抑制したこと

から、低濃度での使用により細胞分裂および分化に促進効果を有すると考えられる。一方、‘先勝の雪’では効果は見られず、品種によって差が認められた。今後、ストックの器官分化に及ぼすポリアミン類とエチレンの影響について、それらの相互作用という点から詳しく検討する必要がある。

組織培養においては、品種、供試組織の部位および齢等の違いによって、カルス形成および器官形成に対する結果は大きく異なってくるのが知られている。本実験でも、同一品種内で、外植体として本葉、子葉および下胚軸切片を比較した場合、シュート形成についてみると、下胚軸では安定したシュート形成率を示したのに対して本葉では実験によってシュート形成率に大きな差がみられた。これは、一般に本葉は自然条件下で栽培されたものから実験材料として採取されるため、材料の生理状態が、栽培期間中の気温、日射量、施肥条件などにより強く影響を受けることが考えられ、そのため外植体として本葉を用いた場合シュート形成能に大きな変動が見られるものと考えられる。しかしながら第1および2章のような実験によって、商品価値の高い系統が作出され、それらの種子繁殖が困難な場合には、本葉を材料として用いなければならないので、上記の問題点は今後克服しなければならない課題である。またストックの場合、商品価値のあるのは八重咲株であるので、子葉や下胚軸を材料として種苗生産を行う場合には、その供試材料として八重咲株を選ばなければならない。しかし、八重咲株を識別するには、開花を待たなければならない。そこで実生の際に、八重咲個体を確実に選別する方法を確立することが必要となる。その方法として、電気泳動法による可溶性タンパクやアイソザイムの利用が考えられる。電気泳動により得られたサイモグラムに現れるバンド（酵素帯）はその植物種の遺伝子型を直接的に示していることより、各植物種間の類似性の検討に利用されている（岩崎, 1984）。本実験においても、パーオキシダーゼアイソザイムおよび可溶性タンパクにおいて一重と八重を判別できるバンドが認められた。本実験から、実生の段階で八重咲個体を早期識別できる可能性が示されたこと、また泳動材料には少量の子葉や根で十分であるので八重咲個体の下胚軸を確実に種苗生産の材料として得る方法として、電気泳動法が利用できるものと考えられる。アイソザイム法を利用することによる、雌雄異株植物の早期の雌雄判別は、ナツメヤシ（菅沼・岩崎, 1983）、イチヨウ（岩崎, 1980）、アス

バラガス (岩崎, 1981) などで行われ、また岩崎ら (1987) は、パーオキシダーゼアイソザイムでストックの一重、八重判別を試み、本実験と同様な結果を報告している。

本章では供試材料として、本葉、子葉、下胚軸および葯を用いたが、前三者 (本葉、子葉、下胚軸) が栄養繁殖による種苗生産のみを目的として用いたのに対し、葯培養は花粉からの半数体および純系二倍体作出による遺伝的変異の拡大と、それらからの優良系統の選抜および大量増殖といった育種的側面を合わせ持ったものである。ストックを含むアブラナ科の葯培養は、Kameya・Hirata (1970) がキャベツ (*Brassica oleracea*) においてカルス経由で半数体植物の作出に成功した後、Kellerら (1975) がカブ (*B. campestris*) の半数体作出を行い、Satoら (1989) がハクサイ (*B. campestris*) で、Thomas・Wenzel (1975) が西洋ナタネ (*B. napus*) で、Chiangら (1985) がキャベツ (*B. oleracea*) で、Keller・Armstrong (1983) がブロッコリー (*B. oleracea*) 等で葯培養について報告している。花粉から半数体を作成する経路には、花粉細胞からカルスを誘導し、カルスから不定芽および不定根を分化させ植物体を得る方法と、花粉細胞から直接に胚様体を誘導し、胚発育により植物体を得る方法の二通りがある。カルスを經由する場合は、カルス細胞が葯壁などの体細胞に由来している可能性も考えられ、半数体の作出には胚様体経由の方が望ましい。

カルス形成に最適な花粉の発達段階を見るとほとんどの植物では花粉4分子期から花粉1核期初期にあるが、開葯前の花粉成熟期においてもカルス形成がみられることがあり、Kameyaら (1970) はキャベツ (*B. oleracea*) で、開花直前および数日前の花粉成熟期の葯でカルス形成率が高かったことを報告している。本実験においては、花蕾を大きさによりS、M、Lの3段階に分けて培養を行ったが、カルス形成は、Mのほぼ花粉1核期初期のもので多くみられた。しかしながらLの花粉2核期から成熟期の葯においてもカルス形成が認められたことから、カルス形成に対する花粉の発育段階の適用範囲は広いことが示された。

カルス形成はオーキシン単用で認められ、サイトカイニンの添加は必ずしも必要としなかった。これは子葉、下胚軸からのカルス形成の場合とほぼ同様な傾向であった。またサッカロースの影響が認められ、一般に培養に用いる濃度 (2%) より高濃度 (10%) でカルス形成率が高い傾向を示した。



花粉からのカルス形成率の向上および花粉からの直接的な不定胚形成を目的に、前処理が数種の植物で行われている。高温前処理では、Keller・Armstrong (1978) の *B. napus* の葯培養により、30°Cで1~21日間高温前処理を行うと不定胚形成率が上がることや、*B. campestris* を材料として35°Cの1日処理が有効であった (Keller・Armstrong, 1979) という報告が見られる。本実験でも、高温前処理することによりカルス形成率が高くなり、処理の効果は認められた。また米澤ら (1991) はアスパラガスを材料とし、浸水前処理がカルス形成に有効であることを明らかにしたが、本実験では浸水前処理はカルス形成率を低下させ、阻害的であった。

この他、葯からのカルス形成に及ぼす要因として、花蕾の採取時期および位置が考えられ、‘クリスマスホワイト’ および ‘リトルゼムイエロー’ では、花の時期の終わり頃の花蕾でカルス形成率が良好なことが観察された。これは花粉の栄養生理的条件が関係していると考えられ、正常な花粉の発達過程からはずれて花粉が脱分化するためには、花粉にある種のストレスが必要なことを示唆している。前記の浸水処理や高温処理なども、花粉にストレスをかけることによって脱分化の過程に導く手段と考えられる。

カルスおよびカルスからの不定根を用いた染色体観察による半数体の確認はできなかったが、形成されたカルスの組織的観察により葯壁からではなく、花粉の存在する葯室内で分裂像が観察されていることから、花粉由来の半数体の作出の可能性が示唆された (第3-11図)。またカルスよりシュートが得られたことより、今後はこれらのシュートから植物体の再生を行い、多くの育種素材を得るための条件の検討が必須であろう。

本章では、ストックの種苗生産技術の確立を目的に、外植体の種類、培地組成、生長調節物質、チッ素源などについて検討し、順化までの最適な系を確立することを試みた。しかしながら本実験で得られたシュートは、奇形や水浸状化したシュートの割合が高く、順化が容易でないことなど、今後解決すべき問題が多く残されている。しかしながら低率ではあるが組織培養をとおして、シュート形成から鉢あげまでの最適な経路を確立する可能性を示すことができた。今後は本実験の結果を基礎に、より詳しい検討を加えることで、ストックの種苗生産も可能となるであろう。

## 摘要

ストックの種苗生産技術を確立のための基礎的知見を得るため、外植片からの個体再生に及ぼす最適培養条件について検討した。

### 第1節 葉片培養と器官分化

①植物生長調節物質の影響については、カルス形成および発根はNAAおよび2,4-Dによって、またシュート形成はBAおよびゼアチンによって促進された。②培地のチッ素形態の影響については、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ と $\text{NO}_3^-\text{-N}$ の比がシュート形成に影響し、 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ が阻害的に働く場合または低濃度の $\text{NH}_4^+\text{-N}$ が促進的に働く場合など、品種間で差が見られた。培地の無機態チッ素を有機態チッ素に置き換えた場合は、おもにカルス形成を促進し、器官分化に対しては促進的な効果は認められなかった。③供試植物の葉位の違いがカルス形成に影響し、上位葉は中および下位葉より劣った。

### 第2節 子葉培養と器官分化

①葉片培養と同様に、カルス形成および発根はNAAおよび2,4-Dによって、またシュート形成はBAによって促進された。②再分化培地における子葉由来カルスからのシュート形成は、0.1mg/lゼアチンでは見られず、1.0mg/l BAで効果的であった。③2,4-Dを添加した培地で誘導されたカルスからはシュート形成は見られず、NAAを添加した培地の場合にのみ見られた。

### 第3節 下胚軸培養と器官分化

①植物生長調節物質の効果は、葉片および子葉培養の場合と同様であった。②培地中のチッ素形態も、葉片培養と同様にシュート形成に対して、好適な $\text{NH}_4^+\text{-N}$ と $\text{NO}_3^-\text{-N}$ の比が品種間で異なり、無機態チッ素を有機態チッ素に置き換えた場合にはシュート形成は促進しなかったが、カルス形成を促進した。③抗オーキシンのAZIおよびTIBAの添加はカルス形成を抑制した。また、ポリアミン類のスベルミジン0.005mMの添加はカルスからのシュート形成を促進したが、ブトレスシンは効果が見られなかった。④カルスからのシュート形成に及ぼす培養器栓の影響は、アルミfoilよりミリラップフィルムを用いた区で良い結果が得られた。

#### 第4節 薬培養と器官分化

カルス形成についてみると、①20℃培養下では、薬内の小胞子の発育段階や培地組成の影響が品種間で異なり、一定の傾向は見られなかった。25℃下での培養では花蕾の大きさはS(1核期)およびM(1+2核期)で、培地のサッカロース濃度は10%でカルス形成率が高かった。また植物生長調節物質の影響が品種間で異なった。②培養温度に関しては、20℃よりも25℃の方がやや良好であったが、30℃による高温前処理(1日)を施した場合、20℃培養の方が良好であった。5℃の低温水浸漬による前処理はカルス形成を抑制した。

#### 第5節 電気泳動法によるストックの一重咲および八重咲株の識別

ストックの生産において、商品価値のある八重咲株を栽培するため、組織培養による種苗生産で子葉や下胚軸を材料とする場合は、八重咲株であることが必要である。そこで実生の段階で八重咲個体を確実に選別する方法として、電気泳動法の利用を試みた。パーオキシダーゼアイソザイムおよび可溶性タンパクのサイモグラムにおいて、一重と八重を識別するバンドが存在することが確認され、八重の識別に電気泳動法が利用できるものと思われる。

### 緒言

組織培養による種苗の生産は、基本的には無菌の培養器内で行われるため、培養器内の環境（光強度、光質、温度、湿度、CO<sub>2</sub>、エチレンなど）が植物体の再生とその後の生長および発育を強く支配している。そのため効率の良い種苗の大量増殖法を確立する上で、植物の種や供試材料の生育ステージに合わせた最適な培養環境を設定する事が必須の要件となってくる。また、そのための前提として培養に用いる外植体の親植物の選定が重要となる。

培養器内 (*in vitro*) 環境は培養器外 (*ex vitro*) 環境と比較し、半閉鎖系の特異的な環境であり、そのため *in vitro* で再生した植物はしばしば異常な生育形態を示すことがある。その中でも問題となっているものの一つとして、再生植物体の茎葉の水浸状化現象 (*vitrication*) がある。この現象は、茎葉が浸水状態を呈したように肥厚、肥大化する現象で、形態的にはクチクラ層の未発達、気孔の未発達または機能不全のため、*in vitro* から *ex vitro* への順化過程における環境ストレス（特に水ストレス）に対する抵抗性が極めて弱く、その結果、増殖率を大きく低下させる原因となっている（古在・富士原, 1986; 古在, 1987）。ストックにおいても、組織培養によって再生した植物の多くが水浸状を呈し、そのため順化を困難にしている。

本章では種苗生産のための好適な培養環境を確立するための基礎的知見を得るため、器官分化に及ぼす供試植物の栽培環境（前歴）の影響、および培養器内の環境要因の変動と *in vitro* の植物の生育並びに形態形成反応との関係について検討した。

## 第1節 器官分化に及ぼす供試植物の前歴の影響

### 材料および方法

#### 1. 葉片培養

‘銀潮’および‘雪まつり’の種子を、パーミキュライトとピートモス(1:1 v/v)の混合培養土を入れたプランターに5月中旬に播種し、発芽後に遮光処理を施し屋外で管理した。遮光処理は、75%遮光(黒寒冷紗2枚)、50%遮光(黒寒冷紗1枚)および無遮光(対照区)の3処理とし、施肥処理は、園試処方水耕液の1/4および1/2濃度に準じた大塚液肥の1/4および1/2濃度の2処理とし(週1回施用)、これらを組み合わせた6処理区を設けた。播種後約2か月の、完全に展開した10~14葉位の葉を供試した。葉は滅菌後、中肋を取り除いた葉身部分を5mm角に細断し、これを外植体として用いた。培地は1/2MS培地に、MSビタミン、100mg/lイノシトール、500mg/lカザミノ酸を添加し、pHを5.5に調整後、0.2%ゲルライトで固化した培地(BM培地)とし、第3章の結果をふまえてシュート形成に効果的であった1mg/l BAを添加した。培地は試験管に10mlずつ分注し、1試験管当たり1外植体を置床し、2重のアルミフォイルで栓をした。処理区当たり試験管10本とした。

#### 2. 下胚軸培養

‘リトルゼムイエロー’および‘雪まつり’の種子をBM培地を含むカルチャーボトル(10×10×10cm)に無菌播種した。播種後、10,000 lxツイン蛍光灯(ナショナル)下で葉片培養の場合と同様の遮光処理を施した。遮光処理後2週目の実生下胚軸の上端と下端をそれぞれ約3mm取り除いた部位から、約3mmずつの切片に調整した。培養条件は葉片培養に準じた。

### 結果

#### 1. 葉片培養(第4-1表)

培養期間中、葉片の肥大現象が認められた。カルス形成は全ての培地で認められ、‘銀潮’、‘雪まつり’とも100%であった。肥大したすべての葉片の切断面に淡緑色の直径2mmほどの球状のカルスが形成された。シュート形成はいずれも球状のカルス上で観察され、これら球状のカルスは表層が規則的な細胞配

列を示し、茎頂構造に分化する可能性を有するカルスと考えられた。

液肥濃度とシュート形成との関連についてみると、‘銀潮’は、1/4倍液施用区よりも1/2倍液施用区でやや高いシュート形成率を示したが、‘雪まつり’では、液肥濃度による明確な差は見られなかった。

遮光処理とシュート形成との関連についてみてみると‘銀潮’の場合、1/2倍液施用、75%遮光処理区で70%と最も高いシュート形成率を示し、遮光処理によりシュート形成の促進効果が認められた。また、1/4倍液施用でも、遮光処理の効果が認められたが、1/2倍液施用区ほど明確な差は認められなかった。一方、‘雪まつり’の場合、液肥濃度に関係なく、遮光処理によりシュート形成は抑制され、特に75%遮光処理区ではシュート形成は認められなかった。

また、本葉のクロロフィル含量に及ぼす遮光処理の影響について調べた結果を第4-2表に示した。両品種において、遮光率が高くなるほどクロロフィル含量も少くなる傾向を示した。

第 4-1表 葉片からの器官分化に及ぼす供試材料養成期間中の遮光および施肥量の影響  
(培養10週間)

品種	液肥	遮光率	カルス形成率 <sup>z</sup> %	シュート形成率 <sup>y</sup> %	シュート数 <sup>x</sup> (本)	発根率 <sup>w</sup> %
銀潮	1/2	0	100 (8/8)	25 (2/8)	1.0	0
		50%	100 (8/8)	50 (4/8)	1.8	0
		75%	100 (10/10)	70 (7/10)	2.3	0
	1/4	0	100 (10/10)	20 (2/10)	2.0	0
		50%	100 (6/6)	50 (3/6)	1.0	0
		75%	100 (10/10)	30 (3/10)	1.0	0
雪まつり	1/2	0	100 (10/10)	45 (4/10)	1.0	10 (1/10)
		50%	100 (6/6)	17 (1/6)	1.0	0
		75%	100 (8/8)	0	0	0
	1/4	0	100 (10/10)	30 (3/10)	1.0	0
		50%	100 (10/10)	20 (2/10)	1.5	0
		75%	100 (10/10)	0	0	10 (1/10)

z : カルス形成率 = カルス形成した外植片数 / 置床した外植片数 × 100

y : シュート形成率 = シュート形成した外植片数 / 置床した外植片数 × 100

x : 1処理区内 (10片) のシュート数合計 / シュート形成した外植片数

w : 発根率 = 発根した外植片数 / 置床した外植片数 × 100

第4-2表 本葉のクロロフィル含量に及ぼす遮光処理の影響<sup>z</sup>  
(mg/F. W. g)

品種	遮光率 (%)	クロフィル a	クロフィル b	全クロフィル
銀潮	0	0.60	0.28	0.88
	50	0.59	0.30	0.90
	75	0.64	0.34	0.97
雪まつり	0	0.50	0.34	0.84
	50	0.68	0.34	1.02
	75	0.69	0.38	1.07

z:クロロフィルの測定はArnon法 (Arnon, 1949) に従った

第4-3表 下胚軸切片からの器官分化に及ぼす供試材料養成中の遮光の影響  
(培養10週間)

品種	遮光率 %	培地	カルス形成率 <sup>z</sup> %	シュート形成率 <sup>y</sup> %	シュート数 <sup>x</sup> (本)
リトルゼムイエロー	0	BM	90 (9/10)	90 (9/10)	5.6
	50	BM	80 (8/10)	40 (4/10)	5.5
	75	BM	60 (6/10)	50 (5/10)	4.4
雪まつり	0	BM	100 (10/10)	30 (3/10)	6.0
	50	BM	100 (6/6)	30 (3/10)	2.3
	75	BM	100 (8/8)	10 (1/10)	6.0

z, y, x : 第4-1表参照

## 2. 下胚軸培養 (第4-3表)

カルス形成は両品種で良好で、特に‘雪まつり’では全てカルス化した。カルスは切断面から認められ、半透明で緑色の5mm大の球状カルスであった。シュートはほとんどカルスから形成されたが、直接下胚軸から不定芽を形成したのも認められた。供試した2品種では‘リトルゼムイエロー’が‘雪まつり’よりも高いシュート形成率を示した。遮光によるシュート形成率の低下の割合は‘リトルゼムイエロー’において著しかった。

## 第2節 器官分化および再生幼植物の形態に及ぼす培養器栓の影響

### 材料および方法

#### 1. 培養器のCO<sub>2</sub>換気回数に及ぼす培養器栓の影響

2重のアルミホイル、ルミラー（東レ、ポリエステルフィルム##25）およびミリラップフィルム（日本ミリポアリミテッド）（第4-1図, p. 136）でそれぞれ閉栓した10mℓのBM培地を含んだ試験管（気相21mℓ）を、高CO<sub>2</sub>条件下の密閉チャンバー内に置き、培養器内外のCO<sub>2</sub>濃度（約3,500ppm）が平衡になるまで保持した。その後チャンバーより取り出し、通常の培養条件下に置き、培養器内のCO<sub>2</sub>濃度を測定開始後30分間隔で3時間、および4、6時間後の計9回測定し、古在ら（1986b）の式により換気回数を算出した。CO<sub>2</sub>濃度測定は、ガスクロマトグラフィー（島津、GC-14A）にデータ処理装置（島津、C-R6A）を接続して行った。カラムはステンレス製カラムにポラバックQを詰めたものを用い、キャリアガスは窒素ガス（流量、50cm<sup>3</sup>/min）を、検出器には、熱伝導度検出器（TCD）を用いた。電流150mA、カラム温度は50°C、検出器温度は110°Cとし、1回のサンプル量は0.5mℓとした。

#### 2. 下胚軸からのシュート分化に及ぼす培養器栓の影響

‘ホワイトワンダー’の無菌播種後7日目の実生の下胚軸（3cm）を5mmの長さに切断し外植体として用いた。供試培地はBM培地に1.0mg/ℓBAを添加したものをを用いた。培養器として試験管（ $\varnothing$ 20mm×120mm）を用い、これに培地を10mℓ入れ、2重のアルミホイル、ルミラーフィルム、またはミリラップフィルムで栓をした。試験管当り2外植体を置床し、処理区当り試験管10本とした。培養は20°C、5,000 lx昼光色蛍光灯、14時間照明下で行った。

#### 3. 茎頂部からの幼植物再生に及ぼす培養器栓の影響

‘ホワイトワンダー’の無菌播種後7日目の実生の茎頂部（5mm）を外植体として用いた。供試培地はBM培地に1.0mg/ℓBAを添加したものをを用いた。培養器として試験管（ $\varnothing$ 20mm×120mm）を用い、これに培地を10mℓ入れ、2重のアルミホイル、ルミラーフィルム、またはミリラップフィルムで栓をした。試験管当り1外植体をBM培地に置床し、1処理区当り試験管10本とした。培養は20°C、5,000



1x昼光色蛍光灯、14時間照明下で行った。

#### 4. 培養器内CO<sub>2</sub>濃度の変動に及ぼす培養器栓の影響

‘ホワイトワンダー’の実生の茎頂を外植体として用いBM培地上で培養した。試験管当り1外植体を置床し、アルミフイルドで閉栓し、24°C、5,000 lx昼光色蛍光灯、14時間照明下で培養した。4週間後、正常シュート（第4-4表）を、それぞれBM培地を含む試験管に1本ずつ移植し、アルミフイルド、ルミラー、ミリラップの3種類のフィルムで閉栓した。栓の下部はセロテープで密封し、試験管とフィルムの隙間からのガス交換を抑えた後、移植前と同様の条件で培養を行った。

培養器内のCO<sub>2</sub>濃度を、培養2週間目に暗期開始後5.5、7.5、9.5時間目の3回および明期開始後1、2、5時間目の3回の計6回、3種類のフィルム毎にそれぞれ測定した。なお、試験管の気相容積は21mlであった。炭酸ガス測定は、実験1と同様の方法で行った。

#### 5. 培養器内エチレンガス濃度の変動に及ぼす培養器栓の影響

測定は、CO<sub>2</sub>測定に使用した同じ試料（第4-4表）を用い、アルミフイルド、ルミラー、ミリラップの3種類のフィルムで閉栓した試験管内の気相中エチレン濃度をガスクロマトグラフィーで測定した。測定は培養開始3週間目に、暗期開始後7時間目および明期開始後4時間目の2回行った。カラムは活性アルミナを、検出器には水素炎イオン化検出器（FID）を用い、カラム温度80°C、検出器温度125°Cとし、1回のサンプル量は0.5mlとした。

第4-4表 炭酸ガスおよびエチレンガス測定に供試した材料の生育状態

培養器栓	葉の状態	葉数（枚）	生体重（mg）	乾物重（mg）
アルミフイルド	正常	13	420	36
	水浸状	12	500	54
ルミラー	正常	12	380	47
	水浸状	7	330	43
ミリラップ*	正常	12	250	27
	水浸状	10	260	30

## 6. 培養器内温度の変動に及ぼす培養器栓の影響

20°C、5,000 lx、14時間明期の培養条件で、アルミフオイル、ルミラー、ミリラップの3種類のフィルムで閉栓した試験管内の培地面から1cm上部および試験管外の同じ高さでの温度変化を銅-コンスタント熱電対をデータ処理装置（サーモダックE, 江藤電気）に接続し測定、記録した。

## 7. 培養器内光環境に及ぼす培養器栓の影響

実験6と同じ培養条件で、上記の3種類のフィルムで閉栓した試験管内および栓をしなかった試験管内の培地面1cm上部の照度および光量子束密度を、照度センサー（IKS-15, 小糸製作所）および光量子束密度センサー（IKS-25, 小糸製作所）をデータ処理装置に接続して測定した。

## 8. 子葉のクロロフィル含量に及ぼす培養器栓の影響

BM培地を含む規格瓶に‘ホワイトワンダー’の種子を播種後、上記の3種類のフィルムで栓をし、実験6.と同条件の環境で8日間培養して得られた実生の子葉を材料とし、その生体重当りのクロロフィル含量を測定した。

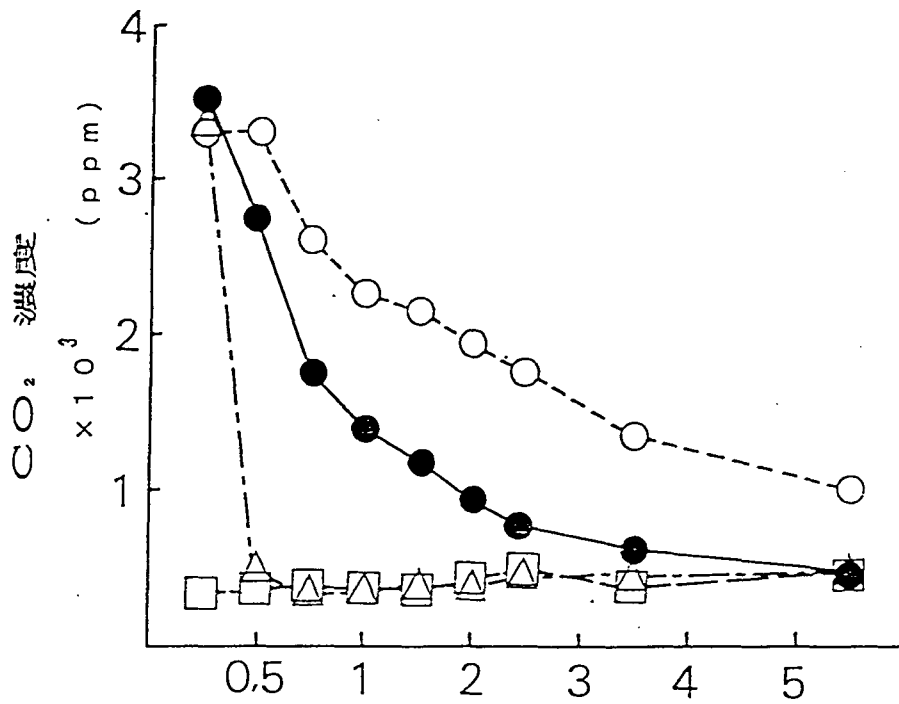
## 結果

### 1. 培養器のCO<sub>2</sub>換気回数に及ぼす培養器栓の影響（第4-2図）

ミリラップは外気とのガス交換能が極めて高く、次いで、アルミフオイル、ルミラーの順となった。ミリラップの換気回数は6.48回/時間で、アルミフオイルの0.54回/時間、ルミラーの0.29回/時間に比べて、12~20倍であった。ルミラーは極めて気密性が高く、2重のアルミフオイルの約1/2であった。

### 2. 下胚軸からのシュート分化に及ぼす培養器栓の影響（第4-5表）

シュート形成率およびシュート数は、アルミフオイルが最も良く、次いでルミラー、ミリラップの順となった。シュート形成率は、アルミフオイルとルミラーではほとんど差がなかったがミリラップでは劣り、60%であった。また下胚軸当りのシュート数では、アルミフオイルは、ルミラーの2倍以上となり、また、ルミラーとミリラップでは差が見られなかった。しかし、得られたシュー



第4-2図 培養器内のCO<sub>2</sub>濃度の推移

●-アルミフイル    ○-ルミラー  
 △-ミリラップ    □-培養器外

第4-5表 下胚軸切片からのシュート形成に及ぼす培養器栓の影響  
 (培養5週間)

培養器栓	シュート形成率 %	シュート数 <sup>z</sup>
アルミフイル	90 (18/20)	6.7
ルミラー	85 (17/20)	3.0
ミリラップ	60 (12/20)	2.8

z : シュート形成した下胚軸当りのシュート数

トはいずれの処理区においても水浸状を呈していた。

### 3. 茎頂部からの幼植物再生に及ぼす培養器栓の影響 (第4-6表)

正常個体率は、ミリラップ、アルミフイルム、ルミラーの順で高く、ミリラップでは90%が正常個体に生長したのに対し、アルミフイルムおよびルミラーは約半数が水浸状個体、または茎頂部と茎葉の区別が不明瞭であるような奇形の水浸状個体であった。

### 4. 培養器内CO<sub>2</sub>濃度の変動に及ぼす培養器栓の影響 (第4-3図)

3種類のフィルムを用いた培養器内のCO<sub>2</sub>の経時的变化を正常個体について測定した。アルミフイルム、ルミラーを用いたものは、炭酸ガス濃度は暗期開始後急激に上昇し、特にルミラーを用いた場合に極めて高い値を示し、暗期開始7.5時間後ではアルミフイルムの2倍以上、ミリラップの10倍以上となり、8,000 ppmを上回った。反対にアルミフイルムでは明期開始1時間後に、ルミラーでは3時間後に培養器外より低い値となり、その後も時間とともに低下した。ミリラップについては、暗期、明期を通して培養器外とほぼ同じ値で推移した。

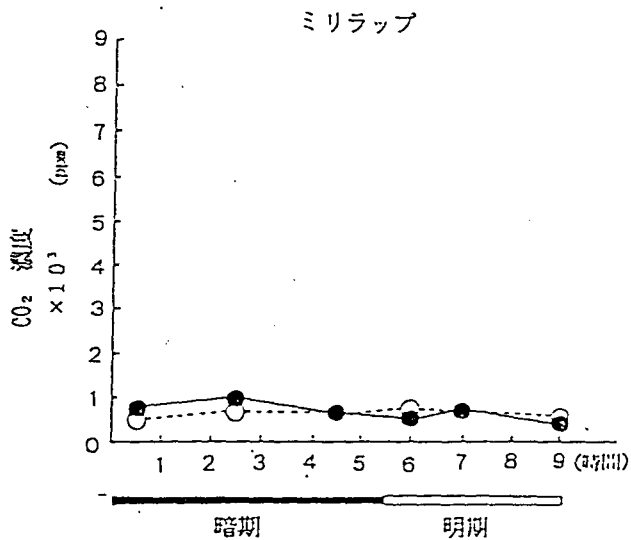
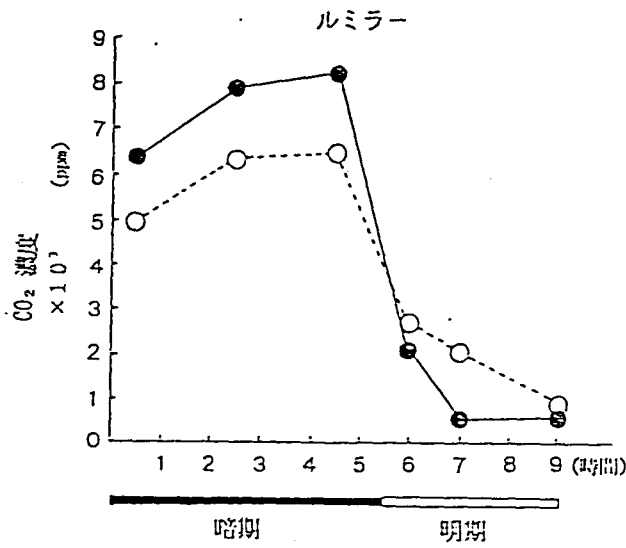
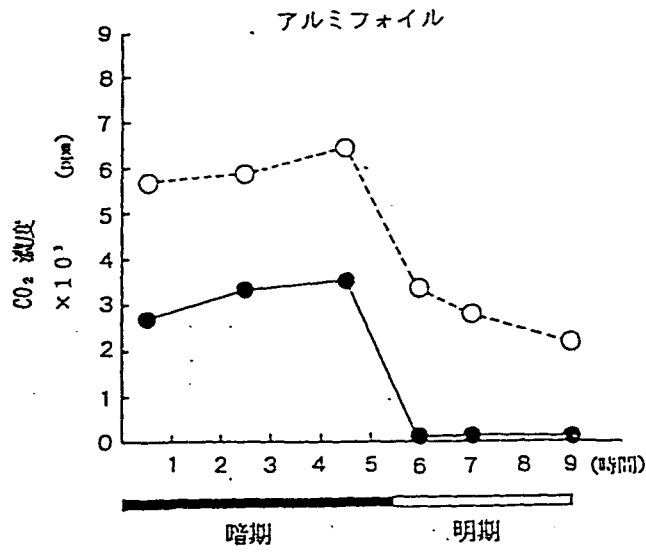
### 5. 培養器内エチレンガス濃度の変動に及ぼす培養器栓の影響 (第4-4図)

エチレン濃度はルミラーを用いた場合やや高い値を示し、次いでミリラップ、最も低かったアルミフイルムではルミラーの約半分であった。いずれのフィルム閉栓区でも明期の方が暗期よりエチレン濃度がやや高い傾向を示した。

第4-6表 茎頂部外植体からの幼植物再生に及ぼす培養器栓の影響  
(培養5週間)

培養器栓	正常個体率 %	水浸状個体率 %	葉数 <sup>z</sup>
アルミフイルム	50.0 (5/10)	50.0 (5/10)	6.9
ルミラー	44.4 (4/9)	55.6 (5/9)	5.4
ミリラップ	88.9 (8/9)	11.1 (1/9)	7.0

z : 1個体平均葉数



第4-3図 培養器内のCO<sub>2</sub>濃度の変動に及ぼす培養器栓の影響

● - 正常個体

○ - 水浸状

明期14時間、暗期10時間の周期で、測定開始は暗期5.5時間目とした。

## 6. 培養器内温度の変動に及ぼす培養器栓の影響 (第4-5図)

アルミフイル、ルミラー、ミリラップとも明期および暗期の温度変化はほぼ同様のパターンを示した。また、暗期では各培養器栓間で差は認められず、明期において遮光程度の大きいアルミフイルでやや低く推移したが、その差は1°C以内で、容器内の温度では3種類の栓の間で大きな差が見られなかった。

## 7. 培養器内光環境に及ぼす培養器栓の影響 (第4-7表)

3種類の栓をした培養器内の照度および光量子束密度は、透過率の最も高い(95%)ルミラーで最も高く、照度1,880 lx、光量子束密度28 (mol/m<sup>2</sup>)であり、続いてミリラップ、アルミフイルの順で、アルミフイル栓では、ルミラーの約1/3、ミリラップの半分程度であった。

## 8. 子葉のクロロフィル含量に及ぼす培養器栓の影響 (第4-8表)

子葉の全クロロフィル含量は、ルミラーで最も高く、生体重1g当たり78.9mgであり、アルミフイルおよびミリラップはともに20mg程度で、ルミラーの1/3程度であった。

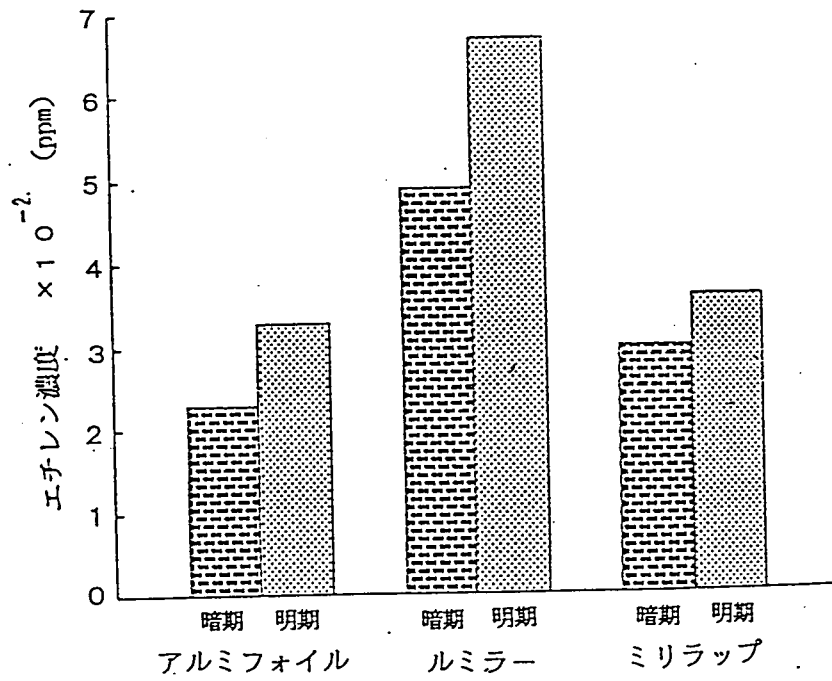
第4-7表 培養器内の光強度に及ぼす培養器栓の影響

培養器栓	光透過率 (%)	照度 (lx)	光量子束密度 (mol/m <sup>2</sup> )
アルミフイル	0	780	11
ルミラー	95	1880	28
ミリラップ <sup>a</sup>	38	1380	19
栓無し試験管内	100	1990	31

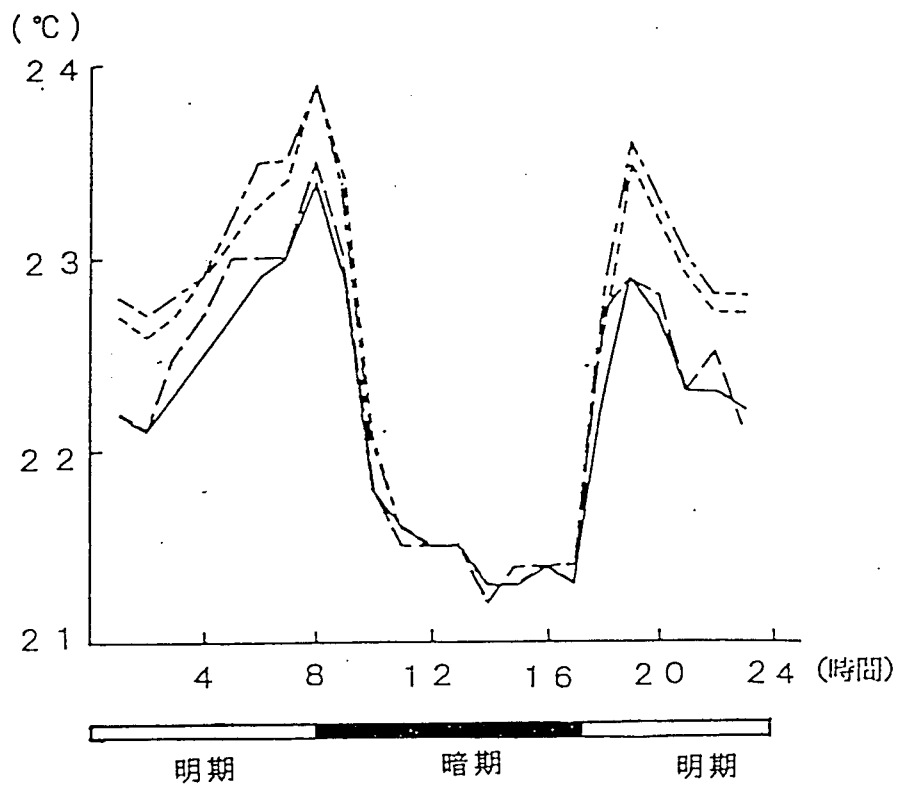
第4-8表 子葉のクロロフィル含量に及ぼす培養器栓の影響<sup>z</sup>  
(mg/F. W. g.)

培養器栓	クロロフィル a	クロロフィル b	全クロロフィル
アルミフイル	12.0	8.9	20.9
ルミラー	35.1	47.6	78.9
ミリラップ <sup>a</sup>	12.6	11.3	23.9

z: 第4-2表参照



第4-4図 培養器内エチレンガス濃度の変動に及ぼす培養器栓の影響



第4-5図 培養器内温度に及ぼす培養器栓の影響

— アルミフォイル      - - - - ルミラー  
 - - - - ミリラップ      - - - - 培養器外

### 第3節 正常個体および水浸状個体を有する培養器内のガス環境の比較

#### 材料および方法

##### 1. 培養器内炭酸ガス

‘ホワイトワンダー’の正常または水浸状の葉を展開しているシュート（第4-4表）を、それぞれBM培地を含む試験管に1本ずつ移植し、アルミフイルム、ルミラー、ミリラップの3種類のフィルムで閉栓し、栓の下部をセロテープで密封し、試験管とフィルムの隙間からのガス交換を抑えた後、移植前と同様の条件で培養を行った。

培養器内の炭酸ガス濃度の測定機器および測定方法は第2節-1に準じた。

##### 2. 培養器内エチレンガス

エチレンガス測定については、上記の炭酸ガスの実験と同じ材料（第4-4表）を用い、測定機器および測定方法は第2節-5に準じた。

#### 結果

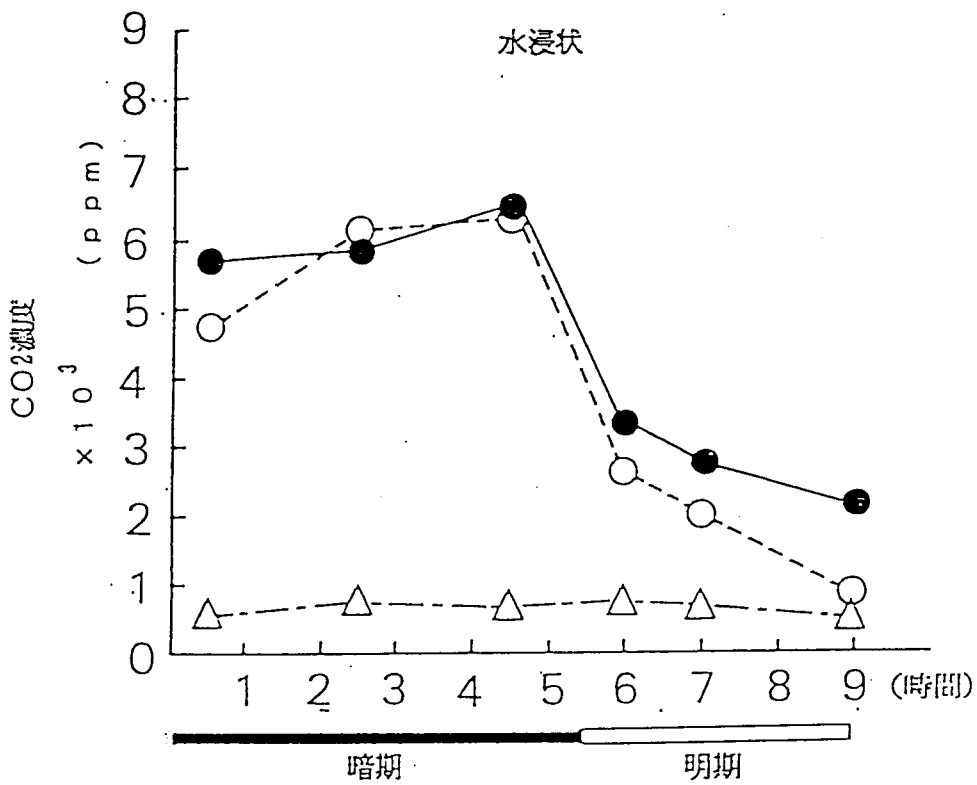
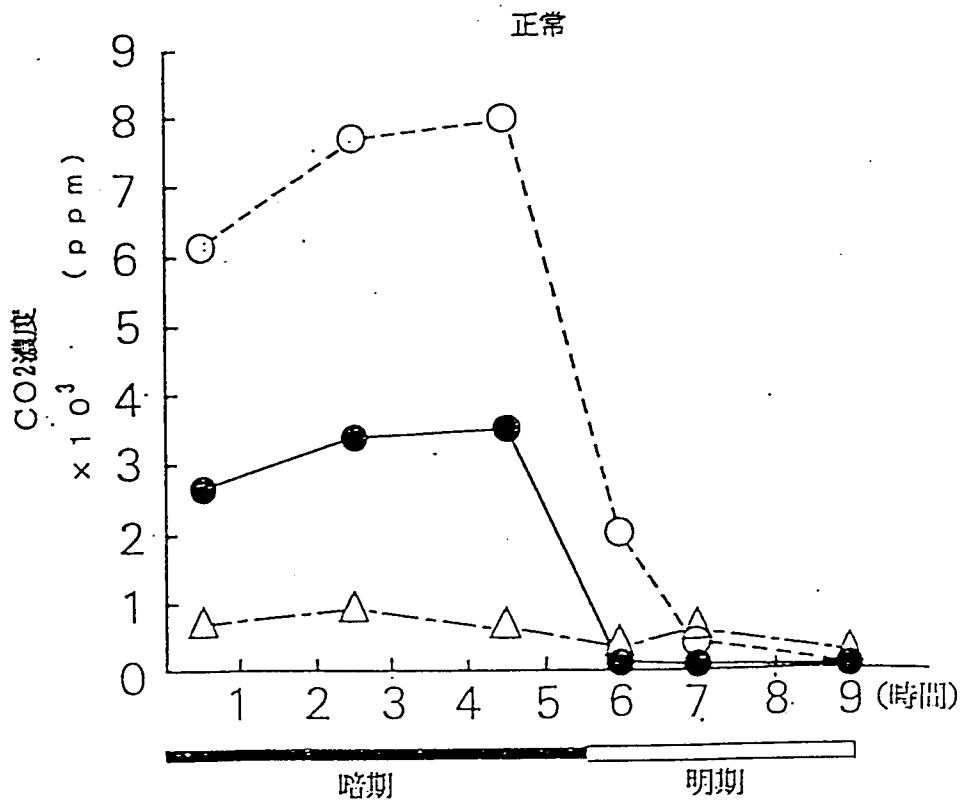
##### 1. 培養器内炭酸ガス（第4-6図）

3種類のフィルムを用いた培養器内の炭酸ガスの経時的変化を正常個体および水浸状個体について測定した。水浸状個体においては、暗期では正常個体と同様に、炭酸ガス濃度は上昇し、アルミフイルムでは正常葉の場合より高濃度となり、6,500ppm程度まで上昇した。また明期では正常個体と同様に時間とともに減少したが、正常葉と比較した場合、減少は緩やかで、明期開始5時間後でも、いずれの区においても培養器内炭酸ガス濃度が培養器外より下回ることはなかった。ミリラップでは正常葉の場合と同じく、明期、暗期を通して培養器外とほぼ同じ値で推移した。

##### 2. 培養器内エチレンガス（第4-9表）

正常および水浸状個体のエチレン濃度は、いずれの個体でもルミラーを用いた場合やや高い値を示した。暗期の測定では、正常個体と水浸状個体の間で、ミリラップでは大きな差が認められたが、アルミフイルム、ルミラーでは差はほとんど認められなかった。明期ではアルミフイルム、ルミラーおよびミリラ





第4-6図 正常個体と水浸状個体培養中の培養器内のCO<sub>2</sub>濃度の変動  
 ●-アルミフイル ○-オールミラー △-ミリラップ

ップいずれも、正常葉の方が高い値を示し、特にその傾向はルミラー、ミリラップで著しかった。

#### 第4節 水浸状個体の正常個体への回復の試み

##### 材料および方法

##### 1. 培養器栓の影響

‘ホワイトワンダー’の下胚軸切片をアルミフオイル、ルミラー、ミリラップフィルムでそれぞれ閉栓した培養器内で培養して得られた水浸状化シュートをBM培地に移植した。移植後の培養器栓は、シュート分化時にアルミフオイルを用いたものについては3等分し、アルミフオイル、ルミラー、ミリラップの3種類の栓を使用し、ルミラーおよびミリラップの栓で分化したものについては、引き続き同じ栓を用いて培養した。

##### 2. ゲルライトおよびマンニトール濃度の影響

第4節-1のアルミフオイルで栓をした区で得られた下胚軸由来の水浸状シュートを用いた。培地は、BM培地のゲル化剤のゲルライト濃度を0.1、0.2、0.4%に改変した3処理区と、BM培地に50または100mMのマンニトールを添加した2処理区の計5処理区を設けた。シュートは、1試験管に2~3本置床し、2重のアルミフオイルで栓をし、1処理区当り10本とした。

第4-9表 エチレンガス濃度に及ぼす培養器栓の影響

培養器栓	供試個体	暗期 (ppm)	明期 (ppm)	平均 (ppm)
アルミフオイル	正常個体	0.023	0.033	0.028
	水浸状個体	0.024	0.027	0.026
ルミラー	正常個体	0.049	0.067	0.055
	水浸状個体	0.047	0.036	0.042
ミリラップ	正常個体	0.030	0.036	0.033
	水浸状個体	0.006	0.014	0.010

### 3. ジベレリン (GA<sub>3</sub>) およびアブシジン酸 (ABA) の影響

第4節-1のアルミフイルで栓をした区で得られた下胚軸由来の水浸状シュートを用いた。培地はBM培地に0.1、1.0、10.0mg/ℓ GA<sub>3</sub>、および0.1、1.0mg/ℓ ABAをそれぞれ添加した区および無添加区を設け、1試験管に水浸状シュート1~2本ずつ置床し、2重のアルミフイルで栓をした。1処理区当り試験管10本とした。

### 4. フロリジンの影響

フロリジン (Nacalai tesqu) はリンゴ、ナシ等の樹皮から得られる配糖体で、リグニン合成の促進物質であると報告されている (Phan・Hegedus, 1986)。材料には第4節-1のアルミフイルで栓をした区で得られた下胚軸由来の水浸状シュートを用いた。培地は、BM培地に0、0.1、1.0、10.0mg/ℓ フロリジンをそれぞれ添加した。1試験管に水浸状シュート1本ずつ置床し、2重のアルミフイルで栓をした。1処理区当り試験管10本とした。

### 5. 光源の種類および培養温度の影響

材料には第4節-1のアルミフイルで栓をした区で得られた下胚軸由来の水浸状シュートを用いた。培地は、BM培地を用い、1試験管に水浸状シュート1~2本ずつ置床し、2重のアルミフイルで栓をした。培養条件は①20℃、蛍光灯、②20℃、メタルハライドランプ (陽光ランプ) ③25℃、蛍光灯の3条件を設けた。いずれの光源も、4,000 lx、16時間照明とした。1処理区当り試験管10本とした。

## 結果

### 1. 培養器栓の影響 (第4-10表、第4-7図)

水浸状シュート移植、5週間目では、完全に正常個体に回復したシュートは存在しなかった。またどの栓を用いた場合でも半数近くのシュートが褐変または黄変し、枯死した。特に、ルミラーからルミラーへ移植したシュートは75%が枯死した。回復の兆しである、茎葉の緑色が濃くなるものの割合が高かったのは、アルミフイルからルミラーに移植した区で33.3%であった。しかし7週間後の観察では、ミリラップからミリラップに移植し、緑色が濃くなっていた3個

体が、完全に正常個体に回復した。

## 2. ゲルライトおよびマンニトール濃度の影響 (第4-11表)

いずれの方法においても完全な正常個体に回復したシュートは認められなかった。どの培地においても、1/3~1/4が褐変枯死し、0.1%ゲルライトの培地では、100%枯死した。緑色が濃くなる回復の兆しを示す個体の割合が高かったのは、0.4%ゲルライトおよび50mMマンニトールであったが、その後も完全には回復が認められなかった。

第4-10表 再分化シュート移植後の生長および水浸状化に及ぼす培養器栓の影響 (移植後5週間)

移植前	培養器栓 移植後	濃緑色個体率 %	水浸状個体率 %	褐変枯死率 %
アルミフویل	アルミフویل	23.5 (4/17)	52.9 (9/17)	23.5 (4/17)
	ルミラー	33.3 (6/18)	16.7 (3/18)	50.0 (9/18)
	ミリラップ*	16.7 (3/18)	27.8 (5/18)	55.6 (10/18)
ルミラー	ルミラー	0	25.0 (3/12)	75.0 (9/12)
ミリラップ*	ミリラップ*	17.6 (3/17)	41.2 (7/17)	41.7 (7/17)

第4-11表 再分化シュート培養における水浸状回復に及ぼすゲルライトおよびマンニトール濃度の影響

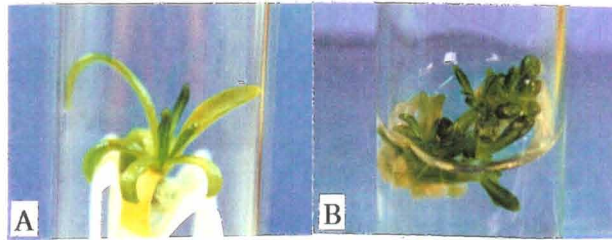
(培養5週間)

	濃度	濃緑色個体率 %	水浸状個体率 %	褐変枯死率 %	カルス化率 %
ゲルライト	0.1 (%)	0 (0/20)	0 (0/20)	100.0 (20/20)	0 (0/20)
	0.2	22.7 (5/22)	22.7 (5/22)	36.4 (8/22)	18.1 (4/22)
	0.4	58.3 (14/24)	8.3 (2/24)	29.2 (7/24)	4.2 (1/22)
マンニトール	50 (mM)	54.5 (12/22)	4.5 (1/22)	36.4 (8/22)	4.5 (1/22)
	100	33.3 (8/24)	41.7 (10/24)	25.0 (6/24)	0



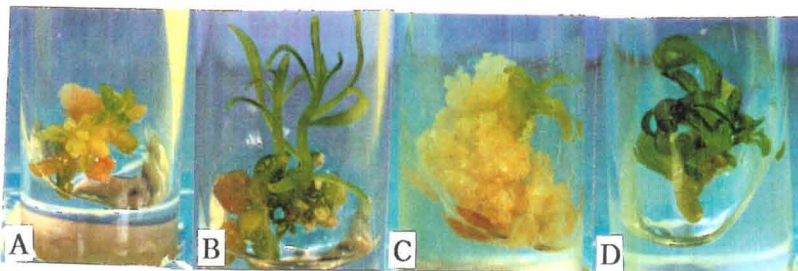
第4-1図 培養器栓種類

A : ミリラップ B : ルミラー C : アルミフイル



第4-7図 培養器内で形成されたシュート

A : 正常シュート B : 水浸状シュート



第4-8図 水浸状からの回復に及ぼすジベレリン ( $GA_3$ ) と  
アブシジン酸 (ABA) の影響

A : 無添加

B :  $1\text{mg}/\text{L}$   $GA_3$  添加

C :  $10\text{mg}/\text{L}$   $GA_3$  添加

D :  $1\text{mg}/\text{L}$  ABA 添加



第4-9図 水浸状からの回復に及ぼすフロリジンの影響

A : 無添加

B :  $0.1\text{mg}/\text{L}$  添加

C :  $1\text{mg}/\text{L}$  添加

D :  $10\text{mg}/\text{L}$  添加

### 3. ジベレリン (GA<sub>3</sub>) およびアブシジン酸 (ABA) の影響 (第4-12表、第4-8図)

GA<sub>3</sub>を添加した培地では、いずれの濃度においても、約半数において節間伸長が認められ、通常のシュートの3~5倍程度のシュート長となったが、緑色が濃くなったのは0.1mg/l添加した場合だけで、正常個体に回復したものはなく、GA<sub>3</sub>濃度が高くなるにつれて、シュートがカルス化する割合が増加した。また、完全に正常個体にはならなかったが、ABAでは、0.1mg/l添加により約80%が緑色が濃くなり、水浸状の程度が軽減された。

### 4. フロリジンの影響 (第4-13表、第4-9図)

フロリジン添加により、緑色が濃くなり、やや回復したと思われる個体の割合は増加したが、完全に正常個体と認められるシュートはなかった。1.0mg/l添加では90%が明らかに緑色が濃くなり、回復の兆しを示した。

第4-12表 再分化シュート培養における水浸状回復に及ぼすGA<sub>3</sub>およびABAの影響 (培養5週間)

	濃度 (mg/l)	濃緑色個体率 %	水浸状個体率 %	節間伸長個体率 %	褐変個体率 %	カルス化率 %
無処理区		27.8 (5/18)	61.1 (11/18)	0 (0/18)	5.6 (1/18)	5.6 (1/18)
GA <sub>3</sub>	0.1	13.3 (2/15)	20.0 (3/15)	40.0 (6/15)	13.3 (2/15)	13.3 (2/15)
	1.0	0 (0/15)	26.7 (4/15)	46.7 (7/15)	0 (0/15)	26.7 (4/15)
	10.0	0 (0/12)	0 (0/12)	41.5 (5/12)	8.3 (1/12)	60.0 (6/12)
ABA	0.1	81.3 (13/16)	12.5 (2/16)	0 (0/16)	6.3 (1/16)	0 (0/16)
	1.0	20.0 (2/10)	40.0 (4/10)	0 (0/10)	20.0 (2/10)	20.0 (2/10)

第4-13表 再分化シュート培養における水浸状回復に及ぼすフロリジンの影響 (培養5週間)

濃度 (mg/l)	濃緑色個体率 %	水浸状個体率 %	褐変個体率 %	発根率 %
0	10 (1/10)	90 (9/10)	0 (0/10)	0 (0/10)
0.1	40 (4/10)	40 (4/10)	20 (2/10)	10 (1/10)
1.0	90 (9/10)	10 (1/10)	0 (0/10)	10 (1/10)
10.0	30 (3/10)	60 (6/10)	10 (1/10)	30 (3/10)

## 5. 光源の種類および培養温度の影響 (第4-14表)

20℃培養で光源が異なる場合、メタルハライドランプの方が蛍光灯よりも、褐変枯死やカルス化するシュートの割合が高く、蛍光灯の方が回復の兆しである緑色が濃くなる個体の割合は高かった。同じ蛍光灯を光源とし、培養温度が異なる場合では、24℃で培養したシュートは80%褐変枯死あるいはカルス化し、緑色が濃くなる個体は認められなかった。本実験では、完全に正常個体に回復したシュートは認められなかった。

## 第5節 再生した正常個体と水浸状個体の組織形態学および生化学的比較

### 材料および方法

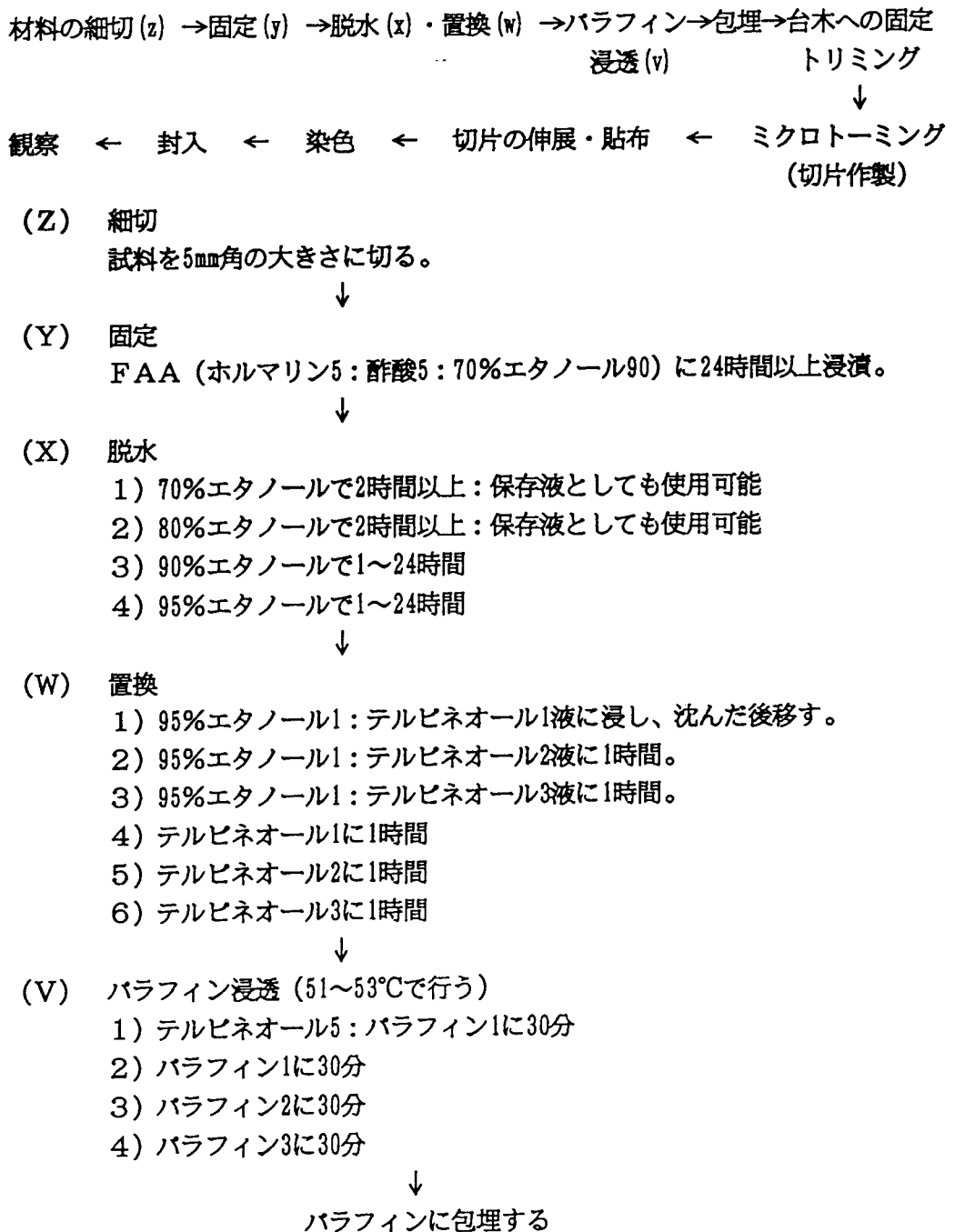
#### 1. 光学顕微鏡および走査型電子顕微鏡 (SEM) による葉の断面、表面および気孔の観察

1) 光学顕微鏡による観察：正常および水浸状葉のプレパラートはパラフィン切片法により作成した。パラフィン切片は第4-10, 11図に示す手順で作成した。

2) SEMによる観察：正常葉および水浸状葉の試料は液体窒素で急速凍結、凍結乾燥を行った後、イオンスputtaコーティング装置を用いて金蒸着した。試料はSEM (日立、S-2400) を用いて観察した。

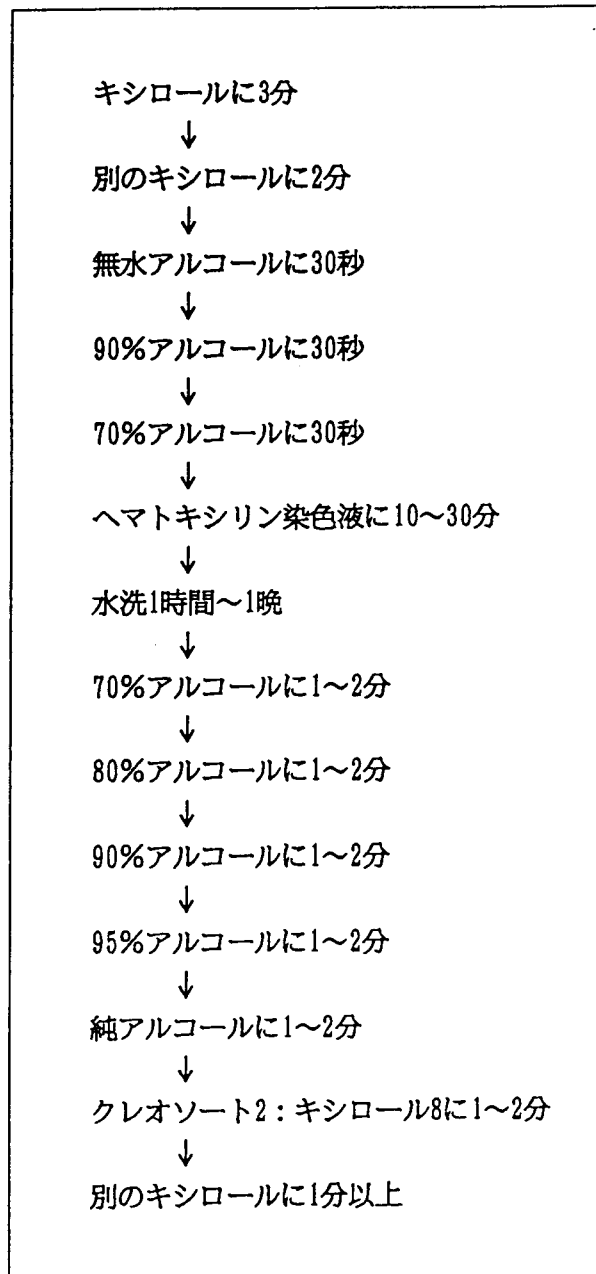
第4-14表 再分化シュート培養における水浸状回復に及ぼす光源および培養温度の影響  
(培養5週間)

光源	培養温度 (°C)	濃緑色個体率 %	水浸状個体率 %	褐変枯死率 %	カルス化率 %
蛍光灯	20	27.8 (5/18)	61.6 (11/18)	5.6 (1/18)	5.6 (1/18)
	24	0 (0/10)	20.0 (2/10)	60.0 (6/10)	20.0 (2/10)
メタルハライド ランプ	20	11.8 (2/17)	52.9 (9/17)	23.5 (4/17)	11.8 (2/17)



第4-10図 パラフィン切片作製法の手順





第4-11図 バラフィン切片の染色の手順

## 2. 正常個体と水浸状個体の可溶性タンパクおよびパーオキシダーゼアイソザイムの比較

ポリアクリルアミドゲル・スラブ電気泳動装置 (ATTO、AE-6200) を用いて、第1-7図に示した方法により、可溶性タンパクおよびパーオキシダーゼアイソザイム電気泳動を行った。

1) 可溶性タンパク：雪まつり’ および ‘リトルゼムイエロー’ の水浸状シュート、栽培株の開花前本葉および開花後の八重咲と一重咲株の本葉を用いた。

2) パーオキシダーゼアイソザイム：① ‘雪まつり’ および ‘リトルゼムイエロー’ の水浸状シュート、栽培株の開花前本葉、② ‘ホワイトワンダー’ の完全に水浸状化した4個体と、水浸状であるが正常に回復しつつある3個体の計7個体のシュートを用いた。

## 結果

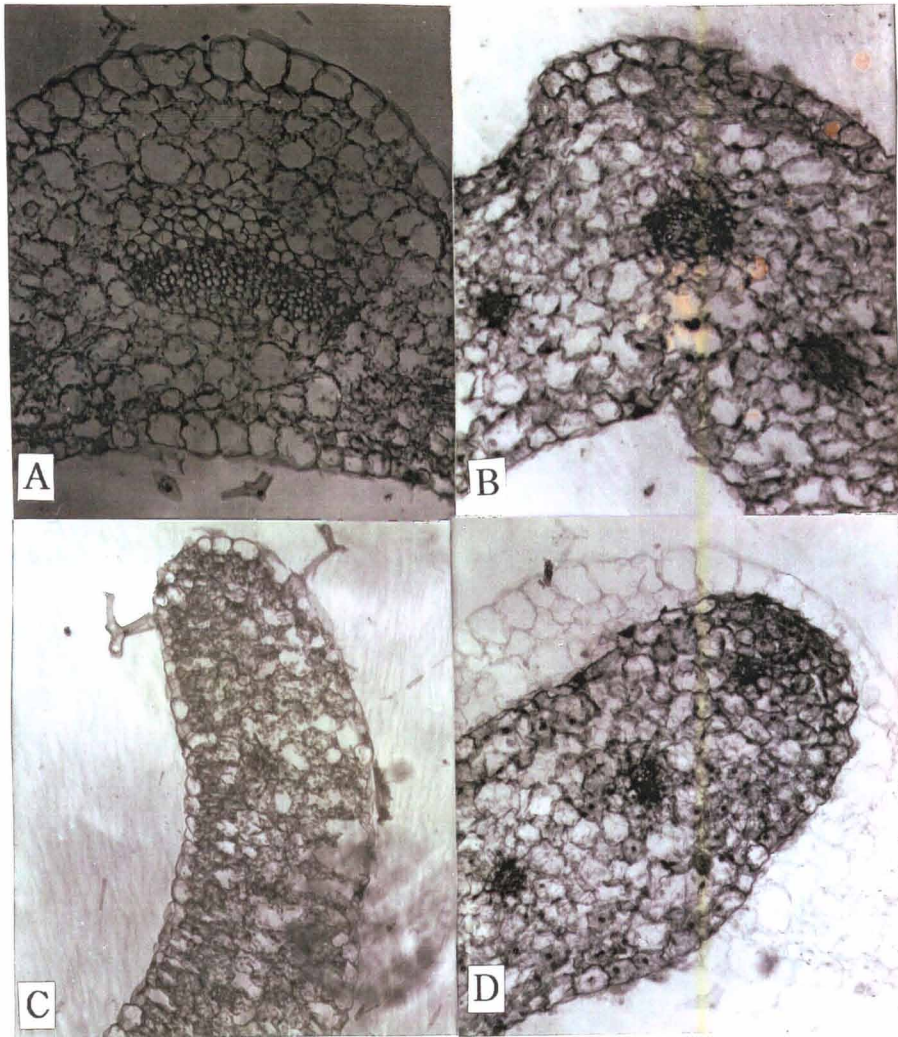
### 1. 光学顕微鏡および走査型電子顕微鏡 (SEM) による葉の断面、表面および気孔の観察

#### 1) 光学顕微鏡による観察 (第4-12, 13図)

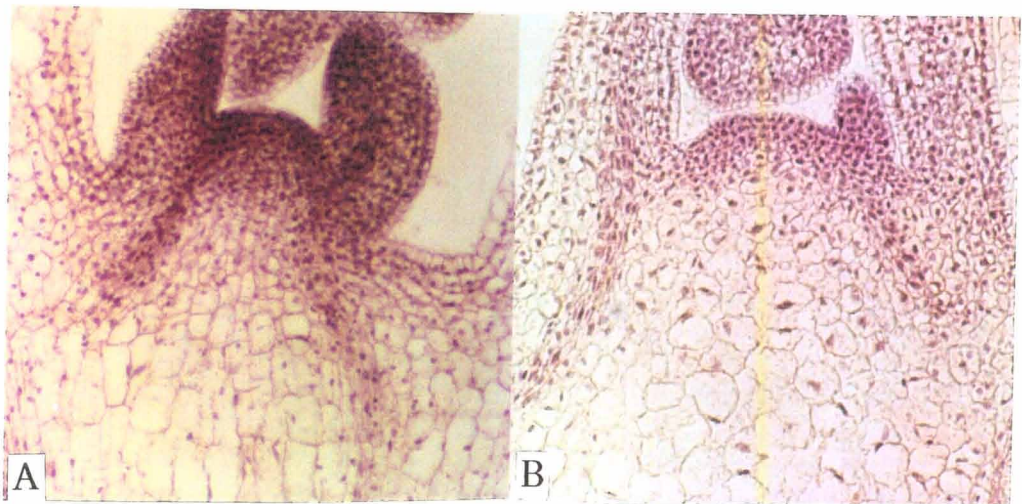
水浸状葉の細胞は、正常葉の細胞に比べ、全体に大きな液胞化した不規則な形の細胞で占められ、柵状組織と海面状組織の区別がはっきりしなかった。また、大きな細胞間隙が認められ、維管束の大きさや位置も不規則で未発達であった。また、生長点付近では正常のものは、やや四角形の小さな細胞で構成されているのに対し、水浸状個体では小さな細胞の形成する層が薄く、楕円形の大きな細胞が多く観察され、生長点の下部に細胞間隙が認められた。

#### 2) SEMによる観察 (第4-14, 15図)

水浸状葉は、外観は光沢を帯びて透明感があり、葉の肥厚が見られた。水浸状葉の断面 (第4-14図-B) は正常葉 (第4-14図-A) の5倍程度に肥大し、維管束は認められたが、細胞の大きさが不均一であった。正常葉の表皮 (第4-15図-A、C) は鱗状の表皮細胞が形、大きさとも均一で規則的に配列しているのに対し、水浸状葉の表皮 (第4-15図-B、D) では、表皮細胞が不規則に肥大し、表面の凹凸が正常葉と比較して著しかった。気孔についてみると、裏面の気孔数が表面に比べて多いという傾向は、正常および水浸状の葉の双方に共通に見られたが、



第4-12図 パラフィン切片による葉の縦断面  
 A、C：正常葉      B、D：水浸状葉



第4-13図 パラフィン切片による生長点近傍の縦断面  
 A：正常      B：水浸状

水浸状の葉では気孔の分布が一様でなく、数も正常葉に比べて少ない傾向を示した。また、気孔の形態を見ると、正常葉の気孔（第4-15図-C、E）と比較して、水浸状葉の気孔（第4-15図-D、F）は孔辺細胞が肥大する傾向を示していた。また、正常葉の気孔が表皮細胞とほぼ同じ水平面に位置しているのに対し、水浸状葉の気孔は、表皮細胞から隆起または陥没しているものが多く観察された。

## 2. 正常個体と水浸状個体の可溶性タンパクおよびパーオキシダーゼアイソザイムの比較

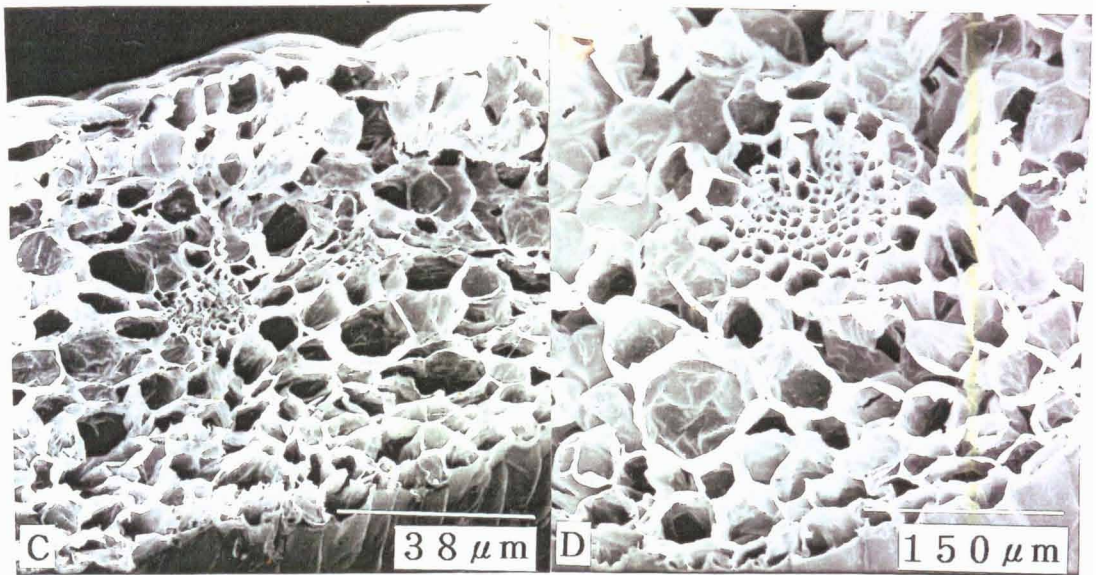
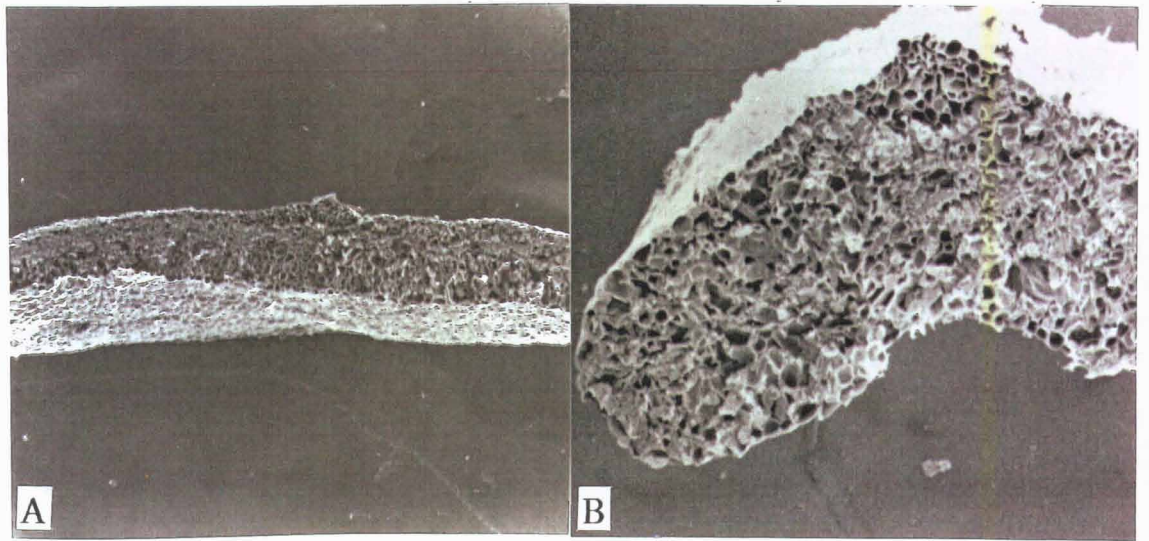
### 1) 可溶性タンパク（第4-16図）

‘雪まつり’および‘リトルゼムイエロー’の両種の水浸状シュートに、正常葉では認められないバンドaが共通して存在した。

### 2) パーオキシダーゼアイソザイム

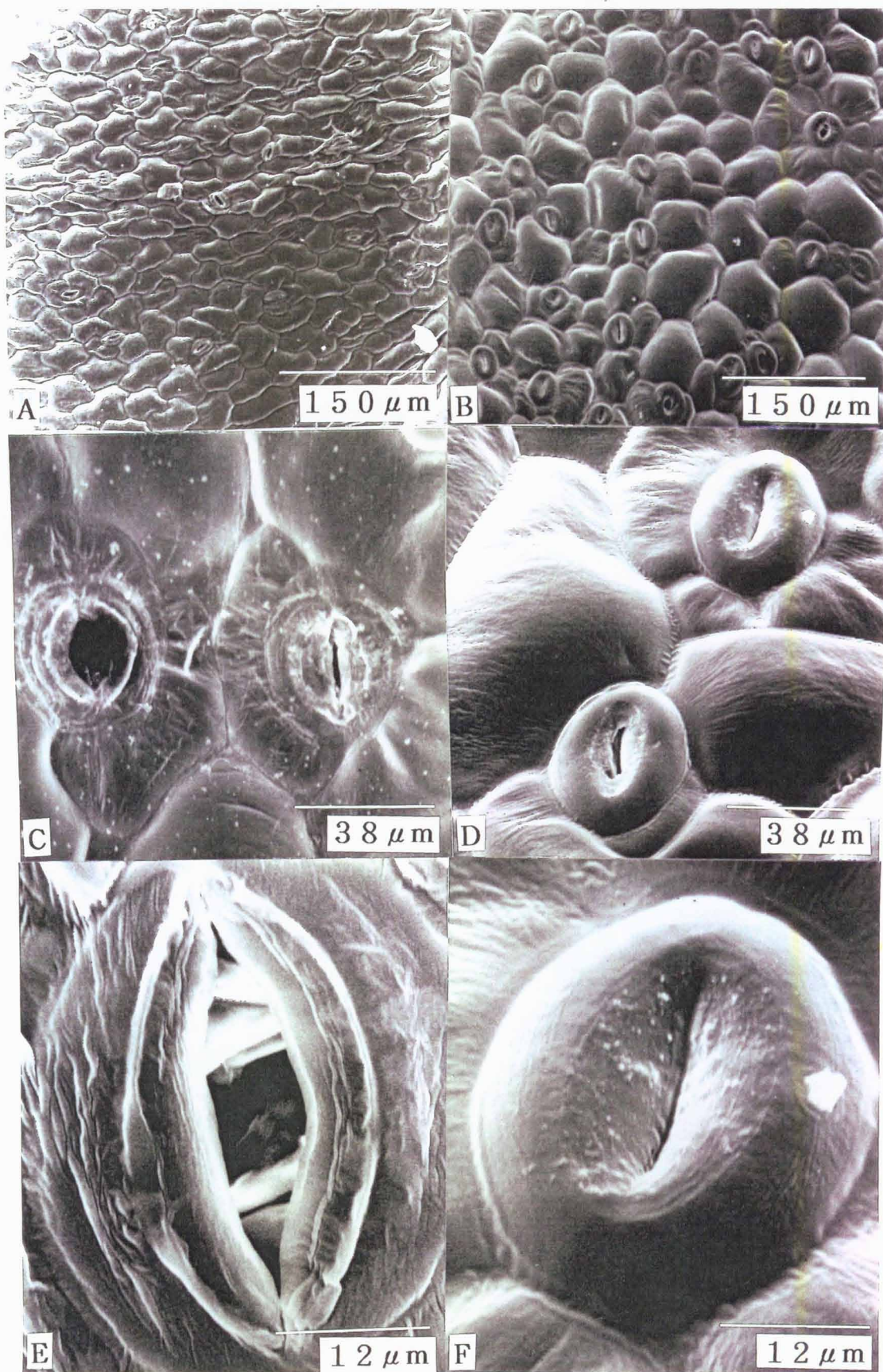
(1) ‘雪まつり’および‘リトルゼムイエロー’（第4-17図）：水浸状シュートにのみ存在する特有のバンドa、bがあり、水浸状シュートのバンドは正常シュートのバンドより太く、強く活性染色された。

(2) ‘ホワイトワンダー’（第4-18図）：水浸状シュートに特異的なバンドは認められなかったが、いずれのバンドにおいても、水浸状個体の方が、回復しつつある個体よりも強く活性染色された。



第4-14図 SEMによる葉の縦断面

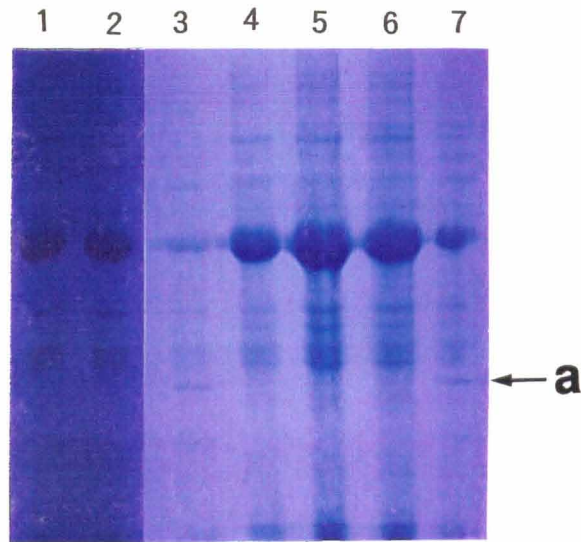
A、C：正常葉      B、D：水浸状葉



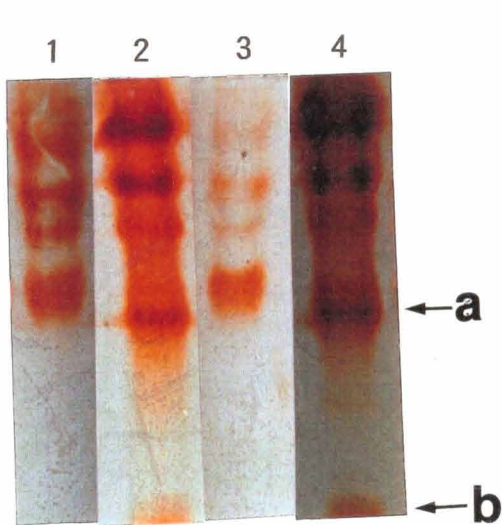
第4-15図 SEMによる気孔

A、C、E：正常葉

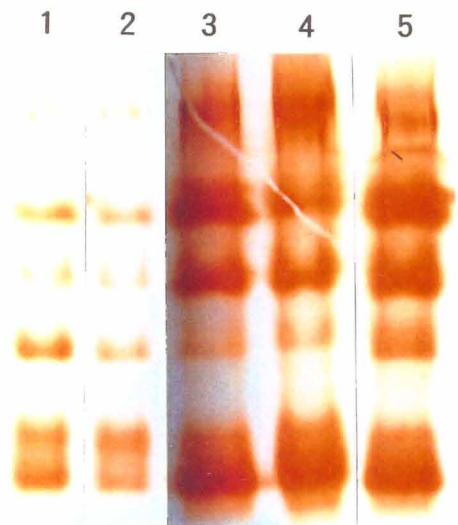
B、D、F：水浸状葉



第4-16図 正常葉と水浸状葉の可溶性タンパクのサイモグラム  
 1: 'リトルゼムイエロー' 一重    2: 'リトルゼムイエロー' 八重  
 3: 'リトルゼムイエロー' 水浸状    4: '雪まつり' 一重  
 5: '雪まつり' 八重    6: '雪まつり' 開花前  
 7: '雪まつり' 水浸状



第4-17図 正常葉と水浸状葉のパーオキシダーゼ  
 アイソザイムのサイモグラム  
 1: '雪まつり' 正常    2: '雪まつり' 水浸状  
 3: 'リトルゼムイエロー' 正常    4: 'リトルゼムイエロー' 水浸状



第4-18図 'ハイトンカ' の正常に回復する兆しのある  
 シュートと水浸状シュートのパーオキシダーゼアイソザイムの  
 サイモグラム  
 1: 正常に回復しつつあるシュート  
 3、4、5: 水浸状シュート

## 考察

組織培養において *in vitro* での器官形成は、一般に供試植物の採取時の生育状態、葉や茎の齢や生理状態によって大きく影響されること、また形成された器官や組織の生理生態的な特性は培養器内外の環境条件により大きく異なることが予想される。そこで本研究では、材料採取時の植物体の生育状態（前歴）が *in vitro* でのシュート形成に及ぼす影響を見るために、供試材料の育成時の施肥条件と光環境の影響について検討した。まず施肥条件の影響をみると、供試材料の生育状態は、園試処方に準じた大塚液肥の1/2倍液を施用した場合は、1/4倍液よりも植物体の生育が良好であり、*in vitro*のシュート形成は‘銀潮’では1/2倍濃度区の方がやや良好な形成率を示した。しかしながら‘雪まつり’では、大きな差は見られなかった。このように施肥条件に対する *in vitro* での器官形成の反応に品種間差が見られた。

また遮光処理の影響についてみると、栽培期間中の照度が晴天時には10K lx以上を記録し、無遮光区では強光による生育の抑制が認められ、50%遮光区が最もよい生育を示した。これは秋から翌春にかけて栽培されるストックにとって無遮光区の光強度は強すぎたためと考えられ、光合成能の指標となる葉内のクロロフィル量が遮光処理により増加する傾向を示したことから伺える。このため、‘銀潮’では遮光処理を施すことにより、シュート形成率が向上する傾向が見られた。しかしながら一方、‘雪まつり’では遮光処理によりシュート形成率が低下する傾向を示し75%遮光区ではシュート形成は認められず、供試植物のクロロフィル量と器官形成の間に相関は認められなかった。

上記の観察結果は培養前の材料の生育環境および栽培条件の違いにより培養中の外植体の反応（シュート形成）が異なること、そしてその程度は品種間で極めて異なることを示唆していた。従って、それぞれの品種に好適な生育条件を整えることが *in vitro* の器官形成率を向上させ、大量の種苗を生産する上で大切であることを示唆している。

次いで器官形成および形成された器官の生理生態的特性に及ぼす培養環境の影響についてみると、培養器内環境（光、温度、湿度、CO<sub>2</sub>、エチレンなど）は培養器の形、容積、培地形態、培地量および培養器の栓の種類によって異なり、特に培養器栓の通気性の程度により大きく変化することが知られている。古在



ら (1986b) は試験管内のガス環境は、炭酸ガスをトレーサーとした場合、培養器のガス換気回数 (gas changes/hour) によって左右され、同一容器の場合、培養器栓の種類によりガス交換能に違いがみられ、プラスチック、発泡シリコンゴム、およびアルミフイルを用いた場合では、プラスチック>発泡シリコンゴム>アルミフイルの順に炭酸ガス換気回数が小さくなることを報告している。

本実験においても、換気回数の小さい (通気性の低い) アルミフイルおよびルミラーを培養器栓に用いた場合では、CO<sub>2</sub>濃度は暗期で極めて高くなり、一方、明期では、培養器外のCO<sub>2</sub>濃度以下になるという富士原ら (1987) や土井ら (1989) の実験結果と同様の傾向を示した。これらのことより、換気回数の低い培養器栓を用いた場合の培養器内の植物体は、明期での光合成活動が、極端なCO<sub>2</sub>不足のため抑制されていること、および暗期においては呼吸による酸素濃度低下とCO<sub>2</sub>濃度の極端な上昇による生育阻害が示唆された。富士原ら (1987) は、プラスチックキャップを培養栓に用いて、観葉植物の培養小植物体を入れた容器内CO<sub>2</sub>の1日の経時的変化を調べたところ、明期では90ppm以下と外気のほぼ1/4に低下し、暗期に入ると3,000から9,000ppmと急激に上昇することを報告している。また土井ら (1989) もラン等を用いた実験により、培養器内のCO<sub>2</sub>濃度変化が同様な傾向を示すことを明らかにしている。また培養器内の酸素濃度の植物体の生育に及ぼす影響についての報告は少ないが、田中ら (1991) のキクを用いた培養では、酸素濃度を10%程度に制御すると光呼吸が抑制され生育が促進されるが、5%以下にした場合では生育が抑制されることを報告しており、他の植物においても暗期における高CO<sub>2</sub>、低O<sub>2</sub>濃度が植物の生育を抑制することが示唆された。この点、通気性の高いミリラップフィルムを培養器栓に用いた場合では、換気回数が高いため、培養器内外の空気が容易に交換されて、明期、暗期を通して濃度の変動が小さくほぼ一定であった。

培養器内におけるCO<sub>2</sub>以外の環境要因として、培養器内の温度、光強度および湿度などが考えられる。温度環境については、この3種類の培養器栓を用いた試験管内の温度の差は1日を通して1°C以内であり、容器内の温度環境に関しては大きな差は見られなかった。一方、光環境は、3種類の培養器栓をした試験管内の照度および光量子束密度は、透過率の最も高い (95%) ルミラーで最も大きく、

続いてミリラップ（透過率38%）、アルミフイル（透過率0）の順で、アルミフイル栓をした試験管内は散乱光だけが入射するため、ルミラーを用いた場合の50%以下であった。また、この光環境は、培養植物体のクロロフィル含量にも影響すると考えられ、3種類の栓を用いて培養したところ、透過率の最も高かったルミラーを用いた培養器内の子葉のクロロフィル含量が最も高い値を示し、アルミフイルおよびミリラップはルミラーの1/3程度であり、栓を変えることがクロロフィル含量に影響し、また間接的には培養植物体の光合成能力にも影響することが予想される。

ところで培養時においてしばしば観察される葉や茎、シュートの生理的、形態的異常、中でも葉や茎が肥厚し膨軟になり、浸水状態を呈する現象（一般に水浸状化現象と呼んでいる）は再生植物の順化を著しく困難なものにする。培養器内環境と水浸状化シュート発生の関係については、タバコの茎切片の培養の場合、水浸状発生率は培養器栓の種類によって異なり、綿栓→金属キャップ→アルミフイルの順で増加する傾向を示した（斉藤, 1991）。本実験の茎頂培養では、水浸状発生率はルミラー→アルミフイル→ミリラップの順で低下し、通気性の高いミリラップを使用することにより約90%が正常個体として生長し、水浸状化が抑制されることが明らかとなった。これは、ミリラップでは他の培養器栓と比較し、換気回数が極めて高くなるため、明期のCO<sub>2</sub>の急激な減少と暗期の異常な蓄積が緩和されるとともに試験管内の湿度が低く保たれることによるものと思われる。

正常個体または水浸状個体を有する培養器内のCO<sub>2</sub>濃度の変化は、暗期では両者ともはっきりした上昇傾向を示し、一方、明期では正常個体は著しいCO<sub>2</sub>濃度の低下を示したが、水浸状個体では濃度の低下は緩やかであった。このことより、水浸状個体の光合成能は正常個体と比較して低いことが示唆された。水浸状化発生と強い相関がみられる培養器内の湿度は、培地の水ポテンシャルと関連し、水ポテンシャルは培地、糖およびゲル化剤の濃度によって制御されている（古在ら, 1986a; 富士原, 1991）が、外気との換気の種類によっても大きく変動することが予想される。本実験で、ミリラップを培養器栓として用いた場合では、他の栓に比べて培地からの水分蒸発量が多く培地量の減少が著しいことより、培養器内の湿度は相対的に低く保たれていることが予想された。

また光環境と水浸状化との関係についてみると、本実験では相対的に光強度の低いミリラップ区（透過率38%）で正常個体が多く観察され、再生植物体のクロロフィル量と水浸状化との関連は認められなかった。しかしながら3種類の栓を用いて、培養器に無菌播種後8日目の子葉のクロロフィル量を測定した結果では、光透過率の最も高いルミラーで最も多く、アルミフオイルおよびミリラップはルミラーの1/3程度であった。Hazelら（1985）は50、155および315 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ の3段階の光量子量を設定し、*Liquidambar styraciflua* を培養した場合、光量子量が大きいほど葉緑体中のグラナがはっきりした正常に近い構造を示していたことを報告している。これらのことから水浸状化と葉緑体の構造と機能との関係について検討する必要があることが示唆される。

また、水浸状葉の発生と関係があるとみられる試験管内のエチレン濃度は、正常葉と水浸状葉でほとんど差が見られないか、むしろ正常葉の方が幾分高い値を示す場合も見られた。Keversら（1984）は、カーネーションを含む培養器内エチレン濃度を測定したところ、培養1ヶ月後の個体では正常個体の方が水浸状個体より高かったのに対し、培養1、2日後の個体では水浸状個体の方が高かったことを報告し、培養初期のエチレン濃度と水浸状との関連を示唆している。しかしながらストックにおいては水浸状葉の発生とエチレンとの間に強い相関は認められず、エチレンとの関連は明瞭ではなかった。

水浸状化の発生過程および生理的变化を組織形態学および生化学的方法で正常葉との比較により検討した。

まず水浸状葉および正常葉の組織形態観察を光学顕微鏡および走査型電子顕微鏡を用いて行った。水浸状葉は正常葉と比べ、細胞が肥大し大きな細胞間隙がみられ、維管束組織および葉肉組織の細胞配列が不統一で（第4-12図）、生長点近傍の細胞の配列も粗であった（第4-13図）。葉の表面および裏面は、水浸状葉は正常葉に比べ、気孔の数が少なく局在する傾向が見られ、また奇形な気孔が多く見られた（第4-15図）。Werkerら（1987）によると、カーネーションの水浸状の葉の気孔の密度も正常な葉に比べて低く、気孔の形は丸く、表皮よりも高くなっていた。水浸状の幼植物は、ワックスの欠乏と気孔機能の不全などのため水分を調節しにくくなっており、順化を困難にし生存率を著しく低下させている（Sutter・Langhans, 1979）。

次いで水浸状化現象によって葉組織内に水浸状化と関連がある特異的な酵素タンパクが出現するかどうかを知るため、電気泳動法による可溶性タンパクの分析を行った。また水浸状化した植物では、細胞壁構成成分であるリグニン含量が減少し、リグニン合成酵素の一つであるパーオキシダーゼが水浸状と関係していることが示唆されている (Keversら, 1990) ことから、パーオキシダーゼアイソザイムの分析を併せて行った。その結果、パーオキシダーゼアイソザイムの分析では、水浸状シュートと本葉で異なったバンドパターンを示した。また可溶性タンパクでは水浸状化シュートに特有のバンドが見られた。しかし、この場合には、再分化した正常個体との比較を行っていないので、特異的に現れたバンドが水浸状化に起因するものかどうか、さらに検討する必要がある。

Leshem (1983) はカーネーションの培養苗の水浸状化を回復する手段として、培地の寒天濃度を通常用いている0.8%より高濃度の、1.2、1.4%にして実験を行ったところ、正常な幼植物の割合を高めることは可能であったが、一度水浸状になったものは高濃度の寒天培地を用いても正常にすることはできなかった。

本実験では正常個体への回復方法として、様々な物質の添加を試みたが、それらの中で植物ホルモンのGA<sub>3</sub>は、その生理作用の一つとして節間伸長の促進がある (桜井・柴岡, 1989)。ストックの水浸状個体はすべてロゼット化しており、一方正常に回復した個体の大部分は節間伸長が観察されていることから、節間伸長の促進に及ぼすGA<sub>3</sub>の影響について検討した結果、GA<sub>3</sub>添加により節間伸長は促進されたが、水浸状化の回復にまでは至らなかった。ロゼット化と水浸状化との関連についてはさらに検討する必要があると思われる。また、同じく植物ホルモンであるABAは、生理作用の一つとして、水ストレス条件下では気孔を閉じ、蒸散を抑制することによって、葉内の水分の損失を回避し細胞の膨圧を維持する作用が知られている。本実験においても水ストレス耐性の付与による水浸状化の克服を目的にABAの添加を試みたところ、完全に正常に回復する個体は見られなかったが、葉色が濃くなり、幾分回復の可能性が示唆された。また、水浸状の原因としてリグニン合成の欠陥が指摘されており、そのためリグニン合成の促進にフロリジン添加が有効であることがPhan・Letouze (1983) のリンゴの水浸状シュートを用いた実験で報告されている。フロリジンはヒドロキシケイ皮酸合成を通じてリグニン合成を促進するといわれている。本実験では、

フロリジン添加により、正常個体へ回復は見られなかったが、葉色が濃くなりやや水浸状化の回復の可能性がABAの場合と同じく示唆された。

大量増殖を目的とする場合、外植体当りのシュート形成数がより多いことが望ましく、その点からはアルミフویلを培養器栓とし培養した場合、最も多くシュートが形成されたが、いずれも水浸状化していた。この水浸状化シュートをアルミフویلを培養器栓とした試験管に継代培養した場合には、水浸状化を克服することはできなかったが、ミリラップ栓を用いた場合には正常個体に回復させることが可能であった。このことからアルミフویلを培養器栓とした培養器内で形成された水浸状化シュートをミリラップ栓を用いた培養器に移植することにより正常な植物体を大量に得る可能性が考えられる。今後、培養環境を最適に制御することにより確実な大量種苗生産技術を確立するためには、増殖過程の最終段階である順化過程において再生植物体の生存率を決定的に低下させる水浸状化の原因を生理生化学的、組織化学的および組織形態学的な面からさらに究明し、検討していくことが是非とも要求される。

## 摘要

組織培養において、供試植物体の栽培環境や培養環境は、器官分化に大きく影響すると考えられる。そこで、種苗生産のための好適な培養環境を確立するため、器官分化に及ぼす供試植物の前歴の影響および培養器内の環境要因の変動と、培養器内の植物の形態形成との関係について検討した。

### 第1節 器官分化に及ぼす供試植物の前歴の影響

シュート形成に及ぼす供試植物の前歴の影響を見るために、光の強さと施肥濃度について検討した。葉片培養では、‘銀潮’は75%遮光によりシュート形成が促進されたが、‘雪まつり’では遮光により、シュート形成は抑制された。‘銀潮’では、園試処方水耕液の1/4より1/2倍液で高いシュート形成率を示した。下胚軸培養では供試した両品種とも、遮光処理によりシュート形成率は低下した。

### 第2節 器官分化および再生幼植物の形態に及ぼす培養器栓の影響

1. 三種類の培養器栓を用いて、CO<sub>2</sub>の喚気回数を測定したところ、ミリラップが最もガス交換能が高く、6.48回/時間で、アルミフオイルは0.54回/時間、ルミラーは0.29回/時間であった。

2. 上記の培養器栓を用いて下胚軸培養を行ったところ、シュート形成率およびシュート数はアルミフオイルが最も高く、ルミラーとミリラップでは同程度であった。また、形成されたシュートはすべて水浸状を呈した。一方、茎頂部を培養した結果、ミリラップは90%が正常個体に生長したのに対し、アルミフオイルおよびルミラーは半数が水浸状になった。

3. 正常幼植物が生育している培養器内のCO<sub>2</sub>の継時的変化を、各種培養器栓を用いて測定したところ、暗期はアルミフオイルおよびルミラーで高い値を示し、特にルミラーでは8,000ppmを上回った。また、明期では培養器外より低い値まで減少した。ミリラップについては、暗、明期を通じて低い値で一定していた。

4. 正常幼植物を含む培養器内のエチレンの変化を各種培養器栓を用いて測定したところ、ルミラーを用いた場合やや高い値を示し、ついでミリラップであ

った。いずれの栓においても明期の方が暗期よりエチレン濃度はやや高い傾向を示した。

### 第3節 正常個体および水浸状個体を有する培養器内のガス環境の比較

正常および水浸状幼植物の生育している培養器栓の異なる培養器内のCO<sub>2</sub>の継続的变化およびエチレン濃度を測定した。CO<sub>2</sub>濃度は、アルミフイルでは正常および水浸状とも暗期で上昇したが、明期での減少は、水浸状は正常葉よりも緩やかで、培養器外以下になることはなかった。ミリラップでは、水浸状葉も正常葉と同じく明、暗期を通して一定していた。エチレン濃度は正常および水浸状ともルミラーで高く、明期では水浸状個体より正常個体の方が、いずれの栓において濃度が高かった。

### 第4節 水浸状個体の正常個体への回復の試み

水浸状化したシュートを正常に回復するための実験を試みた結果、ミリラップ栓をした培養器で継代することで完全な正常個体に回復した。また、ゲルライト(0.4%)、マンニトール(50mM)、ABA(0.1mg/l)、フロリジン(1.0mg/l)の培地への添加は、完全な回復は見られなかったが、緑色が濃くなるなどの回復の兆しを示した。また、培養温度は20℃、光源は陽光ランプより蛍光灯の方が水浸状の程度が軽くなった。。

### 第5節 再生した正常個体と水浸状個体の組織形態学および生化学的比較

1.再生した正常個体と水浸状個体の組織形態学的比較を、光学および走査型電子顕微鏡により行った。その結果、水浸状化したシュートは葉が正常葉の5倍程度に肥厚しており、細胞は全体に液胞化した大きさの不規則な細胞で構成され、大きな細胞間隙が存在した。また、水浸状の葉の表面は凹凸が著しく、孔辺細胞が肥大し、気孔が陥没するなどの奇形を呈した気孔が観察された。

2.再生した正常個体と水浸状個体の電気泳動によるパーオキシダーゼアイソザイムサイモグラムを比較したところ、水浸状個体は正常個体に比べ、バンドが濃く染色され、また水浸状個体に特有のバンドが存在した。

## 謝辞

本研究を行うに当り、長期にわたり、御懇篤な御指導と御鞭撻を賜った神戸大学大学院自然科学研究科、前川 進教授に、謹んで、心から感謝の意を表します。また、実験の計画とその遂行に当り、数々の御助言と御指導を頂いた同研究科、稲垣 昇助教授に心より感謝いたします。また、本論文の作成に当り、貴重な御指導を頂き、御校閲を賜った同研究科、大川 秀郎教授ならびに上島 脩志教授に謹んで感謝の意を表します。本研究の遂行に当り、数々の御指導と御助言を頂いた元同研究科教授、寺分 元一博士、神戸大学農学部、金地 通生助手、元山口大学農学部 加藤 美知代博士に心から感謝いたします。

本研究の共同研究者である、一井 知子氏、岡野 光世氏、石橋 まゆみ氏に、心から厚く感謝し、御礼申し上げます。また、本研究の遂行に当り、惜しめない援助を賜った、大和 陽一博士はじめ、神戸大学農学部花卉蔬菜園芸学講座の皆様、また実験の遂行において御指導賜った多数の神戸大学関係者各位に、深く感謝いたします。

また辛抱強く励まし、精神的支えとなってくれた夫 高岡 啓吾氏に、陰ながら応援してくれた姉、平本 京子氏、甥、裕太氏、俊介氏に深く感謝いたします。最後に、長年にわたり心からの援助、励ましを続けてくれた父 溝添 明氏、母 十子氏に心から感謝いたします。

どうもありがとうございました。



## 引用文献

- Arai, M., Y. Sugawara and H. Matsushima. 1989. Enhancement of formation of carnation (*Dianthus caryophyllus*) mesophyll protoplast by abscisic acid pretreatment. *Plant Tissue Culture Lett.* 6(2):80-84.
- Arnon, D. I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* 24:1-15.
- Bates, G. W. 1985. Electrical fusion for optimal formation of protoplast heterokaryons in *Nicotiana*. *Theor. Appl. Genet.* 165:217-224.
- Bhattacharaya, N. M. and S. K. Sen. 1980. Production of plantlets through somatic embryogenesis in *Brassica campestris*. *Z Pflanzenphysiol.* 99:357-365.
- Ching, M. S., S. Frechette, C. Kuo, C. Chong and S. J. Delafield. 1985. Embryogenesis and haploid plant production from anther culture of cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.) *Can. J. Plant Sci.* 65:1033-1037.
- Cooking, E. C. 1960. A method for the isolation of plant protoplasts and vacuoles. *Nature.* 187. 962-963.
- 土井元章・小田 尚・浅平 端. 1989. C<sub>3</sub>およびCAM植物の培養器内環境と日長の関係. *生物環境調節.* 27(1):9-13.
- Feirer, R. P., G. Mignon and J. D. Litvay. 1984. Arginine decarboxylase and polyamines required for embryogenesis in the wild carrot. *Science.* 223:1433-1435.
- Frank, E. M., A. J. Riker and S. L. Dye. 1951. Comparisons of growth by tobacco and sunflower tissue on synthetic media containing various sources of organic nitrogen. *Plant Physiol.* 26:258-267.
- 富士原和宏・古在豊樹・渡辺一郎. 1987. 植物組織培養器内環境の基礎的研究 (3) 培養小植物体を含む閉栓容器内の炭酸ガス濃度測定と培養小植物体の純光合成速度の推定. *農業気象.* 43(1):21-304.
- 富士原和宏. 1991. 植物組織培養器内の水環境. *農業気象.* 47(2):101-107.
- Fukunaga, Y. and J. King. 1978. Effects of different nitrogen sources in culture media on protoplast release from plant cell suspension culture. *Plant. Sci. Lett.* 11:241-250.
- 福住久代. 1986. ストックの葉片培養における不定芽形成とその組織学的観察. *園学要旨.* 昭61秋 :332-333.
- 福住久代. 1988. ストックの葉片培養により形成された幼条からの発根について. *園学要旨.* 昭63秋 :520-521.

Gautam, V. K., A. Mittal, K. Nanda and S. C. Gupta. 1983. In vitro regeneration of plantlets from somatic explants of *Matthiola incana*. Plant Science Letters. 29:25-32.

George, L. and P. S. Rao. 1980. In vitro regeneration of mustard plants (*Brassica juncea* var. RAI-5) on cotyledon explants from non-irradiated, irradiated and mutagen-treated seed. Annals of Botany. 46:107-112.

Glimelius, K., M. Djupsjobacka. and H. Fellner-Fledegg. 1986. Selection and enrichment of plant protoplast heterokaryons of *Brassicaceae* by flow sorting. Plant Sci. 45:133-141.

Hazel, N. L., Y. Wetzstein and H. E. Sommer. 1985. Effects of quantum flux density on photosynthesis and chloroplast ultrastructure in tissue-culture plantlet and seedlings of *Liquidambar styraciflua* L. Towards improved acclimatization and field survival. Plant Physiol. 78:637-641.

Hegazi, H. and S. Matsubara. 1992. Callus formation and plant regeneration from protoplast derived from cotyledons and hypocotyls of radish (*Raphanus sativus* L.) and other cruciferous plants. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 61(1):63-68.

Hosoki, T. and M. Ando. 1989. protoplast culture plantlet regeneration in stock (*Matthiola incana* R. Br.). Plant Tissue Culture Lett. 6(3):144-147.

Howard, D. Grimes and T. K. Hodges. 1990. The inorganic  $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$  ratio influences plant regeneration and auxin sensitivity in primary callus derived from immature embryos of indica rice (*Oryza sativa* L.). J. plant physiol. 136:362-367.

Hui, L. H. and S. -Y. Zee. 1978. In vitro plant formation from hypocotyls and cotyledons of leaf - mustard cabbage (*Brassica Juncea* COSS). Z. Pflanzenphysiol. 89:77-80.

入江伸吉. ゲル内のタンパク質の高感度銀染色法. 1980. 生化学. 52:411-413.

Iversen, T. H., S. Myhre, K. Evjen and C. Baggerud. 1983. Morphology and myrosinase activity in root protoplasts of *Brassicaceae*. Z. Pflanzenphysiol. 112:391-401.

Iwai, S., K. Nakata, T. Nagao, N. Kawashima and S. Matsuyama. 1981. Detection of the *Nicotiana rustica* chloroplast genome coding for the large subunit of Fraction I protein in a somatoc hybrid in which only the *N. tabacum* chloroplast genome appeared to have been expressed. Theor. Appl. Genet. 152:478-480.

岩崎文雄. 1980. サイモグラムによるイチヨウの雌雄性の判別. 農業技術. 35(7): 312-313

岩崎文雄. 1981. アイソサイム法によるアスパラガスの雌雄性の早期判別法. 育種. 31 (別冊) I :170-171.

岩崎文雄. 1984. アイソサイム法の育種への利用. 農業技術. 39 (4) :160-162.

岩崎文雄・阿部恒充・渡部 弘. 1987. ストックの八重咲き個体の化学的判別. 農及園. 62 (3) :85-87.

Kamada, H. and H. Harada. 1978. Studies on organogenesis in carrot tissue cultures. II. Effects of amino acids and inorganic nitrogenous compound on somatic embryogenesis. Z. Pflanzenphysiol. 91:453-463.

鎌田博. 1980. 高等植物における不定胚形成の制御. 植物の化学調節. 15 (2) : 82-87.

Kameya, T. and K. Hinata. 1970. Introduction of haploid plants from pollen grains of *Brassica*. Japan. J. Breeding. 20 (2) :82-87.

Kao, K. N. 1975. A method for fusion of plant protoplasts with polyethylene glycol. In :Plant Tissue Culture Methods. O. L. Gamborg and L. R. Wetter (eds.) p. 22-27. Nat. Res. Council of Canada, Saskatoon.

Kao, K. N. and M. R. Michayluk. 1980. Plant regeneration from mesophyll protoplasts of alfalfa. Z. Pflanzenphysiol. 96:135-141.

Keller, W. A., T. Rajhathy and J. Lacapre. 1975. In vitro production of plants from pollen in *Brassica campestris*. Can. J. Genet. Cytol. 17:655-666.

Keller, W. A. and K. C. Armstrong. 1978. High frequency production of microspore - derived plants from *Brassica napus* anther cultures. Z. Pflanzenphysiol. 80:100-108.

keller, W. A. and K. C. Armstrong. 1979. Stimulation of embryogenetic and haploid production in *Brassica campestris* anther cultures by elevated temperature treatments. Theor. Appl. Genet. 55:65-67.

Keller, W. A. and K. C. Armstrong. 1983. Production of haploids via anther culture in *Brassica oleracea* var. *Italica*. Euphytica. 32:151-159.

Kevers, C. , M. Coumans, M. - F. Coumans - Gilles and Th. Gasper. 1984. Physiological and biochemical events leading to vitrification of plants culture in vitro. Physiol. Plant. 61:69-74.

Kevers. C. , T. Gaspar. , C. Catherine, D. Jouin, B. Monties, C. Francesch, C. Rolando, R. Goldberg and A. M. Catwsson. 1990. Effect of ferulic and  $\beta$ -fluoroferulic isopropylamine salts on solid and liquid culture of carnation. Phytochemistry. 29 (5) :1543-1545.

Kochba, J. and P. Spiegel-Roy. 1977. The effects of auxins, cytokinins and inhibitors on embryogenesis in habituated ovular callus of the «Samouti» orange (*Citrus sinensis*). Z. Pflanzenphysiol. 81:283-288.

古在豊樹・富士原和宏. 1986. 園芸環境工学における最近の話題 (8) 種苗工場の開発と研究課題 (2) 培養器内の環境. 1986. 農及園. 61(9):1113-1117.

古在豊樹・富士原和宏・渡辺一郎. 1986a. 植物組織培養器内環境の基礎的研究. (1) 液体培地における培地組成と水ポテンシャルの関係. 農業気象 42(1):1-6.

古在豊樹・富士原和宏・渡辺一郎. 1986b. 植物組織培養器内環境の基礎的研究. (2) 栓および容器が閉栓容器内外間のガス交換に及ぼす影響. 農業気象. 42(2):119-127.

古在豊樹. 1987. 培養植物の生長促進と順化. 細胞. 19(7):263-268.

Leshem, B. 1983. The carnation succulent plantlet - A stable teratological growth. Ann. of Bot. 52:873-876

松尾孝嶺. 1969. 自家不和合性. p80-85. 育種学. 養賢堂. 東京.

Manczel, L., F. Nagy, Zs. R. Kiss and P. Maliga. 1981. Streptomycin resistant and sensitive somatic hybrids of *Nicotiana tabacum* + *Nicotiana knightiana*: correlation of resistance to *N. tabacum* plastids. 1981. Theor. Appl. Genet. 59:191-195.

Melchers, G., M. D. Sacristan and A. A. Holder. 1979. Somatic hybrid plants of potato and tomato regeneration from fused protoplasts. Carlsberg Res. Comm. 43:203-218.

Michael, J., M. Joan, W. Koppenbrink and E. G. Jaworski. 1978. Polyamine metabolism in embryogenic cell of *Daucus carota*. Plant Physiol. 62:430-433.

三浦靖高・十川好志・山田康之. 1988. タバコプロトプラストの電気融合について. 植物組織培養. 5(2):101-103.

Mohapatra, S. S., R. J. Poole and R. S. Dhindsa. 1988. Detection of two membrane polypeptides induced by abscisic acid and cold acclimation: Possible role in freezing tolerance. Plant Cell Physiol. 29:727-730.

Montague, M. J., J. W. Koppenbrink and E. G. Jaworski. 1978. Polyamine metabolism in embryogenic cells of *Daucus carota*. Plant Physiol. 62:430-433.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15:473-497.

Nagata, T. and I. Takebe. 1970. Cell wall regeneration and cell division in isolated tobacco mesophyll protoplasts. Planta 92:301-308.

長田敏行. 1986. プロトプラストの遺伝工学. p39-40. 講談社. 東京.

西尾 剛・山岸 博・高柳謙治. 1986. アブラナ科野菜葉肉プロトプラストの初期培養条件に関する研究. 野菜・茶業試験場研究報告. A. 14:11-19.

Nishio, T., H. Yamagishi and K. Takayanagi. 1987. Shoot regeneration capacity destined at an early stage of protoplast culture in cabbage. Jpn. J. Breed. 37:22-28.

西尾 剛・渡辺建三・佐藤隆徳・平井正志. 1987. 電気融合法による *Brassica oleracea* と *Brassica campestris* の体細胞雑種の作出. 野菜・茶業試験場研究報告. A. 1:165-172.

Nitsch, J. P. and C. Nitsch. 1957. Auxin - dependent growth of excised *Helianthus tuberosus* tissues. Organic nitrogenous compounds. Amer. J. Bot. 44:555-564.

中島哲夫. 1988. 遠縁雑種の試験管内育成. 細胞工学. 7(12) : 51-56.

Nickell, L. G. and P. R. Burkholder. 1950. A typical growth of plants. Growth in vitro of virus tumors of *Rumex* in relation to temperature, pH, and various source of nitrogen, carbon, and sulfur. Amer. J. Bot. 37:538-540

大澤勝治・高柳謙治. 1984. プロトプラストを利用した野菜の育種法の開発. I. 数種野菜葉肉細胞からのプロトプラストの単離と培養条件の解明. 野菜試験場報告. A. 14:11-19.

Passiatore, J. E. and K. C. Sink. 1981. Plant regeneration from leaf mesophyll protoplast of selected ornamental *Nicotiana* species. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 106:799-803.

Phan, C. T. and R. Letouze. 1983. A comparative study of chlorophyll, phenolic and protein contents, and of hydroxycinnamate : Coa ligase activity of normal and 'vitreous' plants (*Prunus avium* L.) obtained in vitro. Plant Sci. Letters. 31:325-327

Phan, C. T. and P. Hegedus. 1986. Possible metabolic basis for the developmental anomaly observed in in vitro culture, called 'vitreous plants'. Plant Cell Tissue Organ Culture. 6:83-94.

Pirrie. A. and J. B. Power. 1986. The productin of fertile, triploid somatic hydrid plants (*Nicotiana glutinosa*(n) + *N. tabacum* (2n) ) via genetic: somatic protoplast fusion. Theor. Appl. Genet. 72:48-52.

Power, J. B., E. M. Frearson, C. Hayward, D. George, P. K. Evans, S. F. Berry and E. C. Cocking. 1976. Somatic hybridization of *Petunia hybrida* and *P. parodii*. Nature. 263:500-502.

Robertson, D. and E. D. Earle. 1986. Plant regeneration from leaf protoplasts of *Brassica oleracea* var. *Italica* cv. Green Comet Broccoli. Plant Cell. Rep. 5:61-64.

齊藤 清. 1951. ニオイアラセイトウ×アラセイトウによる顕著な偽授精現象の誘起. 農及園. 26:674.

齊藤 清. 1969. 八重咲き. p70-83. 花の育種. 誠文堂新光社. 東京.

齊藤朋子・金子康子・堀口正巳・松島 久. 1991. 培養容器の閉栓とヒトリフィケーション. バイオホルティ. 4: 82-83.

桜井英博・柴岡弘郎. 1989. 植物ホルモン. p217-235. 培風館. 東京.

Sato, T., T. Nishino and M. Hirai. 1989. Varietal differences in embryogenic ability in anther culture of chinese cabbage (*Brassica campestris* spp. *pekinensis*). Japan. J. Breed. 39:149-157.

白幡 晶. 1989. ポリアミンの生理的役割の探索: 生合成阻害剤の利用. 化学と生物. 28(3):162-171.

Snow, R. 1925. Germination tests with pollen of stocks. J. Genet. 15:237-243.

菅沼浩敏・岩崎文雄. 1983. サイモグラムによる雌雄異株植物の雌雄判別法. ナツメヤシ (*Phoenix dactylifera* L.) について. 熱帯農業. 27(2):75-78.

Sundberg E. and K. Glimelius. 1986. A method for production of interspecific hybrids within *Brassicaceae* via somatic hybridization, using resynthesis of *B. napus* as a model. Plant Sci. 43:155-162.

Sutter, E. and R. W. Langhans. 1979. Epicuticular wax formation on carnation plantlets regenerated from shoot tip culture. J. Amer. Hort. Sci. 104(4): 493-496.

田中布佐子・渡辺幸夫・嶋田典司. 1991. キク組織培養小植物体の生育に及ぼす  $O_2$  濃度の影響. 生物環境調節. 29(3):107-116.

Tempelarr, M. J. and M. G. K. Jones. 1985. Fusion characteristics of plant protoplasts in electric field. Planta 165:205-216.

Thomas, E. and G. Wenzel. 1975. Embryogenesis from microspores of *Brassica napus*. Z. Pflanzenzuchtg. 74:77-81.

Veliky, I. A. and D. Rose. 1973. Nitrate and ammonium as nitrogen nutrients for plant cell cultures. Can. J. Bot. 51:1837-1844.

Wadding, C. H. 1929. Pollen germination in stocks and the possibility of applying a lethal factor hypothesis to the interpretation of their breeding. Jour. Genet. 21:193-206.

Wallin, A., K. Glimelius and T. Eriksson. 1977. Pretreatment of cell suspensions as a method to increase the protoplast yield of *Haplopappus gracilis*. *Physiol. Plant.* 40:307-311.

Wetherrell, D. F. and D.K. Dougall. 1976. Sources of nitrogen supporting growth and embryogenesis in cultured wild carrot tissue. *Physiol. Plant.* 37:97-103.

Werker, E. and B. Leshem. 1987. Structural changes during vitrification of carnation plantlets. *Ann. of Botany.* 59:377-385.

山岸 博・西尾 剛・高柳謙治. 1986. ハクサイ葉肉プロトプラストからの植物体再分化. *園学雑.* 57:200-205.

山口 隆・北村治滋・今村 仁・姫野正巳. 1989. ダイアンサス属植物のプロトプラスト培養と電気融合法. *野菜・茶業試験場花き部研究年報.* 2:24-30.

横井政人. 1978. ストック八重咲き個体の鑑別. *農耕と園芸.* 38(8):210.

米沢郁子・稲垣 昇・前川 進・寺分元一. 1990. アスパラガスの葯培養におけるカルス及び胚様体形成のための前処理の効果. *園学雑.* 59別冊:270-271.

Zee, S.-Y. and L.H. Hui. 1977. In vitro plant regeneration from hypocotyl and cotyledons of chinese kale (*Brassica alboglabra* BAILEY). *Z. Pflanzenphysiol.* 82:440-445.

Zepata, F. J., K. C. Sink and E. C. Cocking. 1981. Callus formation from leaf mesophyll protoplast of three *Lycopersicon* species: *L. esculentum*, c. v. Walter, *L. pimpinellifolium* and *L. hirsutum*, f. *glabratum*. *Plant. Sci. Lett.* 23:41-46.

Zimmerman, U. and P. Scheurich. 1981. Fusion of *Avena sativa* mesophyll protoplasts by electrical breakdown. *Biochim. Biophys. Acta.* 641:160-165.