

## 第5章 結 言

## 第5章 結 言

園芸用花卉としてのリンドウ、特に切花用リンドウは、わが国で戦後エゾリンドウ(*G. triflora*)やササリンドウ(*G. scabra*)の山採り株を品種改良した比較的歴史の浅い花卉であり、わが国独自に開発したオリジナルな花卉ということができる。現在、その生産は日本の北から南まで行われており、その生産・需要が全国的に伸びている。一方、従来のお盆などの需要に加えて、新たな需要を呼び起こすために周年的な観賞に適した新規な形質をもつ品種の開発を求め声は大きい。しかし、育種の歴史が浅いため、現在の品種の遺伝的背景は狭く、また $F_1$ 育種に不可欠な純系が得られにくい、親系統の増殖が困難である、花色変異が狭い等の問題点が数多くある。さらに、育種の素材として利用される遺伝資源の植物群の類縁関係などの基礎知見も不十分であり、またバイオテクノロジー技術も十分開発されているとはいえない。

このようなリンドウ育種を取り巻く状況を背景として、本研究は、はじめにバイオテクノロジー技術の基礎となるリンドウの培養系の開発を目的にし、次に分子生物学的手法を用いたリンドウ属植物の系統解析を行った。

組織培養を用いたリンドウの培養系の開発は、 $F_1$ 品種の優良親系統および固定種の大量増殖が効率よく行われることを可能とする。また、効率的な再分化系を利用することにより、培養変異によるソマクローナルバリエーションの利用およびアグロバクテリウム等による遺伝子導入技術の開発につながる。本研究では、切花用リンドウの素材である*G. scabra*および*G. triflora*の再分化系の確立をおこなった。*G. scabra*では、再現性のある不定胚形成系を確立することができ、さらに組織学的観察によりリンドウで初めて不定胚形成過程に関する知見を得ることができた。今後、サスペンション培養系等、より効率の良い培養系へと改良することで、不定胚を用いた大量増殖はもとより、各種ス



トレスに対する細胞選抜や人工種子の開発等へ利用できるものと期待される。一方、*G. triflora*では、TDZを用いることで効率の良い不定芽再生系を確立することができた。TDZは*G. scabra*でも不定胚形成に効果があることから、リンドウ属の組織培養にとって、再分化に重要なサイトカイニン系の植物成長調節物質といえることができる。切花用のリンドウの重要な素材2種で再分化系が確立されたことは、形質転換体作成技術につながり、新たな花色、耐病性、新形態等に関係する遺伝子を導入することで、今後新しい形質を付与したリンドウが開発されることが期待される。

プロトプラスト培養に関しては、現在までに再分化の報告例はあるが (Takahata and Jomori 1989, Nakano et al. 1995, 村山 1996, Meng et al. 1996), 細胞融合による体細胞雑種の報告はない。この理由としては、プロトプラストからの再分化系が不安定であることが考えられる。本研究では、リンドウ属3種6系統およびトルコギキョウ、エキザカムでプロトプラスを単離することができた。しかし、培養に関しては*G. scabra*, *G. triflora*の両種を用い、コロニー形成と根の分化は見られたが、植物体再生はできず、安定した再分化系を開発することができなかった。その原因は不明だが、一つには、植物成長調節物質を詳細に検討しなかったことがあげられる。前述のようにリンドウの再分化にはTDZが有効であることが明らかとなり、プロトプラスト培養でも*G. triflora*のコロニー形成でその効果が認められた。しかし、その後カルスからの再分化の際、広範な濃度のTDZを検討しなかったことが、再生系を開発できなかったものと考えられる。今後、TDZの好適濃度を検討することで、再生系の開発は可能と考えられる。現在、遺伝子導入系はアグロバクテリウムやパーテクルガン等に代表されるものが主流になっているが、プロトプラストを用いた非対称融合による遺伝子導入や対称融合による新形質組み合わせの



新たな植物の開発も花卉類では重要と考えられ、本結果はそれらの開発の基礎的な知見を与えたものと考えられる。

リンドウの他リンドウ科に含まれる園芸植物として、トルコギキョウとエキザカムがあるが、本研究ではエキザカムについても再生系の検討を行い、再現性のある不定芽を経由した再生系を確立することができた。近年、エキザカムの不定胚形成やプロトプラストからの植物体再生の報告もあり(高橋 2000)、本実験はこれらの報告に基礎的な知見を与えることができたものと考えられる。

前述したように切花用のリンドウは*G. scabra*と*G. triflora*という2種を素材として育種されてきた。両種は交配可能で両種間の交雑によるF<sub>1</sub>品種も作出されている。この両種の系統学的類縁関係については詳細にはわかっていないが、交配可能なことからかなり近縁で同一種とも考えられる。本研究では、この両種の系統類縁関係を明らかにするため、RAPD法を用いて検討した。その結果、両種は明確に分かれ、分子レベルでは分化していることが明らかとなった。さらに、両種を識別できるSCARマーカーを開発することができ、種間交雑や体細胞雑種の作成の際の識別マーカーとして利用できる可能性を示した。

一方、リンドウ属全体としてみると、その分布は世界中にあり、種の数も約360種と多く、これらは切花用リンドウを品種改良を行う上で遺伝資源として有用なものと考えられる。しかし、これらの植物種の類縁関係は、現在のところそれほど明確に解析されていない。本研究で葉緑体DNAのPS-Ⅱ配列に着目して系統解析を行ったが、用いたリンドウ属の17種のうち切花用リンドウを含め12種が同一の配列を持っていた。このことから、これらの種間の類縁関係はかなり近いものと考えられ、リンドウの育種を進める上で利用できるものと考えられた。一方、黄花のリンドウとしてその花色の導入が期待されている*G.*



*lutea*は、リンドウとはかなり遠縁であることが示され、交配による黄色の花  
色を導入することは不可能と考えられ、細胞融合や遺伝子導入法を適用する必  
要があることが示唆された。

以上のように、本研究ではリンドウの育種を効率よく進める上で必要と考え  
られる組織培養技術の確立と種間の類縁関係の解析について検討し、基礎的な  
知見を与えることができた。しかし、組織培養に関しては、種間雑種を得るた  
めに必要な胚培養・子房培養、純系を効率よく得るために必要な葯・花粉培養  
等についての研究は未検討である。また、種間の類縁関係についても、わが国  
のリンドウ属の種をすべて解析できなかった。今後、これらの点について、研  
究を進めることが期待される。

## 摘 要

本研究は、リンドウ属 (*Gentiana*) 園芸植物の育種を進める上で必要な2点について研究を行った。まず、細胞工学的手法による育種方法を開発するために、その基礎的な組織培養による再分化系の確立を行ない、さらに、リンドウ科植物の類縁関係を明らかにするために分子生物学的手法を用いた系統解析を行った。

### 1. リンドウ科園芸植物の再分化系の確立

園芸用リンドウ (*Gentiana* spp.) の再分化系を確立することを目的として、葉片を外植片としてカルス形成およびシュート誘導における植物成長調節物質の影響について検討した。ササリンドウ (*G. scabra*) およびエゾリンドウ (*G. triflora*) では、2,4-D と BA の組み合わせによりカルス形成した。さらに、*G. scabra* では、BA および TDZ により形成されたカルスから不定芽と不定胚が形成された。また、TDZ の再分化に対する効果を確認する目的で葉片培養を行ったところ、*G. scabra* では、不定胚を、*G. triflora* では、不定芽を誘導できた。さらに、*G. scabra* で誘導された不定胚について組織学的観察を行い、不定胚は形成されたカルス内および葉片の表皮細胞から由来していることが明らかとなった。次に、エキザカム (*Exacum affine*) の再分化系の確立を行い、葉片培養では2,4-D と BA の組み合わせによりカルス形成し、さらに BA によりカルスからの不定芽形成が可能となった。また、無菌植物体の根に形成したカルスを外植片とすると再分化がみられ、再分化能のある外植片として利用可能なことを明らかとなった。

### 2. リンドウ属植物のプロトプラスト培養



リンドウ属植物3種 (*G. scabra*, *G. triflora*, *G. acaulis*), およびトルコギキョウ (*Eustoma grandiflorum*), エキザカム (*Exacum affine*) の計5種8系統についてプロトプラストの単離方法を検討した。また, *G. scabra* および *G. triflora* のプロトプラスト培養について培養条件を検討した。その結果, プロトプラストの単離については, 3種類の酵素組成を用いて調査したところ, すべての材料でプロトプラストが得られたが, 種間や系統間差異が認められ, *G. scabra* では, セルラーゼオノズカ RS を含む酵素組成, *G. triflora* では, セルラーゼオノズカ R-10 を含む酵素組成で多くのプロトプラストが得られた。また, プロトプラストの活性率は, エキザカムの 23.3% から *G. triflora* ‘いわて乙女’ の 86% まで変異した。*G. scabra* のプロトプラスト培養では, MS 培地の硝酸アンモニウム濃度を 1/4 にし, NAA 2mg/l と BA 1mg/l を含む培地でコロニー形成させることができ, さらにカルス形成と根の分化がみられたが, 植物体再生に至らなかった。また, プロトプラストの褐変化防止物質の効果を調査したところ, アスコルビン酸添加によりプロトプラスト褐変化防止がみられたが, 分裂はみられなかった。一方, *G. triflora* では, BA よりも TDZ がプロトプラストの分裂およびコロニー形成に効果的であった。しかし, 根の分化がみられただけで植物体再生には至らなかった。

### 3. 分子生物学的手法によるリンドウ科植物の分類

園芸用のリンドウの育種に利用されている *G. triflora* と *G. scabra* の種内および種間の変異性を明らかにするため, *G. scabra* 4 系統, *G. triflora* 6 系統, 両種の交雑種 3 系統および *G. triflora* 種内の交雑種 2 系統の合計 15 系統を用い RAPD 法により解析した。用いた 36 個のプライマーのうち, 8 個のプライ



マーで53の多型を示すバンドが得られ、種間変異と同様に種内変異が存在していた。数量化理論Ⅲ類およびクラスター分析を行った結果、用いた系統は*G. scabra*と*G. triflora*の2群に分かれた。ただし、*G. scabra*の1系統OZ（尾瀬系）のみは*G. triflora*のグループに属した。また、両種の交雑系統（*G. scabra*×*G. triflora*）は*G. scabra*と同じグループに属した。次に、両種を識別するためのSCARマーカー化を試みた。それぞれの種に最も特異的な多型バンドの塩基配列を決定し、新たな2組のSCARプライマーをデザインした。これらのプライマーのうち*G. triflora*に特異的なものは、同種および同種内の交雑系統8系統のうち6系統で特異断片を増幅し、*G. scabra*に特異的なプライマーは、RAPD法で分類に疑問が出ているOZ（尾瀬系）を除く全ての系統で特異断片を安定して増幅した。これらのSCARプライマーについては、さらに多くの系統を調査してその安定性を明らかにする必要があるが、現在のところある程度種を識別できるマーカーとして利用できると考えられた。

次に、葉緑体DNAの*rpl16-rpl14*の介在配列のPlastid subtype ID (PS-ID) 配列の解析により、リンドウ属17種、トルコギキョウ、エキザカムおよびセンブリの合計20種22系統を用いてそれらの類縁関係を調査した。その結果、得られた塩基配列は、98~102bpであり、同じ配列をもつものが12種14系統あり、異なるものは最大で45個の配列が異なっていた。塩基配列に基づき、系統樹を作成したところ、リンドウ属とその他の属に大きく二つに分かれた。リンドウ属内の種については、 $2n=26$ の染色体数を持つ種は、すべて同一のPS-ID配列を持っており、近縁性を示したが、 $2n=36$ など染色体数の異なる種とは部分的に異なる配列を示し、系統的に異なると考えられた。また、PS-ID配列および形態的な特徴から、*G. lutea*は、*G. scabra*などの種からは遠縁であることが示唆された。一方、リンドウ属以外のグループでは、エキザカムとセンブリが



比較的近縁で、トルコギキョウがそれらと遠縁であることが示された。



## 謝 辞

本研究の遂行に際し、終始変わらぬ多大な激励とご指導を頂いた岩手大学教授高畑義人博士ならびに岩手大学長海妻矩彦博士に心から感謝の意を表す。また本論文においてご校閲の労をとられた岩手大学教授遠藤元庸博士、山形大学教授今西 茂博士、弘前大学教授新関 稔博士ならびに岩手大学助教授渡辺正夫博士に厚くお礼申し上げます。岩手大学名誉教授石原愛也博士には組織培養のご指導を、千葉大学助教授中村郁郎博士にはDNA分析のご指導を、岩手大学助教授金澤俊成博士には組織学的観察のご指導をして頂き感謝の意を表す。

(財)岩手生物工学研究センター所長江井 仁博士、東北農業試験場上席研究官日高 操博士、同育種工学研究室長吉田泰二氏、同主任研究官中村俊樹博士には、それぞれ研究の場所および機会を提供して頂き、岩手県安代町花き開発センター所長吉池貞蔵氏、同副所長日影孝志氏、岩手県農業研究センター主任研究員阿部 潤氏、同沼田 聡氏にはリンドウの材料および情報を提供して頂き感謝する。また新潟大学助教授中野 優博士ならびに岩手県立岩谷堂高等学校教諭及川 研氏にはプロトプラストの単離方法を、千葉大学亀谷七七子さん、岩手大学大島正稔氏にはシーケンス方法のご指導を頂いた。元岩手県立盛岡農業高等学校校長高橋重実氏には岩手大学連合大学院社会人入学に際し多大なご理解とご苦勞をおかけし、前岩手県立宮古北高等学校校長鈴木 浩氏、同校長駒嶺高幸氏には職務と研究の両立を理解していただき厚く感謝の意を表す。さらに、論文の完成に際し終始激励して頂いた東京農業大学教授富高弥一平博士、岩手大学助教授稲田委久子博士に感謝の意を表す。岩手県立宮古北高等学校の職員の各位からも、様々な形でご支援いただいた。

以上の各位に対し、心より感謝の意を表す。



## 引用文献

- 阿部 潤 (1988) リンドウの大量増殖. 農耕と園芸 (9) : 184-187.
- 阿部 潤 (1990) 花の新品種開発と産地化. 東北農業研究 43 (別3) : 43-57.
- 天野良彦・西澤秀治・谷口研至・近藤勝彦・西村繁夫 (1989) リンドウの苗条原基法によるクローン増殖. 育雑39 (別2) : 112-113.
- Ali, M., H. Okubo and K. Fujieda (1991) In vitro multiplication of Intra- and interspecific *Solanum* Hybrids through somatic embryogenesis and adventitious organogenesis. J. Japan. Soc. Hort. 60 : 601-612.
- Ammirato, P. V. (1983) Embryogenesis. In "Handbook of plant cell culture Vol.1 Techniques for propagation and breeding". Evans, D. A. et al. (eds.), MacMillan, New York. 82-123.
- Bajaj, Y. P. S. (1995) Biotechnology in agriculture and forestry 34, Springer, Berlin. 1-311.
- Bena, G., M. F. Jubier, I. Olivieri and B. Lejeune (1998) Ribosomal external and internal transcribed spacers: combined use in the phylogenetic analysis of *Medicago* (Leguminosae). J. Mol. Evol. 46 : 299-306.
- Binzel, M. L. N. Sankhla, S. Jooshi and D. Sankhla (1996) Induction of direct somatic embryogenesis and plant regeneration in pepper (*Capsicum annuum* L.). Plant Cell Rep. 15 : 536-540.
- Botstein, D., R. L. White, M. Skolnick and R. W. Davis (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. Am. J. Hum. Genet. 32 : 314-331.



- Burruset, M., C. C. Gillbert and D. Bindy (1991) Regeneration of fertile plants from protoplasts of sunflower (*Helianthus annuus* L.) Plant Cell Rep. 10 : 161-166.
- Cerny, T. A., G. Caetano-Anolles, R. N. Trigiano and T. W. Starman (1996) Molecular phylogeny and DNA amplification fingerprinting of *Petunia* taxa. Theor. Appl. Genet. 92 : 1009-1016.
- Choi, Y. E., D. C. Yang, E. S. Yoon and K. T. Choi (1999) High efficiency plant production via direct somatic single embryogenesis from perplasmolysed cotyledons of *Panax ginseng* and possible dormancy of somatic embryos. Plant Cell Rep. 18 : 493-499.
- Cocking, E. C. (1960) A method for the isolation of plant protoplasts and vacuoles. Nature 187 : 962-963.
- Dellaporta, S. L., J. Wood and J. B. Hicks (1983) Plant DNA mini-preparation, version I. Plant Mol. Biol. Rep. 1 : 19-21.
- Dodeman, V. L. and G. Ducreux (1996) Isozyme patterns in zygotic and somatic embryogenesis of carrot. Plant Cell Rep. 16 : 101-105.
- Eckenrode, V. K and C. S. Levings III (1986) Maize mitochondrial genes. In Vitro Cell. Dev. Biol. 22 : 169-176.
- Edward, S. B. IV and T. P. Holtsford (1996) Zea systematics: Ribosomal ITS evidence. Mol. Biol. Evol. 13 : 612-622.
- 遠藤元庸 (1998) リンドウ園芸用種における種・品種分化, 特に花色素および染色体に関する研究, 平成7・8・9年度科学研究費補助金(基盤研究B) 研究成果報告書 : 1-51.



- Evans, D. A. and W. R. Sharp (1981) Growth and behavior of cell cultures : Embryogenesis and organogenesis. In "Plant Tissue Culture" , Thorpe, T. A. (ed.), Academic press, New York. 45-113.
- Frearson, E. M., J. B. Power and E. C. Cocking (1973) Isolation, culture and regeneration of *Petunia* leaf protoplast. Dev. Biol. 33 : 130-137.
- 深井誠一・柴田道夫・天野正之・山崎教道・大江正温 (1988) キクのプロトプラストからの植物体再生. 大阪農技研報 25 : 25-30.
- Garin E., E. Grenier and G. G. March (1997) Somatic embryogenesis in wild cherry (*Prunus avium*). Plant Cell, Tiss. Org. Cult. 48 : 83-91.
- Gielly, L. and P. Taberlet (1996) A phylogeny of the European gentians in ferred from chloroplast *trn L* (UAA) intron sequences. Bot. J. Linn. Soc. 120 : 57-75.
- Goldblatt, P. and D. E. Johnson (1998) Index to plant chromosome Numbers 1994-1995. Missouri Botanical Garden Press, St. Louis. 92-93.
- Griesbach, R. J. (1988) Recent advances in the protoplast biology of flower crops. Sci. Hortic. 37 : 247-256.
- 長谷部光泰 (1990) 葉緑体DNA を用いた陸上植物の分子系統学. 日本植物学会会報 8 : 54-75.
- 長谷部光泰 (1992) 葉緑体DNA とシダ植物の系統. 遺伝 46 : 30-36.
- Hayashi, C. (1950) On the quantification of qualitative data from the



- mathematico statistical point of view. Ann. Inst. Statist. Math.  
2 : 35-47.
- НАУКА, ИЗДАТЕЛЬСТВО (1969) ХРОМОСОМЬЕ УИСЛА ЦВЕТКОВЬИХ РАСТЕНИЙ  
Otto Koeltz Science Publishers, Koenigstein, West Germany.
- Hosokawa, K., M. Nakano, Y. Oikawa and S. Yamamura (1996) Adventitious  
shoot regeneration from leaf, stem and root explants of  
commercial cultivars of *Gentiana*. Plant Cell Rept. 15 : 578-581.
- Hosoki, T., D. Kimura, R. Hasegawa, T. Nagasako, K. Nishimoto, K.  
Ohta, M. Sugiyama and K. Haruki (1997) Comparative study of tree  
peony (*Paeonia suffruticosa* Andr.) cultivars and hybrids by  
random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. J. Japan.  
Hort. Sci. 66 : 393-400.
- Huetteman, C. A and J. E. Preece (1993) Thidiazuron : a potent  
cytokinin for woody plant tissue culture. Plant Cell, Tiss. Org.  
Cult. 33 : 105-119.
- 石原愛也 (1965) ニンジンの貯蔵根起源のカルスの生長およびカルスにおける  
器官形成に関する組織学的観察. 日作紀 34 : 431-439.
- 系坪みゆき (1991) 花き類の大量繁殖に関する研究. 岩手大学教育学部技術科  
卒業論文.
- 岩手県農政部農産園芸課 (2000) 花きに関する資料. 1-23.
- Jones T. J. and T. L. Rost (1989) The development anatomy and ultra-  
structure of somatic embryos from rice (*Oryza sativa* L.)  
scutellun epithelial cells. Bot. Gaz. 150 : 41-49.
- 鎌田 博・原田 宏 (1982) 不定胚形成. 細胞工学 1 : 29-34.



- Kato, M. (1996) Somatic embryogenesis from immature leaves of *in vitro* grown tea shoots. *Plant Cell Rep.* 15 : 920-923.
- 木村和史 (1989) リンドウの組織培養による効率的繁殖方法の研究. 岩手大学教育学部技術科卒業論文.
- 小林光子・米内貞夫 (1991) リンドウの半数性個体育成のための花粉培養. 育雑 41 (別1) : 46-47.
- Kohlein, F. (1991) *Gentians*. Timber press, Portland, Oregon.
- 小岩弘之・竹原和子・山村三郎 (1994) リンドウの不定芽分化の細胞組織学的観察. 日本植物学会東北支部講演要旨 : 27.
- Kunitake, H., T. Nakashima, K. Mori, M. Tanaka and M. Mii (1995) Plant regeneration from mesophyll protoplasts of *lisianthus* (*Eustoma grandiflorum*) by adding activated charcoal into protoplast culture medium. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 43 : 59-65.
- Kusnezow, N. J. (1893) Neue asiatische und amerikanische Gentianen. *Acta Hort. Petrop.* 13 : 57-64.
- Kusnezow, N. J. (1896-1904) Subgenus *Eugentiana kusnezow generis Gentiana tournef.* *Acta Hort. Petrop.* 15 : 1-507.
- Lu, C. (1993) The use of Thidiazuron in tissue culture. *In Vitro Cell. Biol.* 29 : 92-96.
- Lu, C. Y. and I. K. Vasil (1985) Histology of somatic embryogenesis in *Panicum maximum* (Guinea grass). *Amer. J. Bot.* 72 : 1908-1913.
- Maheswaran, G. and E. G. Williams (1985) Origin and development of somatic embryoids formed directly on immature embryos of *Trifolium repens in vitro*. *Ann. Bot.* 56 : 619-630.



- 増田哲男・別所英男・小森貞男・土屋七郎 (1994) マルバカイドウM084の組織培養系における幼植物の根からの不定芽形成に及ぼすThidiazuronおよびCasamino酸の影響. 園学雑 63 : 39-43.
- 松本悦夫 (1986) リンドウのやく培養. 園学要旨 昭61春 : 392-393
- 松本正美 (1988) 胚発生様式による分化の全能性—形態的断面を中心にして—. 細胞 20 : 426-430.
- 丸田一成 (1989) 組織培養によるリンドウの大量増殖. 長野野菜花き試報 5 : 57-64.
- 丸田一成・松本悦夫 (1989) リンドウの薬培養による半数性植物体育成. 長野野菜花き試報 5 : 51-56.
- 丸田一成・清野澄夫・松本悦夫 (1989) 組織培養によるリンドウの大量増殖. 長野野菜花き試報 5 : 57-64.
- 三位正洋 (1989) 不定芽分化の制御. 植物細胞工学 1 : 117-124.
- Meng, Y., Y. Gao and J. Jia (1991) Plant regeneration from protoplasts isolated from callus of *Gentiana crassicaulis*. Plant Cell Rep. 16 : 16-88.
- Millan, T., F. Osuna, S. Cobos, A. M. Torres and J. I. Cubero (1996) Using RAPDs to study phylogenetic relationships in *Rosa*. Theor. Appl. Genet. 92 : 273-277.
- Mok, M. C., D. W. S. Mok, J. E. Turner and C. V. Mujer (1982) Biological and Biochemical Effects of Cytokinin-active Phenylurea Derivatives in Tissue Culture Systems. Hort. Sci. 22 : 1194-1197.
- Murakami, A (2000) Comparison of sequence of *rbcl* and non-coding



- regions of chloroplast DNA and ITS2 region of rDNA in Genus  
*Humulus*. Breed. Sci. 50 : 155-160.
- Murashige, T and F. Skoog (1962) A revised medium for rapid for growth  
an bioassays with tobacoo tissue culture. *Physiol. Plant.* 15 :  
473-497.
- 村山 徹・井上純一・柴橋輝夫 (1991) リンドウ未熟胚珠からの植物体再生.  
第12回日本植物組織培養学会シンポジウム : 214.
- 村山 徹・佐藤 寧・柴橋輝夫・土屋光春 (1993) リンドウ葉片からの効率的  
な不定芽形成および発根・順化の簡略化. *園学雑* 62 (別2) : 490-491.
- 村山 徹・村山秀樹・佐藤 寧・小笠原庄司 (1996) トルコギキョウプロトプ  
ラストからの植物体再生. *園学雑* 65 : 105-111.
- Nagata, T and I. Takebe (1970) Cell wall regeneration and cell  
division in isolated tobacco mesophyll protoplasts. *Planta* 92 :  
301-308.
- Nakamura, I., N. Kameya, Y. Kato, S. Yamanaka, H. Jomori and Y. Sato  
(1997) A proposal for identifying the shoot ID sequence which  
addresses the plastid subtype of higher plants. *Breed. Sci.*  
47 : 385-388.
- Nakano, M. and M. Mii (1993) Protoplast culture and plant regeneration  
of several species in the genus *Dianthus*. *Plant Cell Rep.* 11 :  
225-228.
- Nakano, M. K. Hosokawa, T. Oomiya and S. Yamamura(1995) Plant  
regeneration from protoplasts of *Gentiana* by embedding  
protoplasts in gellam gum. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 41 : 221



- 中野 寛・前田英三 (1974) イネカサの茎葉形成過程に関する形態学的研究. 日作紀 43 : 151-160.
- Newton, K. J (1988) Plant mitochondrial genomes : organization, expression and variation. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 39 : 503-532.
- 西村繁夫・斉藤猛雄・山口真実子 (1990) 不定胚形成の現状と誘導技術. バイオホルティ 5 9-15.
- Nishio, T., H. Yamaguchi and K. Takayanagi (1987) Efficient plant regeneration from hypocotyl protoplasts in eggplant (*Solanum melongena* L. and *S. insnum* L.). Japan. J. Breed. 37 : 389-396.
- 西澤秀治・天野良彦・松澤恒友・西村繁夫 (1991) リンドウにおける体細胞胚形成について 第12回日本植物組織培養学会シンポジウム : 46.
- 野沢明美・海老原充 (1993) “組換えDNA実験ノート (基本操作編)”, 現代工学社, 東京.
- 荻原保成 (1992) 葉緑体DNAとイネ科植物の系統. 遺伝 46 : 37-43.
- 大塚寿夫・末松信彦・戸田幹彦 (1985) キクのプロトプラスト培養と植物再分化. 静岡農研報 30 : 25-33.
- Ornstrup, H., J. P. Molgaard and B. Farestveit (1993) Somatic embryogenesis and plant regeneration from cell suspensions of *Exacum affine*. Plant Cell, Tiss. Org. Cult. 35: 37-41.
- Paran, I. and R. W. Michelmore (1993) Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance gene in lettuce. Theor. Appl. Genet. 85 : 985-993.



- Pierik, R. L. M. (1987) *In vitro* culture of higher plants. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht. 213-227.
- Reinert, J. (1958) Morphogenese und ihre kontrolle an gewebeulturen aus carotten. *Naturwissenschaften* 45 : 344-345.
- Sanger, F. G. B.B. Brownlee and B. G. Barrel (1965) A two-dimensional fraction procedure for radioactive nucleotides. *J. Mol. Biol.* 13 : 373-398.
- サンティスク タワチャイ (1994) リンドウ トルコギキョウ, “植物の世界 26” 朝日新聞社編, 東京. 3-55.
- 佐藤光子 (1986) 組織培養による福島県リンドウの大量増殖と新系統育成 第 1 報 組織培養苗の冬至芽形成について. 園学要旨 昭63東北支部 : 59-60.
- Sharma N., K. P. S. Chandel and A. Paul (1993) *In vitro* propagation of *Gentiana kurroo* an indigenous threatented plant of medicinal importance. *Plnat Cell, Tiss. Org. Cul.* 34: 307-309.
- 清野栄美・仲野英秋・佐藤昌宏・小野恵二 (1991) リンドウの苗条原基誘導. *東北農業研究* 44 : 303-304.
- 清水建美 (1994) リンドウ・トルコギキョウ “植物の世界26” 朝日新聞社編, 朝日新聞社編, 東京. 3-34.
- Soltis D. E., P. S. Soltis and B. G. Milligan (1991) Interspecific chloroplast DNA variation : systematic and phylogenetic implication. In “Molecular systematics of plant” . Soltis, P. S. (ed.) New York. 117-150.
- Stamp, J.A. (1987) Somatic embryogenesis in Cassava : The anatomy and



- morphology of the regeneration process. *Ann. Bot.* 59 : 451-459.
- Steward, F. C. M. O. Mapes and J. Smith (1958) Growth and organized development of culture cell I Growth and division of freely suspended cell. *Amer. J. Bot.* 45 : 693-703.
- Taberlet, P., L. Gielly, G. Pautou and J. Bouvent (1991) Universal primers for amplification of three non-coding region of chloroplast DNA. *Plant Mol. Biol.* 17 : 1105-1109.
- 田平弘基・下中雅仁・鷹見敏彦・大村修司 (1989) エゾリンドウの苗条原基誘導. *園学雑* 58 (別2) : 522-523.
- 田平弘基 (1991) エゾリンドウにおける体細胞胚形成. *育雑* 41 (別2) : 280-281.
- 田平弘基・大村修司 (1991) エゾリンドウの苗条原基誘導. *鳥取県園試報* 1 : 1-7.
- 田平弘基・大村修司・下中雅仁 (1991) エゾリンドウの花器からのカルス形成と植物体再生. *園学雑* 60 (別1) : 450-451.
- 高橋 晋・遠藤元庸・稲田委久子・上本俊平 (1991) エゾリンドウの越冬芽の組織培養による増殖. *園学要旨* 平3東北支部 : 51-52.
- 高橋 亮 (2000) リンドウ科植物の組織・細胞培養に関する研究. 岩手大学農学研究科応用生物学専攻 修士論文.
- 高畑義人 (1987) リンドウのプロトプラストの単離と培養. *園学要旨* 昭62東北支部 : 73-74.
- Takahata, Y. and H. Jomori (1989) Plant regeneration from mesophyll protoplasts of gentian (*Gentiana scabra* Bungei). *Plant Tissue Culture Letters* 6 : 19-21.



- Takebe, I., Y. Otsuki and S. Aoki (1968) Isolation of tobacco mesophyll cells in intact and active state. *Plant Cell Physiol.* 9 : 115-124.
- 田中正美・小代寛正 (1992) リンドウ葉肉プロトプラストの単離と再分化. 園学九研集 1 : 81-82.
- 田中正美・小代寛正 (1995) リンドウ科植物のプロトプラスト培養と植物体再分化. 熊本農研セ研報 4 : 75-85.
- Tisserat, B., E. B. Esan and T. Murashige (1979) Somatic embryogenesis in angiosperms. *Hort. Rev.* : 1-78.
- Torres, K. C. and N. J. Ntarella (1984) *In vitro* propagation of *Exacum*. *HortScience* 19 : 224-225.
- Toyokuni H. (1965) *Systema Gentianarum Novissimum* -Facts and speculation relation to the phylogeny of *Gentiana, sensulato* and related genera. Asahikawa Nihon University. 1 : 147-158.
- 豊国秀夫・豊国やなぎ (1977) リンドウの分類と生態. 植物と自然 11 : 4-10.
- Vasil, V., C. Lu and I. K. Vasil (1985) Histology of somatic embryogenesis in cultured immature embryos of maize (*Zea mays* L.) . *Protoplasma* 127: 1-8.
- Ward, B. L., R. S. Anderson and A. J. Bendich (1981) The mitochondrial genome is large and variable in a family of plants (Cucurbitaceae). *Cell* 25 : 793-803.
- Ward, J. H. Jr. (1963) Hierarchical grouping to optimize an objective function. *J. Amer. Statist. Ass.* 58 : 236-244.
- Wargarete, W. (1988) Plant regeneration from leaf and stem segment of



- shoots raised in vitro from mature apple trees. *J. Plant Physiol.* 132 : 738-744.
- 衛 志明・鎌田 博・原田 宏 (1991) キリ (*Paulownia fortunei*) の葉肉プロトプラストからの植物体再生. *植物組織培養* 8 : 110-113.
- Williams, J.G., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski and S.V. Tingey (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535.
- Wolfe, K. H., W. H. Li and P. M. Sharp (1987) Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 : 9054-9058.
- Wolff K, and P. V. Rijn J. (1995) Rapid detection of genetic variability in chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) using random primers. *Heredity* 71 : 335-341.
- Yamagishi, M. (1995) Detection of section-specific random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in *Lilium*. *Theor. Appl. Genet.* 91 : 830-835.
- Yamada, Y., Y. Syoyama, I. Nishioka, H. Kohda, A. Namera and T. Okamoto (1991) Clonal Micropropagation of *Gentiana scabra* Bunggr var. *buergeri* Maxim. and examination of the Homogeneity Concerning the Gentiopicroside Content *Chem. Pharm. Bull.* 39: 204-206.
- 米澤信道・河野昭一 (1989) 日本産リンドウ属リンドウ節植物の変異性と分類学的位置. *植物分類, 地理* 40 : 13-30.
- 吉池貞蔵 (1984) リンドウの育種に関する研究 第1報 エゾリンドウの自然



- 変異. 岩手園試研報 5: 103-109.
- 吉池貞蔵 (1991) リンドウの育種. 育種学最近の進歩第33集, 養賢堂, 東京, 66-76.
- 吉池貞蔵 (1992) “花専科育種と栽培リンドウ”, 誠文堂新光社, 東京.
- Yuan, Y. M., P. Kupfer and J. J. Doyle (1996) Infrageneric phylogeny of the genus *Gentiana*(Gentianaceae) inferred from nucleotide sequences of the internal transcribed spacers(ITS) of nuclear ribosomal DNA. *Amer. J. Bot.* 83: 641-652.
- Yu-ling, M., G. Yun-peng and J. Jing-fen (1996) Plant regeneration from protoplast isolated from callus of *Gentiana crassicaulis*. *Plant Cell. Rep.* 16: 88-91.
- Zheng-yi, W. and Raven, P. H. (1995) Flora of China Gentianaceae through Boraginaceae. Missouri Botanical Garden, St Louis, 2-139.
- Zhou Y., Qian Y., Cai, Q., Zhang, Z and Yan, X. (1985) Studies on the callus formation of mesophyll protoplast from *Gentiana scabra* Bunge. *Acta Bot. Sin.* 27: 148-150.