

第2章 リンドウ科園芸植物の組織培養系の確立

第2章 リンドウ科園芸植物の組織培養系の確立

1. 緒言

リンドウ科の園芸植物、一般に種子で増殖されるが、近年急速に品種改良が進められており、リンドウ科の園芸植物は、従来のように増殖し続けることが難しくなっており、その結果、品種改良が促進されていくことが予想される。また、近年急速に品種改良が進められており、その結果、品種改良が促進されていくことが予想される。

近年、リンドウ科の園芸植物は、急速に品種改良が進められており、その結果、品種改良が促進されていくことが予想される。また、近年急速に品種改良が進められており、その結果、品種改良が促進されていくことが予想される。

第2章 リンドウ科園芸植物の組織培養系の確立

リンドウ科の園芸植物は、急速に品種改良が進められており、その結果、品種改良が促進されていくことが予想される。また、近年急速に品種改良が進められており、その結果、品種改良が促進されていくことが予想される。

第2章 リンドウ科園芸植物の組織培養系の確立

第1節 リンドウの再分化系の確立

1. 緒言

リンドウの繁殖は、一般に種子で行われるが、さし芽および株分けによる増殖も可能である。リンドウ属には、種類によってはさし芽繁殖が容易であるが、その後、植物体が生育しにくいものが多い(吉池 1984)。また、切り花に多く使われているエゾリンドウの栄養繁殖は、一部の系統を除いて難しい。

近年、リンドウの育種は岩手、長野、栃木および島根の各県で行われているが、そのほとんどは交雑によるものであり、育成された品種は固定種あるいは F_1 品種であり、優良な形質をもつため F_1 品種がより重要となるものと考えられる。 F_1 品種育成のためには、遺伝的に均一な交配母本の育成が不可欠である。しかし、リンドウは他殖性で自殖弱勢が強く母本の維持のため自殖を繰り返すと強度の自殖弱勢が生じ、母本として使うことが困難になる。また、固定種についても増殖率が低いことがあり、その増殖効率を高めることが望まれる。これらの解決のために組織培養法による増殖が期待される。現在までリンドウ属植物の組織培養による大量増殖や種々の器官からの植物体の再生に関する多数の報告がある(表2-1)。大量増殖を目的として、茎頂培養(佐藤

1986, 阿部 1988, 丸田ら 1989, 高橋ら 1991, Yamada et al. 1991, Sharma et al. 1993)や苗条原基誘導(天野ら 1989, 田平・大村 1991, 清野ら1991)が行われ、再分化系を目的として不定胚形成(田平 1991, 西澤ら1991), 不定芽形成(村山ら 1993, Hosokawa et al. 1996)などの報告がある。その他、半数体作出を目的として、薬培養(松本 1986)および花粉培養(小林・米内 1991)も行われている。しかし、不定芽誘導や不定胚形成による効率的で安定した再分化系は現在のところ確立されているとは言い難い。

表2-1 リンドウ属植物の植物組織培養に関する報告一覧

種名	外植片	結果	文献
<i>G. makinoi</i>	葯	植物体再生	松本(1986)
<i>G. triflora</i> , <i>G. scabra</i>	茎頂	越冬芽の形成	佐藤(1986)
<i>G. triflora</i> , <i>G. scabra</i>	茎頂	大量増殖	阿部(1988)
<i>G. triflora</i> , <i>G. scabra</i>	茎頂	植物体再生	丸田ら(1989)
<i>G. triflora</i>	茎頂	苗条原基誘導	天野ら(1989)
<i>G. triflora</i>	蕾	不定胚形成	田平(1991)
<i>G. triflora</i>	生長点	苗条原基誘導	田平・大村(1991)
<i>G. triflora</i>	生長点	不定胚形成	西澤ら(1991)
<i>G. triflora</i>	茎頂(越冬芽)	植物体再生	高橋ら(1991)
<i>G. scabra</i>	未受精胚珠	植物体再生	村山ら(1991)
<i>G. scabra</i>	生長点	大量増殖	Yamada et al.(1991)
<i>G. triflora</i>	生長点	苗条原基誘導	清野ら(1991)
<i>G. scabra</i>	花粉	植物体再生	小林・米内(1991)
<i>G. triflora</i> , <i>G. scabra</i>	葉片	不定芽形成	村山ら(1993)
<i>G. kurroo</i>	茎頂, 茎	大量増殖	Sharma et al.(1993)
<i>G. triflora</i> , <i>G. scabra</i>	葉, 茎, 根	不定芽形成	Hosokawa et al.(1996)

リンドウにおいて効率的な再分化系を確立することができれば、大量増殖はもとよりプロトプラスト培養や形質転換などバイオテクノロジーを用いた新たな育種技術を確立できることにつながる。そこで、本研究では、リンドウの再分化系の確立を目的として葉片培養による植物体再生について検討した。

2. 材料および方法

(1) 材料

材料は、ササリンドウ (*G. scabra*) T0系とエゾリンドウ (*G. triflora*) 極晩2およびY系の生長点由来の無菌植物体を用いた。これらの無菌植物体は、植物成長調節物質を含まないMurashige and Skoog (1962) 培地 (MS培地) を基本とし、シヨ糖3% (w/v) およびジェランガム0.2% (w/v) を添加し、pH 5.8に調整した培地で継代培養中のものを用いた。

(2) 葉片培養

外植片として、無菌植物体の比較的若い上位葉をメスで約10mm四方に切り取ったものを用いた。カルス形成培地は、MS培地に植物成長調節物質として、2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) 0~2.0mg/lおよび N^6 -benzyladenine (BA) 0.5~2.0mg/lを添加した12区を用いた。20×90mmの無菌のプラスチックシャーレに培地を30ml添加し、1シャーレ当たり葉片を10個置床し、各区3シャーレを用い合計30個の葉片を培養した。なお、約30日ごとに同じ組成の培地で継代を行った。約90日間培養後、形成したカルスは、MS培地にBAを0, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0mg/lあるいはN-1,2,3-thiadiazol-5-yl-N'-phenylurea (TDZ) を0, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0mg/l添加したシュート誘導培地に継代し、30日ごとに同じ組成の培地に継代し、シュート形成を調査した。

次に、*G. scabra* T0系および*G. triflora* Y系の葉片から直接的なシュート誘導におけるTDZの効果を調査した。前述と同様に上位の葉を約10mm四方に切り取り外植片として用い、20×90mmのプラスチックシャーレ当たり10個の葉片を置床した。シュート誘導培地は、MSを基本とし、TDZ 1.0 mg/lと10.0 mg/lおよび1-naphthaleneacetic acid (NAA) を0, 0.1および1.0mg/lを添加した合計6区を設定した。培地にはシヨ糖3%(w/v)、ジェランガム0.2%(w/v)を添加し、pHは5.8とした。約30日ごとに同じ組成の培地で継代を行った。培養は、すべて20°C、3,000lux (25 μ mol photons/m²/s)、24時間日長条件下の人工気象器内で行った。なおシュート形成後は20°C、3,000lux、16時間日長条件下の人工気象器内で培養を行った。

不定胚誘導には、葉片を長さ10mm、幅2mm程度にメスで細断して外植片とし、培地を30ml添加した20×90mmのプラスチックシャーレに1シャーレ当たり葉片を10個置床し、10シャーレを用い合計100個の葉片を置床した。培地は、TDZ 10mg/lとNAA 0.1mg/l、シヨ糖3%(w/v)とジェランガム0.2%(w/v)を添加したMS培地を用いた。培養は、25°C、3,000luxの16時間日長の条件で行った。なお、継代培養は初代培養と同じ組成の培地を用い、約30日ごとに行った。

3. 結果

(1) リンドウ葉片からのカルス形成およびカルスからのシュート誘導

*G. scabra*および*G. triflora*を用いて2,4-DとBAの組み合わせによるカルス形成への影響について調査を行った。*G. scabra*に関して、カルスは、培養約20日目ころから葉片の切り口付近に形成され、その後、培養90日目ころに葉片の表皮上に球状の黄色のコンパクトなカルスが形成された(図2-1)。このカルスはその後ピンセットでつまむとばらばらこぼれやすい形態になって

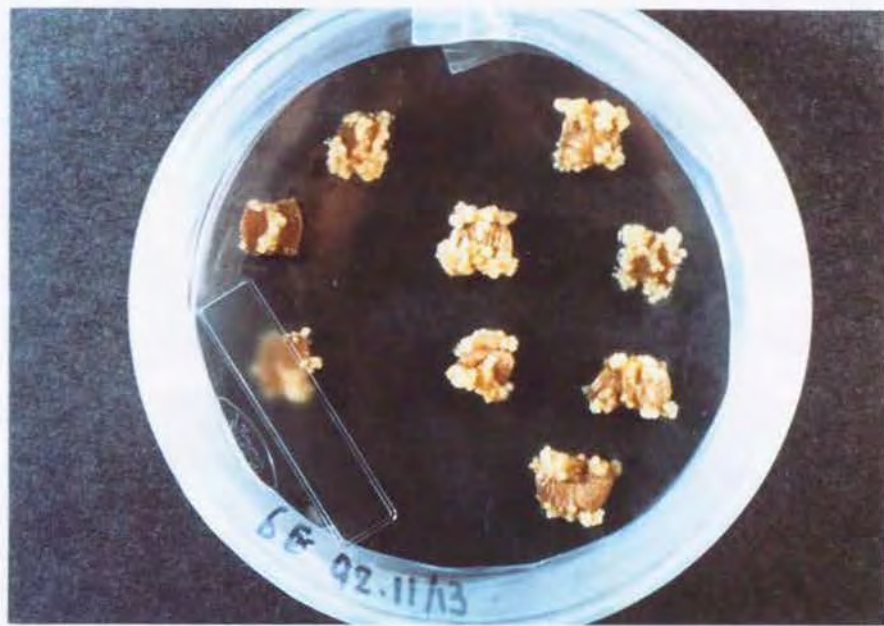


図2-1 *G. scabra* T0系葉片からのカルス形成状況
葉片に形成された球状カルス
2,4-D 0.5mg/l+BA 1.0mg/l添加区 (6区)
(培養約90日後)

増殖した。カルス形成率は、2,4-D無添加区（1，5，9区）を除いた他の区で37～100%の頻度で形成された（表2-2）。特に、2,4-DとBA各0.5mg/l添加区（2区）では、すべての葉片でカルスの形成がみられた。カルス増殖の程度は、カルス形成率の高い2,4-D 0.5mg/lとBA 0.5mg/l添加区および2,4-D 0.5mg/lとBA 1.0mg/l添加区（6区）において良好であった。シュートおよび根の形成はいずれの区でもみられなかった。

G. triflora についても同様に2,4-D およびBAの組み合わせによるカルス形成への影響について検討を行った。培養14日目ごろに葉片の周囲にカルスが形成し、その後葉片全体にカルスが形成された。カルス形成率は、0～100%と変異し、特に2,4-D 0.5mg/lとBA 1.0mg/l添加区（6区）および2,4-D 1.0mg/l, BA 2.0mg/l（11区）では、それぞれ100%および97%と高いカルス形成率を示した（表2-3）。また、2,4-D無添加区（1，5，9区），2,4-D 1.0mg/lとBA 0.5mg/l添加区（3区）ではカルスが形成されなかった。なお、*G. triflora* においても、シュートおよび根の形成は、これらカルス形成培地ではみられなかった。

*G. scabra*の葉片由来カルスについては、BAの濃度を変えた5種類のシュート誘導培地に継代し、シュート形成について調査した（表2-4）。BAを1.0, 2.0および5.0mg/l添加した培地では、移植40日ごろにシュートおよび不定胚様のものが形成された（図2-2A）。これらの形成率は低かったが、BA濃度が高いほど形成率が高くなる傾向があり、BA 5.0mg/l添加区が最高で、シュート形成率は、置床したカルス全体の5.6%であった。また、カルス形成培地の違いにより、シュート形成に若干の差異がみられ、2,4-D 0.5mg/lとBA 0.5～2.0mg/l添加区（2，6，10区）および2,4-D 1mg/lとBA 0.5mg/l添加区（3区）で形成したカルスだけがシュートを形成した。伸長したシュートは、植物成長

表2-2 *G. scabra* T0系葉片からのカルス形成に及ぼす植物成長調節物質の影響

試験区	植物成長調節物質 (mg/l)		置床数	カルス		シュート 形成数 (%)	根形成数 (%)
	2,4-D	BA		形成数 (%)	増殖 ¹⁾		
1	0	0.5	30	0(0)	-	0(0)	0(0)
2	0.5	0.5	30	30(100)	+++	0(0)	0(0)
3	1.0	0.5	30	11(37)	+	0(0)	0(0)
4	2.0	0.5	30	21(70)	++	0(0)	0(0)
5	0	1.0	30	0(0)	-	0(0)	0(0)
6	0.5	1.0	30	26(87)	+++	0(0)	0(0)
7	1.0	1.0	30	25(83)	++	0(0)	0(0)
8	2.0	1.0	30	25(83)	++	0(0)	0(0)
9	0	2.0	30	0(0)	-	0(0)	0(0)
10	0.5	2.0	30	20(67)	++	0(0)	0(0)
11	1.0	2.0	30	25(83)	++	0(0)	0(0)
12	2.0	2.0	30	24(80)	+	0(0)	0(0)

¹⁾ - : なし, + : やや増殖, ++ : 普通, +++ : 旺盛

調査日 : 培養約90日目

表2-3 *G. triflora* ‘極晩2’ 葉片からのカルス形成における植物成長調節物質の影響

試験区	植物成長調節物質 (mg/l)		置床数	カルス		シュート 形成数 (%)	根形成数 (%)
	2,4-D	BA		形成数 (%)	増殖 ¹⁾		
1	0	0.5	30	0(0)	-	0(0)	0(0)
2	0.5	0.5	30	15(50)	++	0(0)	0(0)
3	1.0	0.5	30	0(0)	-	0(0)	0(0)
4	2.0	0.5	30	5(17)	+	0(0)	0(0)
5	0	1.0	30	0(0)	-	0(0)	0(0)
6	0.5	1.0	30	30(100)	++	0(0)	0(0)
7	1.0	1.0	30	21(70)	+	0(0)	0(0)
8	2.0	1.0	30	25(83)	++	0(0)	0(0)
9	0	2.0	30	0(0)	-	0(0)	0(0)
10	0.5	2.0	30	4(13)	+	0(0)	0(0)
11	1.0	2.0	30	29(97)	+	0(0)	0(0)
12	2.0	2.0	30	13(43)	+	0(0)	0(0)

¹⁾ - : なし, + : やや増殖, ++ : 普通, +++ : 旺盛
調査日 : 培養約90日目

表2-4 *G. scabra* 'T0系' の葉片由来カルスからのシュート誘導率におけるBA濃度の影響

カルス ¹⁾ 形成培地	BA濃度 (mg/l)					シュート 誘導率 平均 (%)
	0	0.5	1.0	2.0	5.0	
2	0/10	0/10	0/10	0/10	1/10	2
3	0/10	0/10	0/10	0/10	3/10	6
4	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0
6	0/10	0/10	1/10	0/10	1/10	4
7	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0
8	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0
10	0/10	0/10	1/10	2/10	0/10	6
11	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0
12	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0
平均 (%)	0	0	2.2	2.2	5.6	

¹⁾カルス形成培地は、表2-2を参照

シュート誘導数/置床数

調査日：シュート誘導培地に移植後約80日目

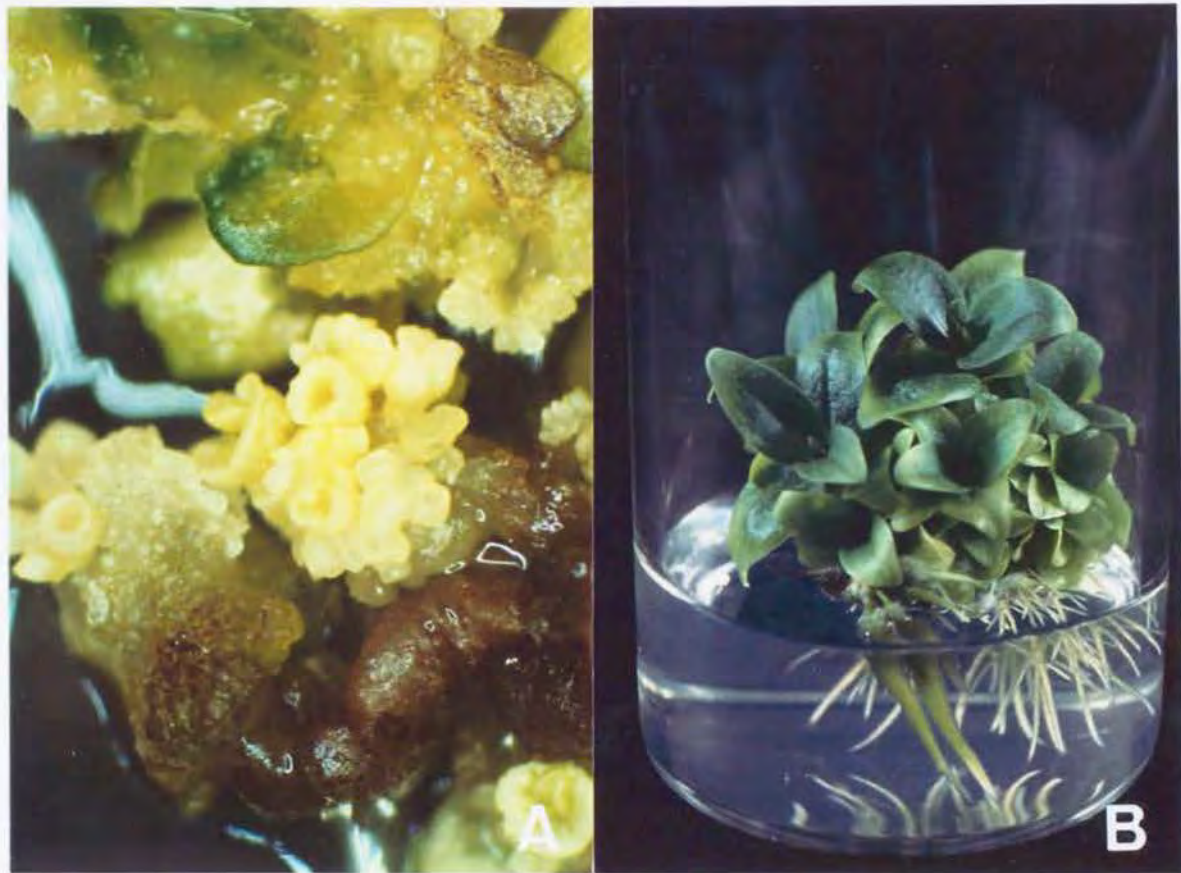


図2-2 *G. scabra* T0系葉片由来カルスからの不定芽（不定胚）および植物体の再生状況

A：葉片由来カルスに形成された不定芽および不定胚

BA 5.0mg/l添加区（移植後40日）

B：葉片由来カルスからの植物体再生

BA 5.0mg/l添加区（移植後60日）

調節物質添加のMS培地に移植したところ移植後60日ごろに植物体が再生した(図2-2B)。

次に、TDZを用いた*G. scabra*葉片由来カルスからのシュート誘導について検討を行った。特に、カルス形成培地の中で2,4-D 1.0mg/lとBA 2.0mg/l添加区(11区)で形成された球状カルスを1個ごと(単体)に切り置き置床したものと集団ごとに置床したものに区別し、シュート誘導数を比較した(表2-5)。その結果、集団で置床した場合には、TDZ 4mg/l添加区を除いたすべての区でカルスが緑色を呈し増殖した(表2-6, 図2-3A)。シュートは、移植後60日ごろにTDZ 0.5mg/lおよび1.0mg/l添加区で誘導され(図2-3B)、その頻度は80~100%と高かった。その後、同組成の培地に継代を行ったところ、TDZ 0.5mg/l添加時のシュート形成および生育が良好であった。それに対し、1個ごとに単体で置床したものはすべての区でシュート誘導がみられなかった。TDZ無添加区およびTDZ 0.5mg/l添加区でカルスが緑色を示したが、その後シュートの誘導はみられず、最終的には他の区と同様に枯死した。

(2) リンドウの葉片からのシュート誘導

前述の実験結果からTDZがシュート誘導に効果的であったため、さらにその効果を確認するためにTDZとNAAの組み合わせで*G. scabra*および*G. triflora*の葉片を用いて調査を行った。その結果は、表2-6および表2-7に示すとおりである。両種とも、培養7日ごろにカルス形成がみられ、その後、緑色のコンパクトなカルスとなった。カルス形成率は、両種ともNAAの濃度に比例して高くなり、NAA 1.0mg/lの時、TDZの濃度にかかわらず74%以上の形成率を示し、*G. triflora*では100%であった。再分化は、30日ごろから*G. scabra*ではTDZ 10mg/lとNAA 0.1mg/l添加区で不定胚形成がみられ(図2-4A)、*G.*

表2-5 *G. scabra* 'T0系' 葉片由来カルスからのシュート誘導に及ぼすTDZの影響

置床時の加形態	TDZ(mg/l)	置床数	緑色加数(%)	シュート形成数(%)
集団	0	10	10(100)	0(0)
//	0.5	10	10(100)	10(100)
//	1.0	10	10(100)	8(80)
//	2.0	10	6(60)	0(0)
//	4.0	10	0(0)	0(0)
单体	0	20	20(100)	0(0)
//	0.5	20	5(25)	0(0)
//	1.0	20	0(0)	0(0)
//	2.0	20	0(0)	0(0)
//	4.0	20	0(0)	0(0)

調査日：シュート誘導培地に移植後約80日目

表2-6 *G. scabra* 'T0系' の葉片培養からのカルス形成および器官形成に及ぼす植物成長調節物質の影響

植物成長調節物質 (mg/l)		置床数	カルス形成率 (%)	不定胚誘導率 (%)	不定根形成率 (%)
TDZ	NAA				
1.0	0	100	13± 5.2 ¹⁾	0± 0 ¹⁾	0± 0 ¹⁾
1.0	0.1	100	66±15.3	0± 0	45±14.6
1.0	1.0	100	100± 0	0± 0	57± 8.6
10.0	0	100	3± 2.3	0± 0	0± 0
10.0	0.1	100	65±10.9	3± 3.2	7± 4.5
10.0	1.0	100	74±12.4	0± 0	54± 7.1

¹⁾ 平均±標準誤差

調査日：培養約110日目

表2-7 *G. triflora* 'Y系'の葉片培養からのカルス形成および器官形成誘導に及ぼす植物成長調節物質の影響

植物成長調節物質 (mg/l)		置床数	カルス形成率 (%)	シュート誘導率 (%)	不定根形成率 (%)
TDZ	NAA				
1.0	0	100	3± 2.2 ¹⁾	0± 0 ¹⁾	0± 0 ¹⁾
1.0	0.1	100	87± 6.5	13± 4.2	7± 3.2
1.0	1.0	100	100± 0	11± 5.1	100± 0
10.0	0	100	94± 3.6	8± 5.8	0± 0
10.0	0.1	100	95± 3.2	38± 11.6	50± 17.6
10.0	1.0	100	100± 0	25± 10	99± 1.1

¹⁾ 平均±標準誤差

調査日：培養約110日目

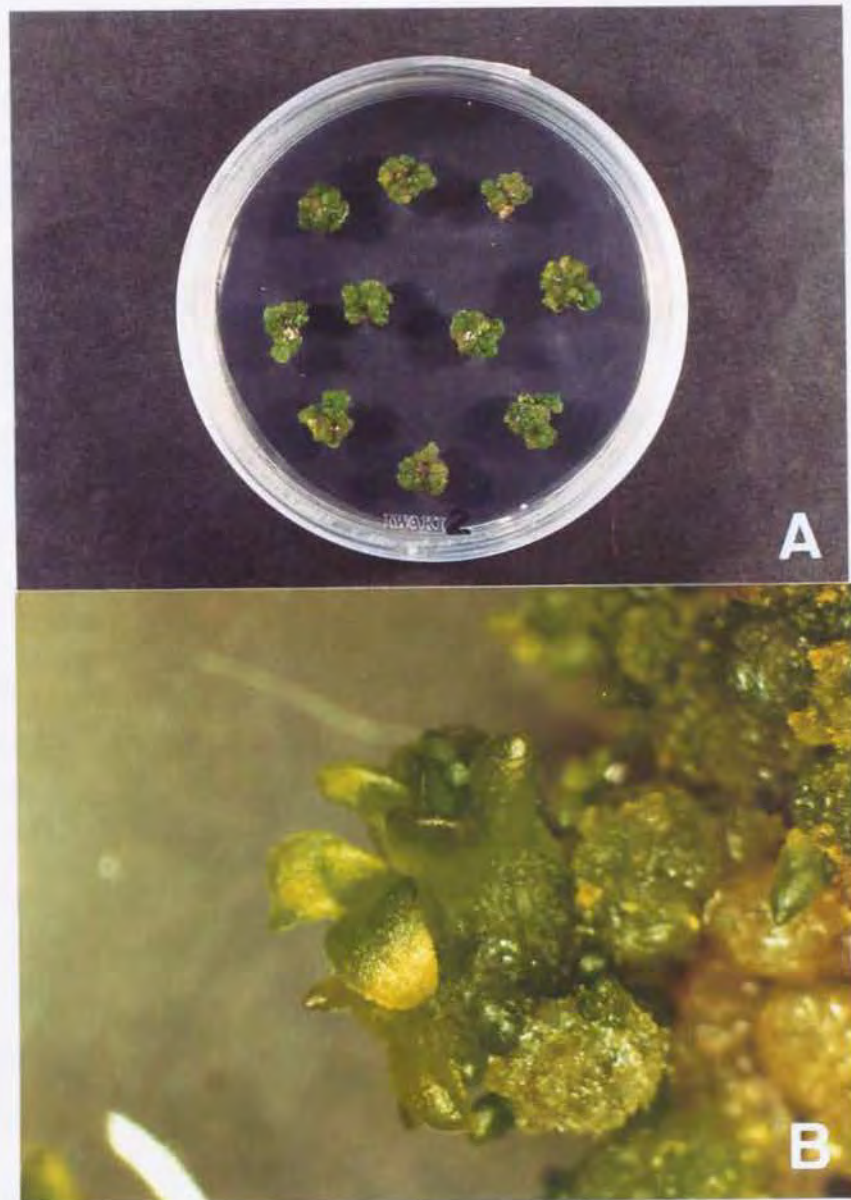


図2-3 *G. scabra* T0系葉片由来カルスからの不定芽形成

A : 葉片に形成されたカルス (培養約30日後)

B : 葉片に形成された不定芽 TDZ 0.5mg/l添加区
(移植後約60日後)

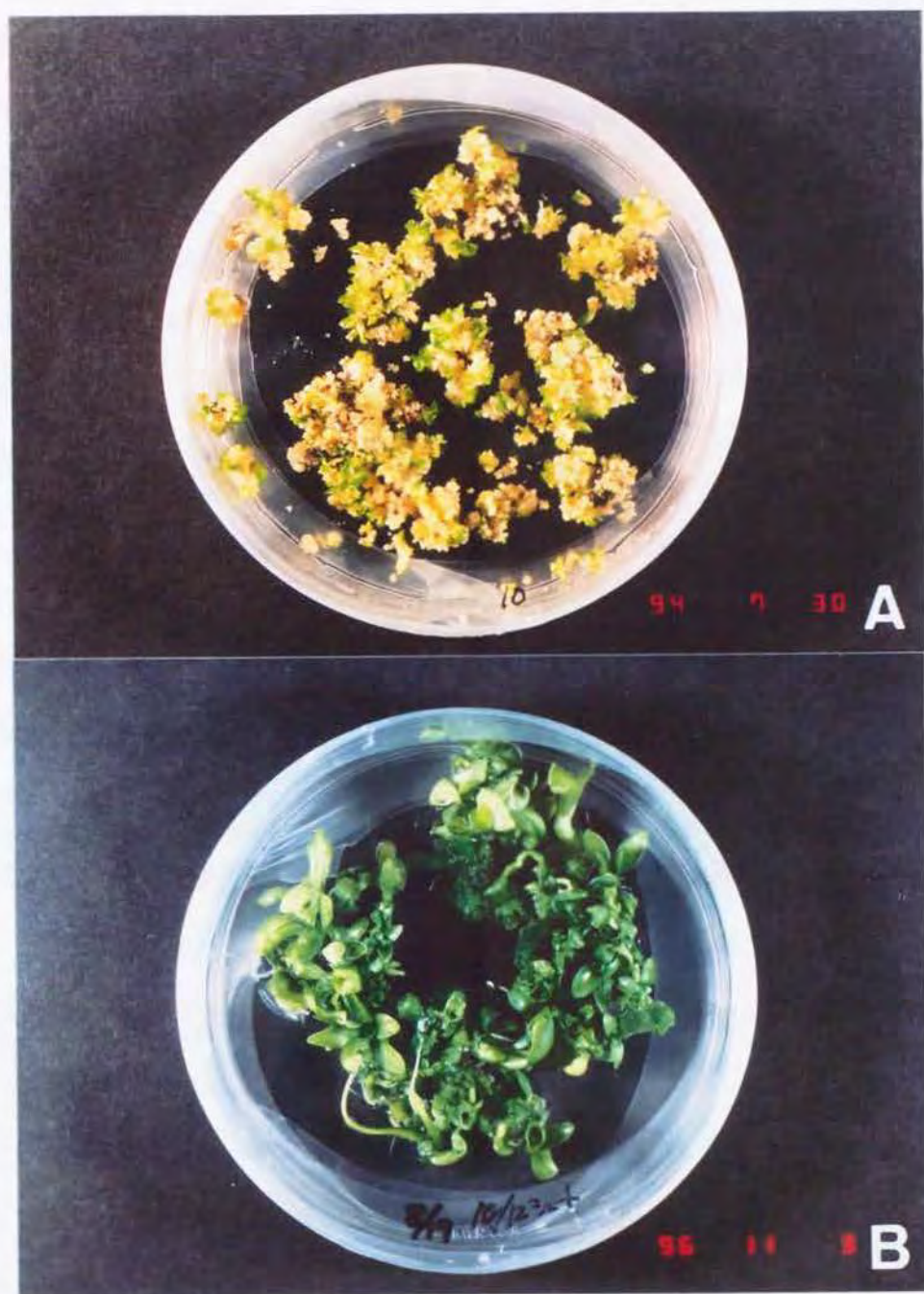


図2-4 リンドウ葉片カルスからの器官形成

A : *G. scabra* T0系, 不定胚形成

TDZ 10mg/l+NAA 0.1mg/l添加区 (培養約80日後)

B : *G. triflora* Y系, 不定芽形成

TDZ 10mg/l+NAA 0.1mg/l添加区 (培養約80日後)

triflora ではTDZ 1.0mg/l, NAA無添加区以外のすべての区で不定芽形成がみられた (図2-4B)。再分化率は*G. scabra*では3%と低かったが,*G. triflora*では8~38%と比較的高い値を示した。

一方, 根の形成は, 両種とも培養開始25日目ごろにNAAを添加したすべての区でみられた。特に,*G. triflora*では, NAA 1mg/l添加区で99~100%の高頻度で根が形成された。葉片あたりの根の数は, 培地に添加した植物成長調節物質の濃度に関係なく1~10本程度であった。

(3) リンドウ葉片からの不定胚誘導

前述したように*G. scabra*では, TDZ 10mg/lとNAA 0.1 mg/l添加区で葉片からの不定胚の形成が確認された。そのため, 同じ試験区を設定し, 葉片からの不定胚誘導について追試を行った。

培地に置床した葉片は, 培養30日ごろに表面および葉片周囲にカルスを形成した。その後, カルスは増殖し, 60日ごろには葉の表面を覆った。カルス形成率は42%であった (表2-8)。形成されたカルスは, 水分をやや含んだコンパクトな形状であった。カルスの色は, 黄色から淡い黄緑色を示した。また, 培養70日後には, カルスの一部に不定胚の形成がみられ (図2-5A, B), 形成された不定胚の形成率は, 37%であった。不定胚を形成したカルスは, ピンセットで摘むと, カルスが小さく分離した。また不定胚の一部にはグリーンスポットが観察された。形成された不定胚は, 不定胚誘導培地と同組成の培地に継代したところ成長し, シュートを形成した。その後, 伸長したシュートは, 植物成長調節物質無添加のMS培地に継代したところ, 植物体を再生した (図2-5C)。

表2-8 *G. scabra* T0系の葉片からの不定胚形成

植物成長調節物質 (mg/l)		置床数 ¹⁾	カルス 形成率 (%)	不定胚 形成率 (%)
TDZ	NAA			
10	0.1	100	42±15.3 ²⁾	37±13.7 ²⁾

¹⁾ 1シャーレ当たり：葉片10個置床

²⁾ 平均±標準誤差

調査日：培養約70日目



図2-5 *G. scabra* T0系葉片からの不定胚形成

A : 葉片に形成された不定胚 (培養約70日後)

TDZ 10.0mg/l+NAA 0.1mg/l添加区

B : Aの拡大写真

C : 不定胚から植物体再生 (培養約120日後)

植物成長調節物質無添加区

4. 考察

植物組織培養の器官分化は、オーキシシンおよびサイトカイニンの2種類の植物成長調節物質の量的なバランスによって制御されること、およびカルスを誘導する段階でもこの両者が共存する必要があることが知られている。三位(1989)は、器官分化に対する外生的な植物成長調節物質の要求性は、植物の種、培養部位などによって大きく異なるため、未知の材料を研究対象とする場合には、必然的に広範な濃度でオーキシシンとサイトカイニンを組み合わせることになるが、この2種類の植物成長調節物質で器官分化できない植物が未だに多数残っているとしている。

本研究では、リンドウからの効率的な植物体の再生系を確立するために、*G. scabra*と*G. triflora*の葉片を用いて植物成長調節物質のカルス形成およびカルスからの再分化について検討した。その結果、両種でカルス形成および再分化が可能であることが明らかになった。両種において2,4-DとBAの組み合わせでカルス形成をみたところ、多くの培地でカルス形成したが、2,4-D無添加区ではカルス形成しなかった。*G. triflora*の葉片からのカルス誘導は、NAAとカイネチンの組み合わせでも高率で行われており(木村 1989)、本研究の結果とも考えあわせ、リンドウのカルス形成には、オーキシシンが不可欠であることが明らかとなった。

カルスからのシュート再生については、従来困難であることが報告されている(阿部 1988, 木村 1989, 糸坪 1991)。本実験において、*G. scabra*を用い、BAとTDZによるシュート誘導について調査したところ、両植物成長調節物質ともシュート誘導に効果的であることが示された。BAについては、5.0mg/lと高濃度、TDZについては、0.5~1.0mg/lと低濃度が効果的であり、特にTDZの効果が高かった。

カルスからの再分化に対してTDZの効果が高かったので、*G. scabra*および*G. triflora*を用いTDZの効果を追試したところ、両種とも葉片からシュートが誘導され、TDZの効果が確認された。*G. triflora*では、TDZ 1.0および10mg/l添加の培地で広範囲に不定芽形成がみられた。一方、*G. scabra*では、再分化の頻度は低かったが、NAA 0.1mg/lとTDZ 10mg/l添加区で不定胚形成がみられた。リンドウの再生系に関しては、前述した様に一般的に困難である。その中でも種々の植物調節物質の効果が調査されており、村山ら(1993)は、KT-30 (1-(2-chloro-4-pyridyl)-3-phenylurea) がBAおよびゼアチンよりもシュート誘導に効果的であることを報告し、最近、Hosokawa et al.(1996)はTDZの効果が高いことを報告している。本実験もHosokawa et al.(1996)の結果と同様にリンドウの葉片からのシュート誘導にTDZが効果的であることを示した。TDZは、urea系のサイトカイニンで、BA、カイネチン、ゼアチンなどのadenin系のサイトカイニンよりも活性が高く(Mok et al. 1982, Lu 1993)、特に木本植物のシュート誘導に効果的であることが報告されている(Mok et al.1982, 増田ら1994)。本研究により、TDZが従来困難であったリンドウ葉片からの再分化を容易にし、分化に重要な役割を果たすことが明らかとなった。

*G. scabra*と*G. triflora*において葉片からの再分化が可能となったが、両種において再分化の過程で差異がみられた。すなわち、*G. triflora*は不定芽形成であり、*G. scabra*は不定芽および不定胚形成の両方がみられ、特にTDZを用いたとき不定胚のみ形成された。このように種間で再分化過程に差異が生じた要因は現在のところ不明であり、今後多くの系統を用いることで明らかになるかもしれない。ただし、*G. triflora*に関してはHosokawa et al.(1996)も不定芽形成のみを観察しており、種間でのTDZに対して遺伝的差異が存在することが推察される。現在まで、リンドウの不定胚形成は、2,4-Dを使用した培地を

用い, *G. triflora*のみで報告があり(西澤ら 1991, 田平 1991), *G.*

*scabra*では報告がなく, 本研究が最初のものである. この不定胚形成系は, 再現性もあることから, 今後大量増殖に利用できるだけでなく胚形成の機構を解析する上で役立つものと思われる.

以上, 本研究では, リンドウ2種について葉片を用いた不定芽および不定胚形成の効率的な再分化系を確立することができた. 今後, 本培養系の汎用性を明らかにするとともに, 増殖や形質転換に利用することが期待される.

第2節 リンドウの不定胚形成の組織学的観察

1. 緒言

受精胚以外に形成される胚は, 不定胚あるいは胚様体と呼ばれ, 植物組織培養法により, カルス, 懸濁培養細胞, 葯および花粉などから誘導できることが示されている(Tisserat et al. 1979, Enans and Sharp 1981, Ammirato 1983). 組織培養で誘導された不定胚の形態的観察の報告は, 単子葉類では, イネ(Jones and Rost 1989), コムギ(Maheswaran and Williams 1985), トウモロコシ(Vasil et al. 1985), ギニアグラス(Lu and Vasil 1985)などがある. また, 双子葉類では, ニンジン(Reinert 1958, Dodeman and Ducreux 1996), キャッサバ(Stamp 1987), ナス(Mohammad et al. 1991), トウガラシ(Binzel et al. 1996), チャ(Kato 1996), セイヨウミザクラ(Garin et al. 1997) およびチヨウセンニンジン(Choi et al. 1999)など多くの植物で報告されている.

リンドウでは, *G. triflora* の蕾(田平 1991) および茎頂(西澤ら 1991) から不定胚が形成されたことが報告されている. しかし, これらの不定胚の報

告は肉眼観察によるものであり，組織学的な観察は行われていない．

そこで，本研究では，第1節で明らかとなった不定胚形成系を用い，不定胚形成機構の解析の一つとして組織学的観察を行った．

2. 材料および方法

(1) 材料

材料は，MS培地で育成した生長点由来の*G. scabra* T0系の無菌植物体の展開葉を用いた．

(2) 不定胚形成

前節と同様にTDZ 10mg/lとNAA 0.1mg/lを添加したMS培地で葉片を培養し，不定胚を誘導した．

(3) 組織学的観察

パラフィン切片法による組織学的観察を行った．葉片培養後，培養7日，15日，30日，40日および60日目の外植片を採取後，それぞれ酢酸アルコール（酢酸：エタノール＝1：3（w/v））で24時間固定し，その後，70%エタノールに入れ，冷蔵庫内で保存した．脱水および透徹は，エタノールーブタノールシリーズで行い，パラフィン切片は，回転式マイクロトームを用い，厚さ10 μ mで作成した．染色は，デラフィールドのヘマトキシリンにより行い，組織を光学顕微鏡で観察し，写真撮影を行った．なお，固定から染色およびパラフィン封入までは表2-9に示すとおりの手順で行った．

3. 結果

表2-9 パラフィン切片の作成方法

固定	酢酸アルコール (酢酸 : エチルアルコール 1 : 3 (v/v))	
脱水および透徹	(1) 70% EtOH ¹⁾ :	8~12時間
	(2) EtOH : n-BuOH ²⁾ : 蒸留水 40 : 10 : 50 (v/v)	8~12時間
	(3) EtOH : n-BuOH : 蒸留水 50 : 20 : 30 (v/v)	8~12時間
	(4) EtOH : n-BuOH : 蒸留水 50 : 35 : 15 (v/v)	8~12時間
	(5) EtOH : n-BuOH : 蒸留水 40 : 55 : 5 (v/v)	8~12時間
	(6) EtOH : n-BuOH 25 : 75 (v/v)	8~12時間
	(7) 無水n-BuOH	8~12時間
	(8) 無水n-BuOH	8~12時間
パラフィンの浸透・包埋	(1) パラフィン (少量の無水n-BuOH) 65°C	12時間
	(2) パラフィン 65°C	12時間
	(3) パラフィン 65°C	12時間
パラフィンの溶除	(1) キシレン	3~5分
	(2) キシレン	3~5分
	(3) 無水EtOH	30秒~1分
	(4) 無水EtOH	30秒~1分
	(5) 90%EtOH	30秒~1分
	(6) 70%EtOH	30秒~1分
	(7) 水洗	3~5分
染色および封入	(1) デラフィールドヘマトキシリン染色	6分30秒
	(2) 水洗	30秒~1分
	(3) 塩酸アルコール	5~10秒
	(4) 水洗	5分
	(5) 70%EtOH	30秒~1分
	(6) 80%EtOH	30秒~1分
	(7) 90%EtOH	30秒~1分
	(8) 95%EtOH	30秒~1分
	(9) 無水EtOH	30秒~1分
	(10) 無水EtOH	30秒~1分
	(11) キシレン	30秒~1分
	(12) キシレン	30秒~1分
	(13) 封入 (カナダバルサム)	

¹⁾ エチルアルコール

²⁾ n-ブタノール

培養中の葉片から、プレパラートを作成し、その縦断面を検鏡したものを図2-6から図2-8に示した。無菌植物体の葉片は、葉片を構成する表皮、柵状組織および海綿状組織などの組織の区別は不明瞭であったが、細胞は規則的に配列しているのが観察された(図2-6A)。培養した葉片は、培養日数の経過とともに葉片組織の内部で細胞分裂が起こり、細胞の配列が不規則となり、30日後には、葉片の内部にカルスを形成すると思われる細胞の集団構造が観察された(図2-6B)。

培養中の葉片には、培養日数の経過とともに、様々な生育段階の不定胚が観察された。培養30日目ごろには、カルスの表面近くに分裂活性の高い細胞群が多くみられた(図2-7A)。また、同じく培養30日目には、表皮細胞の一部から球状型胚の形成が観察された(図2-7B)。培養40日目には、表皮細胞に二極性を持つ心臓型胚以降の不定胚が観察された(図2-7C, D)。さらに培養60日目には、魚雷型不定胚が形成された(図2-7E)。この不定胚には、茎頂付近に分裂活性の高い部位が観察され、その反対方向に根の原基とみられる分裂活性の高い部位が観察された。不定胚の表皮は、核が染色された細胞で形成され、胚の中央付近には維管束が構成されていた。

一方、培養日数の経過したカルスを構成する細胞は、柔細胞と分裂活性を持つ細胞群に分けられ、さらに後者の細胞群は、細胞中の核の形態的特徴から二つのタイプに分けられた(表2-10)。Aタイプの細胞群は、外部形態的に核が偏在し、カルス表面部分に多く分布したが、カルス内部にも観察され、この分裂活性を持つ細胞は、柔細胞とは細胞の形態および染色状況から区別された(図2-8A)。Bタイプの細胞は、その局在がAタイプと同様にカルスの表面近くに観察されたが、濃く染色された核が中心にあり、細胞全体に対する核の割合が小さいなどの特徴を持っていた(図2-8B)。

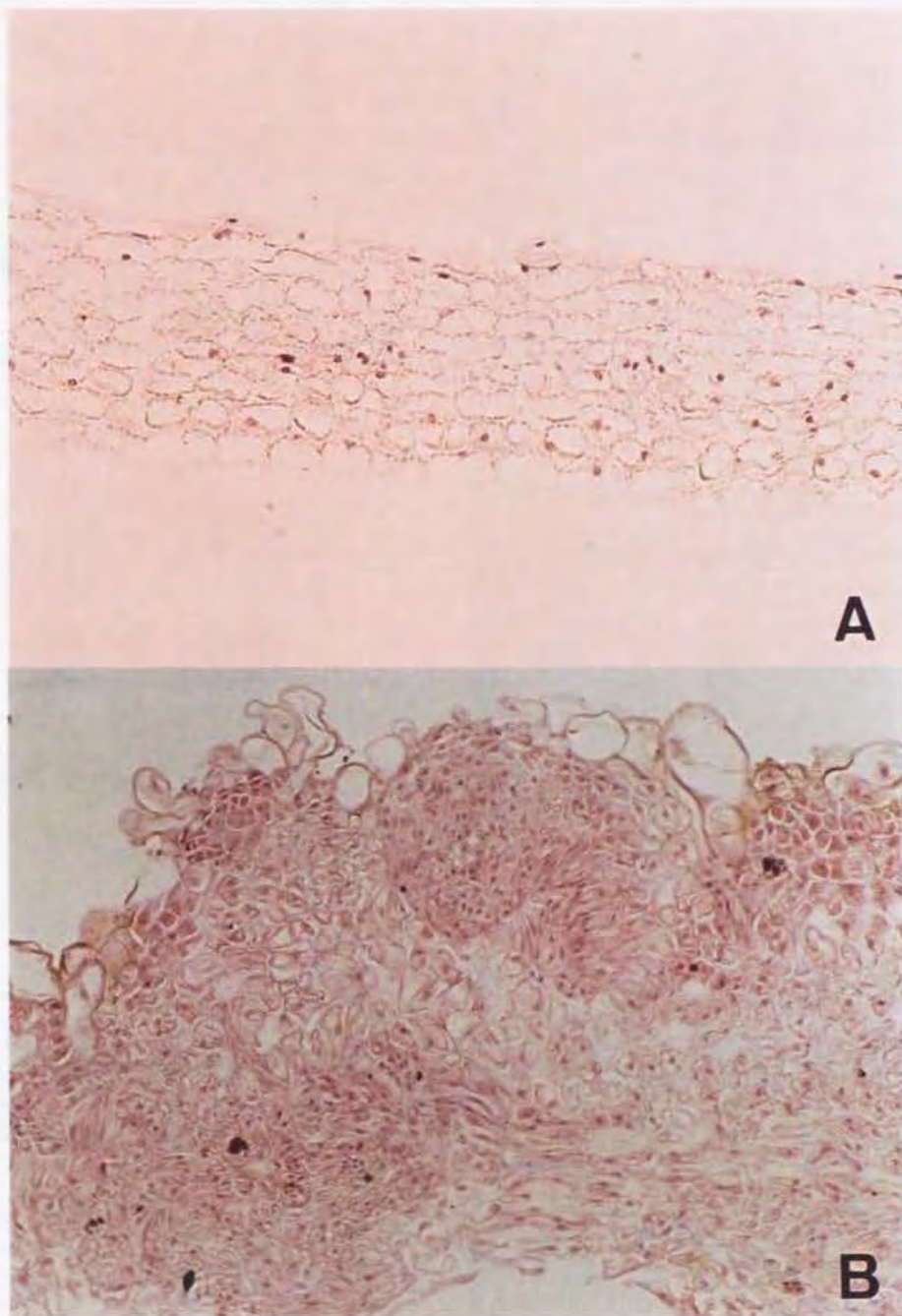


図2-6 *G. scabra* T0系の葉片培養における不定胚形成の組織学的観察

A: 無菌植物体の展開葉断面 (×100)

B: 培養30日後の葉片断面 (×100)

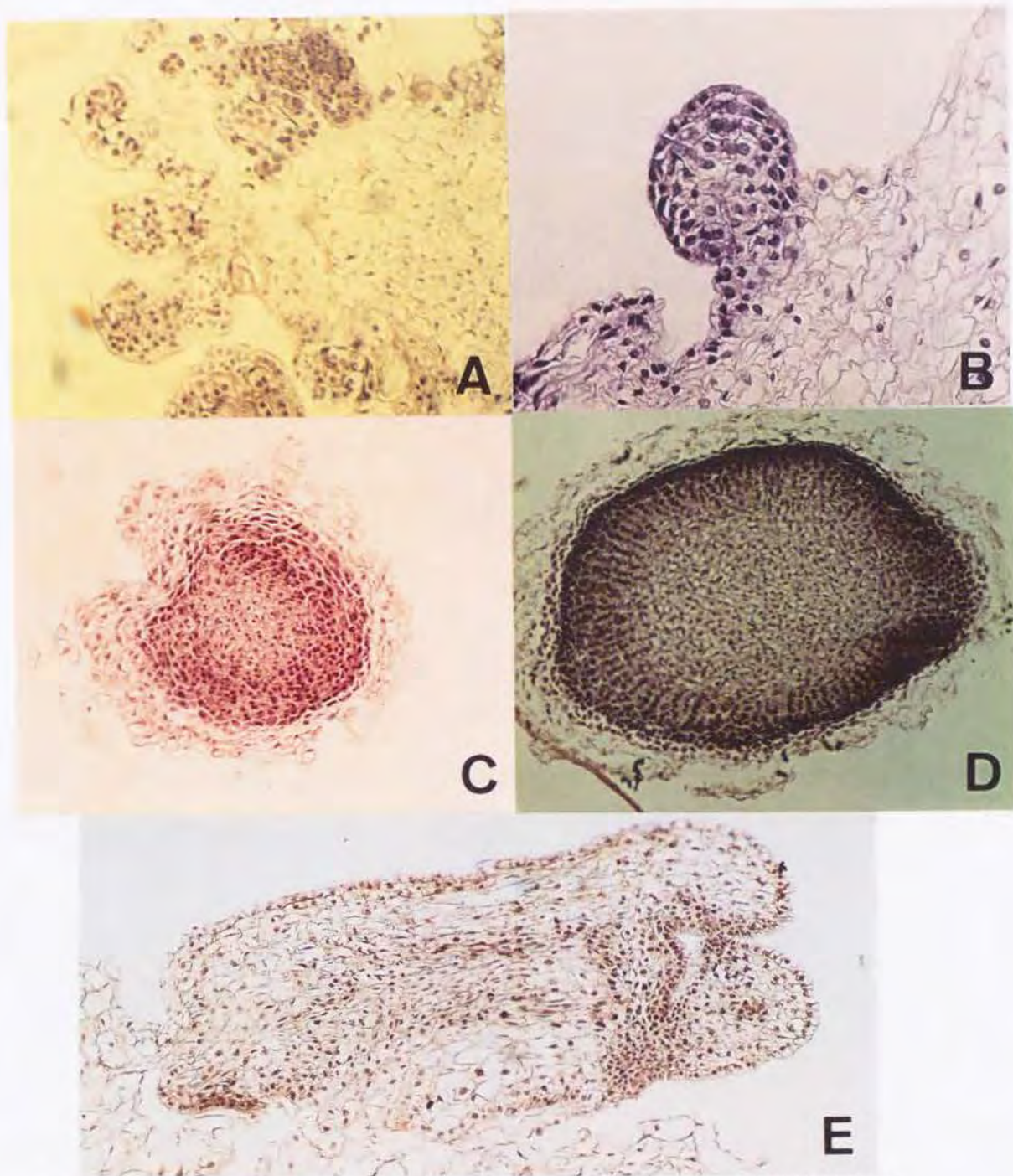


図 2 - 7 *G. scabra* T0系葉片培養における不定胚形成の組織学的観察

- A : 表皮周辺の分裂活性を持つ細胞群 (培養30日後)
- B : 表皮からの球状胚形成 (培養30日後)
- C : 心臓型胚 (培養40日後)
- D : 心臓型胚から発達した二極性を持つ不定胚 (培養40日後)
- E : 魚雷型胚 (培養60日後)

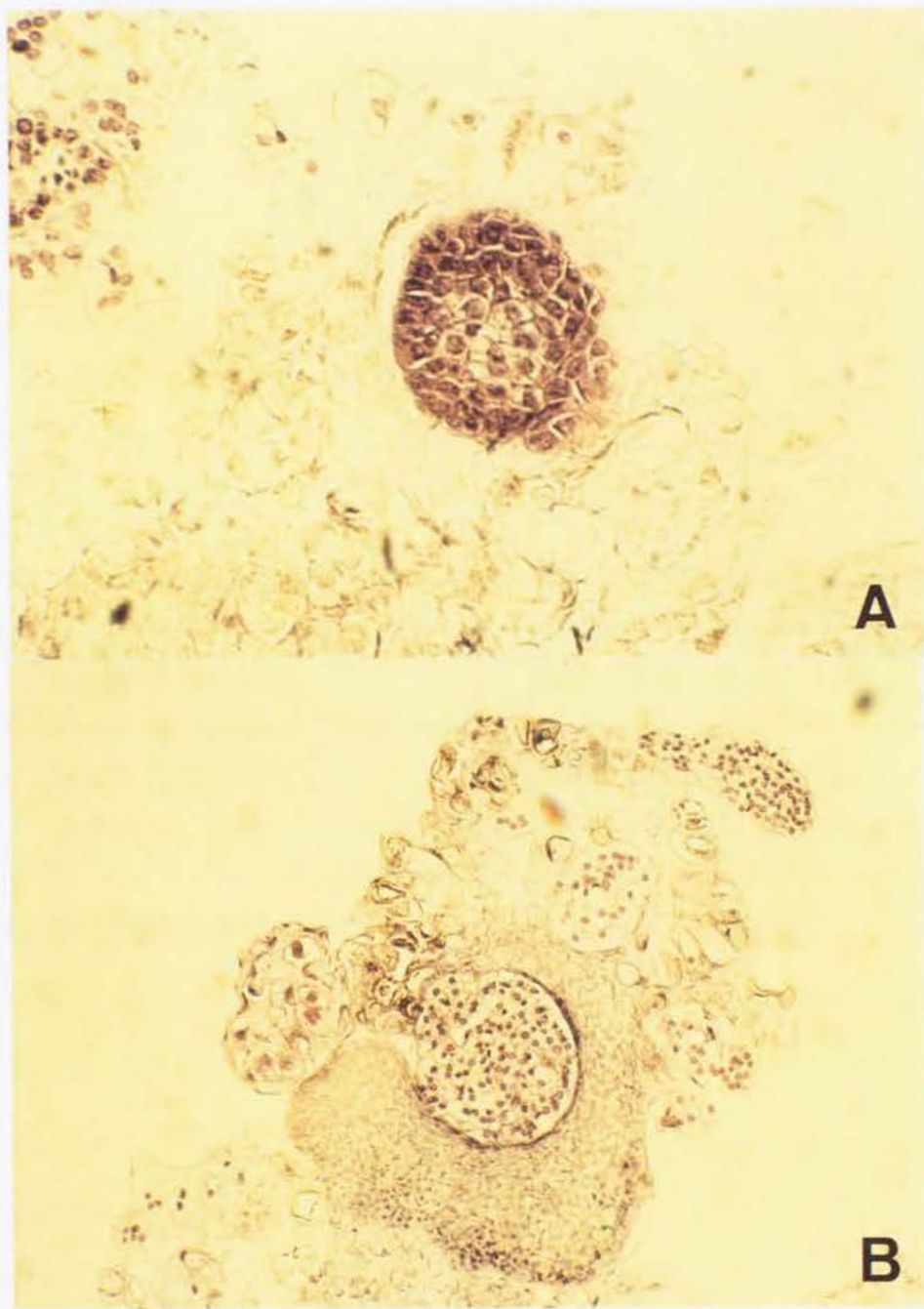


図2-8 *G. scabra* T0系葉片培養においてみられた分裂活性を持つ細胞群

A : Aタイプ型細胞群 (培養30日後)

B : Bタイプ型細胞群 (培養30日後)

表 2-10 リンドウ葉片由来カルス組織内に見られる細胞群分布状況と形態的特徴¹⁾

タイプ	細胞群の分布状況	細胞中の核の形態的特徴
A	カルス周辺, 内部	核が偏在, 核の割合が大きい
B	表皮周辺, 内部	核が中心に存在 核の割合が小さい

¹⁾ 写真は, 図 2-8 を参照

4. 考察

植物組織培養を用いた大量増殖には、茎頂、不定芽あるいは不定胚を用いる方法があり、不定胚の増殖効率が高いとされ（西村ら 1990）、植物の各器官から不定胚を誘導することが報告されている（Tisserat et al. 1979）。

本研究では、リンドウ葉片由来カルスから誘導された不定胚およびカルスの組織学的観察を行うことにより、不定胚形成過程の機構の解明を行った。培養30日目の葉片観察で、葉片内の細胞配列が変化し、細胞分裂していると思われる細胞集団の存在を確認した。この形態的变化はリンドウ（小岩ら 1994）およびリンゴ（Wargarete 1988）において報告されている葉片内部の表皮細胞配列の乱れや維管束周辺の細胞分裂および粒状構造の出現と一致している。

次に、形成されたカルス細胞を観察した結果、カルスの表面付近および内部に分裂活性を持つ細胞群がみられた。カルス表面に形成された細胞群の細胞は、濃く染色された大きい核を持っていた。また、カルス内部の細胞では、二つのタイプの細胞群がみられた。一つは、核が中心にあり、濃く染色され、細胞全体に対する核の割合が大きい細胞で構成されたもの（Aタイプ）、もう一つは、核が偏在し、細胞質が大きく核の割合が小さい細胞で構成されたもの（Bタイプ）であった。これらA、B両タイプの細胞群は、カルスを構成している周辺の細胞とは形態的特徴から明らかに異なっていた。不定胚を形成する細胞の特徴は、細胞が小さく細胞質に富むもの（鎌田・原田 1982）、細胞が小さく細胞液胞が発達せず大型の核が細胞の中央にあるもの（松本 1988）としている。また、石原（1965）はニンジンカルスの組織観察を行い、胚的組織を形成している細胞の形態と染色性が、他の細胞と異なり、濃く染色された細胞で構成されていることを報告している。以上のことから判断すると、本実験で観察されたカルス表面の細胞群およびカルス内部のAタイプの細胞で構成された細胞

群は、不定胚を形成する細胞と形態的に類似していたことから、これら細胞群から不定胚が形成されると推察された。また、表皮細胞の一部からは、球状型胚の形成が観察された。これらカルスや表皮組織でみられた胚的組織は、その後、二極性を持つ心臓型胚、さらには分裂活性の高い茎頂と根端原基をもつ魚雷型胚へと発達していった。これらの発達過程は、従来組織培養で報告されている不定胚形成過程 (Steward et al. 1958, Ali et al. 1991, Binzel et al. 1996) と一致していることから、不定胚であると断定することができた。

以上のことから、本実験では、第1節で確立したリンドウ葉片からの不定胚形成系について組織学的に不定胚の発達過程を明確にした。今後、本培養系を用いて不定胚分化に関連する遺伝子発現あるいは分子マーカーなどを解析することにより、リンドウの不定胚形成の機構についてより詳細に明らかになることが期待される。

第3節 エキザカムの再分化系の確立

1. 緒言

エキザカム (別称 ベニヒメリンドウ) (*Exacum affine* Balf) は、リンドウ科エキザカム属の園芸植物で、淡紫色あるいは白色の花色を持ち、近年鉢物として広く利用されている。特に6月から7月にかけて店頭などで販売されている。エキザカムは、リンドウ科に属するが他のリンドウ科植物とは異なり、原産地は比較的温帯が高い地域のアラビア海のソコトラ島である。またアフリカから熱帯アジア、中国にかけて約40種が分布している (サンティスク 1994)。日本には、‘ドワーフミゼットブルー’、‘ドワーフミゼットホワイト’、‘ブルー・ロココ’ および ‘ホワイト・ロココ’ など数品種が導入されているが、

これら導入品種は品種改良がほとんどされておらず、原種のまま利用される場合が多い。また園芸用花卉としてだけではなく、インドに自生する同属の *E. bicolor* および *E. tetragonum* などは解熱剤として利用されており (サンティスク 1994) , 薬用植物としても今後利用価値があるものと期待される。

エキザカムの繁殖様式は、ほとんど種子繁殖であるが、栽培種の中には繁殖力の低いものもあり (Ornstrup et al. 1993) , そのため組織培養などによる大量増殖の確立が求められている。また、バイオテクノロジーを利用した他のリンドウ科園芸植物との遺伝子導入による新花卉の作出なども考えられ、そのための基礎となる組織培養に関する技術開発が不可欠である。エキザカムの組織培養に関しては、Torres and Ntarella (1984) が、茎頂培養による多芽体の形成、Ornstrup et al. (1993) が懸濁細胞からの体細胞胚誘導および植物体の再生などの報告があるのみである。そこで、本節では、エキザカムの組織培養に関する基礎的な知見を得るために、エキザカムの再分化系の検討を行った。

2. 材料および方法

(1) 材料

材料は、エキザカム (*Exacum affine*) ‘ドワーフミゼットブルー’ ((株) サカタのタネ) を用いた。

(2) 方法

種子を70%エタノール (ツイーン20 0.1% 添加) で30秒間滅菌し、滅菌水で1回洗浄した。さらに有効塩素0.6% 次亜塩素酸ナトリウム溶液 (ツイーン20 0.1% 添加) で20分間滅菌後、滅菌水で2回洗浄した。滅菌した種子は、

滅菌水を約10ml添加し、滅菌済みデスポザブル25mlのプラスチック製の注射器で滅菌水ごと吸い取り、植物成長調節物質無添加のMS培地（ジェランガム0.2%（w/v））100mlが入った300ml培養用三角フラスコの培地上面に注入し、播種した。これから生育した植物を無菌植物体として実験材料とした。培養条件はすべて25°C，3,000lux，24時間日長条件の培養室内で行った。

葉片培養では、無菌植物体の比較的若い上位の葉を、約1cm四方に切り取り、外植片とした。初めにカルス形成に及ぼす植物成長調整物質の影響について検討するためにMS培地（ジェランガム0.2%（w/v））シヨ糖3%（w/v））に2,4-D 0, 0.5, 1.0, 2.0mg/lおよびBA 0.5, 1.0, 2.0 mg/l添加した12区の試験区を設定した（表2-11）。培地は、20×90mmの滅菌済みのプラスチックシャーレに30ml注入し、各区1シャーレ当たり10個の葉片を置床し、1区当たり2シャーレを用いた。形成された葉片由来カルスは、約30日ごとに同じ組成の培地で継代を行ない、培養90日目ころにBA 0.5mg/lおよび1.0mg/l添加のシュート誘導培地に移植し、約30日目ごとに同じ組成の培地で継代しシュート誘導について調査を行った。

根培養では、無菌植物体の根を約1cmの長さに切り取り、外植片とした。培地は葉片培養と同様のものを用い、2,4-D 0~2.0mg/lとBA 0~2.0mg/lを組み合わせた16区を設定した。また、エキザカム無菌植物体の根に形成されたカルス様のもの（約5mm）を外植片とし、2,4-DとBAを0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0mg/lを添加した合計5区を設定し、カルス形成およびシュート誘導について調査した。なお、葉片培養および根培養の培養条件はすべて25°C，3,000lux，24時間日長条件の培養室内で行った。

表2-11 エキザカム葉片からのカルス形成および器官形成に及ぼす植物成長調節物質の影響

試験区	植物成長調節物質(mg/l)		置床数	カルス		シュート	根形成数
	2,4-D	BA		形成数	増殖 (%)	形成数 (%)	(%)
1	0	0.5	20	18(90)	+	0(0)	0(0)
2	0.5	0.5	20	19(95)	++	0(0)	0(0)
3	1.0	0.5	20	20(100)	++	0(0)	0(0)
4	2.0	0.5	20	19(95)	++	0(0)	0(0)
5	0	1.0	20	20(100)	++	0(0)	0(0)
6	0.5	1.0	20	20(100)	+++	0(0)	0(0)
7	1.0	1.0	20	20(100)	+++	0(0)	0(0)
8	2.0	1.0	20	20(100)	++	0(0)	0(0)
9	0	2.0	20	19(95)	+	0(0)	0(0)
10	0.5	2.0	20	20(100)	++	0(0)	0(0)
11	1.0	2.0	20	18(90)	+	0(0)	0(0)
12	2.0	2.0	20	20(100)	+	0(0)	0(0)

カルス増殖：-なし，+やや形成，++普通，+++旺盛

調査日：培養約60日目

3. 結果

2,4-DとBAの組み合わせによる葉片からのカルス形成への影響について調査を行った。カルスは、初め葉片の周囲に形成され、その後約60日ごろには葉片全体に緑色のコンパクトなカルスが形成された(図2-9A)。カルス形成は、すべての区でみられ、特にBA1.0mg/l添加区(5, 6, 7, 8区)ではカルス形成率が100%であった(表2-11)。また、2,4-D無添加区(1, 5, 9区)でも90~100%のカルス形成率を示した。シュートおよび根の形成はすべての区でみられなかった。

さらに、カルスをBA 0.5および1.0mg/l添加のシュート誘導培地に移植し、シュート形成について調査を行った結果、移植後約50日ごろにシュート誘導がみられた(表2-12, 図2-9B)。シュート誘導は、カルス形成培地の植物成長調節物質の組み合わせに大きく影響され、特に2,4-D 0.5mg/lとBA 0.5mg/l添加区(2区)は、どちらの再分化培地でも80%以上のシュート形成率を示した。また、2,4-D 2mg/lとBA 0.5~1.0mg/l添加区(4, 8区), 2,4-D 1.0mg/lとBA 1.0mg/l添加区(7区)で形成したカルスも再分化率は44%以上であった。なお、これら形成されたシュートは、植物成長調節物質無添加のMS培地に継代したところ、約7日目ごろに根の形成がみられた(図2-9C)。その後、植物体が再生し、順化することができた(図2-9D)。

一方、根培養の場合も葉片培養と同様に、2,4-DとBAの組み合わせによるカルス形成への影響について調査を行った。カルス形成は、BA 2.0mg/l添加区(13区)を除いた合計15区でみられ、カルス形成率は5~95%であった(表2-13)。特に、2,4-D 2.0mg/l単独添加区(4区)のカルス形成率は95%と極めて高かった。また、植物成長調節物質無添加区(1区)でもカルス形成率は85%を示した。シュート形成はすべての区でみられなかったが、根の形成は

表2-12 エキザカム葉片からのシュート誘導に及ぼす植物成長調節物質の影響(品種 ドワーフミゼットブルー)

カルス ¹⁾ 形成培地	BA(mg/l)	置床数	シュート 形成数 (%)	根形成数 (%)
1	0.5	2	0(0)	0(0)
1	1.0	2	0(0)	0(0)
2	0.5	16	15(94)	1(6)
2	1.0	11	9(82)	2(22)
3	0.5	5	0(0)	0(0)
3	1.0	1	1(100)	0(0)
4	0.5	5	3(60)	0(0)
4	1.0	6	3(50)	1(17)
6	0.5	3	0(0)	0(0)
6	1.0	2	0(0)	0(0)
7	0.5	9	9(100)	0(0)
7	1.0	9	4(44)	0(0)
8	0.5	8	5(63)	0(0)
8	1.0	8	5(63)	0(0)

¹⁾カルス形成培地は表2-11を参照

調査日：シュート誘導培地移植後約170日目

表2-13 エキザカム根からのカルス形成に及ぼす植物成長調節物質の影響

試験区	植物成長調節物質(mg/l)		置床数	カルス 形成数 (%)	シュート 形成数 (%)	根形成 数 (%)
	2,4-D	BA				
1	0	0	20	17(85)	0(0)	4(20)
2	0.5	0	20	7(35)	0(0)	0(0)
3	1.0	0	20	1(5)	0(0)	0(0)
4	2.0	0	20	19(95)	0(0)	0(0)
5	0	0.5	20	2(10)	0(0)	0(0)
6	0.5	0.5	20	16(80)	0(0)	0(0)
7	1.0	0.5	20	10(50)	0(0)	0(0)
8	2.0	0.5	20	5(25)	0(0)	0(0)
9	0	1.0	20	2(10)	0(0)	0(0)
10	0.5	1.0	20	11(55)	0(0)	0(0)
11	1.0	1.0	20	1(5)	0(0)	0(0)
12	2.0	1.0	20	2(10)	0(0)	0(0)
13	0	2.0	20	0(0)	0(0)	0(0)
14	0.5	2.0	20	5(25)	0(0)	0(0)
15	1.0	2.0	20	1(5)	0(0)	0(0)
16	2.0	2.0	20	1(5)	0(0)	0(0)

調査日：培養約30日目

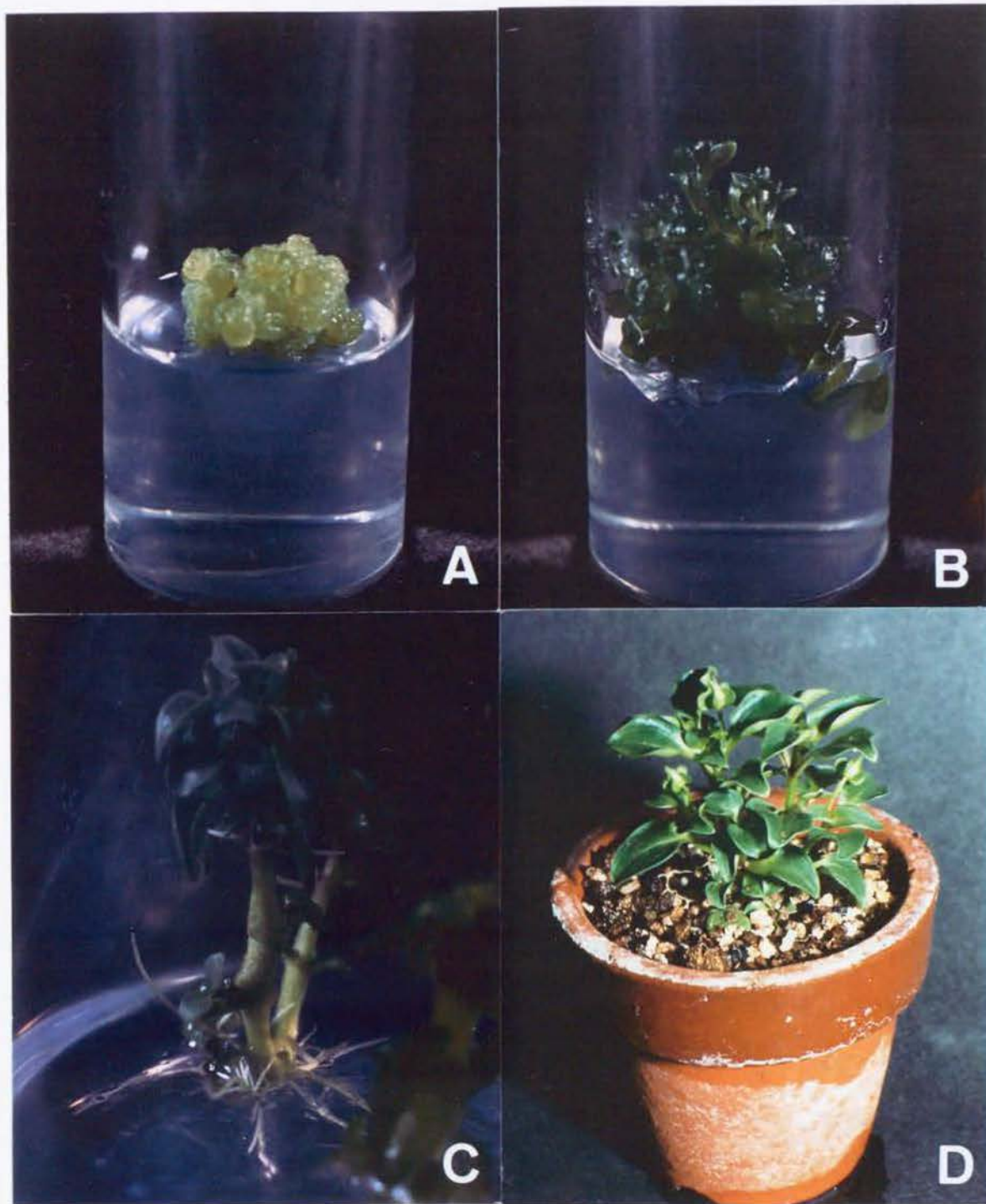


図 2 - 9 エキザカム葉片からのカルス形成および植物体再生

A : 葉片に形成されたカルス (培養約60日後)

B : 葉片由来カルスからのシュート形成 (培養約120日後)

C : シュートからの根形成

D : 順化した植物体

植物成長調節物質無添加区（1区）のみで20%の頻度で観察された。

次に、エキザカムの無菌植物体の根に形成されたカルス様のものを用い、2,4-D 0~2.0mg/lとBA 0~2.0mg/l添加した5区を設定し、シュート誘導および根形成について調査を行った（表2-14）。その結果、シュート形成は植物成長調節物質無添加区（1区）および2,4-D 0.1mg/lとBA 0.1mg/l添加区（2区）で培養11日目ころからみられ、シュート形成率はそれぞれ47%および7%であった（図2-10）。根の形成は、シュート形成した区と同じ1区および2区で培養24日目ころから形成され、根形成率は、それぞれ40%および7%であった。

4. 考察

エキザカムの組織培養に関する報告は、Torres and Natarella(1984), Ornstrup et al.(1993)があるのみである。本実験では、エキザカムの葉片および根を用いて、カルス形成に及ぼす植物成長調節物質の影響について検討を行い、両外植片で2,4-DおよびBAの組み合わせでカルスを誘導することができた。特に、葉片培養では、広範囲の植物成長調節物質の濃度に反応し、カルスの形成がみられたが、根培養ではBAの濃度に比例しカルスの形成率が低下する傾向がみられた。一方、根培養の場合、植物成長調節物質を含まない試験区でも効率良く、カルス形成がみられた。一般的に、組織からのカルス形成はオーキシンやサイトカイニンの添加によって誘導されることが知られている。本実験のエキザカムの根培養では、オーキシンとサイトカイニンのどちらとも存在しない培地でカルス形成がみられ、根は内生の植物成長調節物質の濃度が高いことが推察された。このことは、前述したようにMS培地で継代している中の無菌植物に生じた根でもカルス様のものが形成されることから支持されると

表 2-14 エキザカム無菌植物体に生じた根由来カルスからのシュート
形成に及ぼす植物成長調節物質の影響

試験区	植物成長調節物質 (mg/l)		カルス		シュート	根形成数 (%)
	2,4-D	BA	置床数	形成数(%)	形成数 (%)	
1	0	0	15	15(100)	7(47)	6(40)
2	0.1	0.1	15	15(100)	1(7)	1(7)
3	0.5	0.5	15	13(86)	0(0)	0(0)
4	1.0	1.0	15	11(73)	0(0)	0(0)
5	2.0	2.0	15	7(46)	0(0)	0(0)

調査日：培養約90日目



図2-10 エキザカムの根に形成されたカルス様組織からの
シュート形成（移植後7日）

思われる。

葉片由来カルスは、BA添加のシュート誘導培地で比較的高い頻度でシュートを誘導することができ、それらは植物成長調節物質無添加のMS培地で根を形成し、植物体を再生した。従来のエキザカムの組織培養では、茎頂 (Torres and Natarella 1984) , 蕾および花梗 (Ornstrup et al. 1993) を用いた報告があるのみで、葉片および根などを用いた報告例はない。本実験で外植片として用いた葉片および根は、入手が容易なことや培養には簡便な材料であることから、様々な培養系に応用できると考えられる。

また、試験管内で培養している植物体の根にカルスが形成されることをみいだし、このカルスを培養した結果、シュートを誘導することができた。この根由来のカルスもこのことから、エキザカムの再分化系の新たな外植片として高い利用価値を持っていることが示唆された。

以上の結果から、本実験では、エキザカムの葉片および根由来カルスから比較的高頻度に植物体再生できることが明らかとなった。今後、本実験で開発した再生系を利用し、ソマクローナルバリエーションの利用およびプロトプラスト培養、形質転換体の作出などに応用できるものと考えられる。