



Title	バレイシヨの塊茎形成因子について
Author(s)	幸田, 泰則; KODA, Yasunori
Citation	北海道大学農学部邦文紀要, 16(1), 82-128
Issue Date	1988-03-31
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/12087
Type	departmental bulletin paper
File Information	16(1)_p82-128.pdf



パレイシヨの塊茎形成因子について

幸 田 泰 則

(北海道大学農学部作物生理学講座)

(昭和63年1月6日受理)

Factors Controlling Potato Tuberization

Yasunori KODA

(Department of Botany, Faculty of Agriculture,
Hokkaido University, Sapporo, 060, Japan)

目 次

第1章 緒 言	82
第2章 研 究 史	83
第3章 実験材料および方法	84
第4章 塊茎形成と環境要因	88
1. 個体の生育と塊茎形成	88
2. 培養茎断片の塊茎形成	89
第5章 塊茎形成と内生生長物質	92
第6章 塊茎形成における生長物質の役割	95
第7章 内生サイトカイニンの動向	99
1. 塊茎のブタノール可溶性, および 水溶性サイトカイニン	99
2. 貯蔵塊茎のサイトカイニン	104
3. 塊茎形成に伴う葉身のサイトカイ ニン含量の変動	109
第8章 塊茎形成物質	111
第9章 総合考察	118
摘 要	120
引用文献	121
英文摘要	126

本論文中では下記の略語を用いた。

IAA	Indole-3-acetic acid
ABA	Absciscic acid
GA	Gibberellin
GA ₃	Gibberellic acid
Z	Zeatin
ZR	Zeatin riboside
IPA	Isopentenyl adenine

IPAR	Isopentenyl adenosine
MeOH	Methanol
EtOH	Ethanol
ButOH	Butanol
CEPA	(2-chloroethyl) phosphonic acid
ACC	1-amino-cyclopropane-1-carboxylic acid
CCC	(2-chloroethyl) trimethyl ammonium chloride
TIS	Tuber inducing stimulus (塊茎形成物質)

第1章 緒 言

パレイシヨ (*Solanum tuberosum* L. ssp. *tuberosum*) はその生産量がコムギ, イネ, トウモロコシおよびオオムギに次ぐ主要作物である。単位面積当りのエネルギー生産量は主要5作物の中では最も高く, また収穫指数も高い。パレイシヨは塊茎が地下部に形成されるため, 環境要因変動の影響を受けにくく, 収量は比較的安定している。

栽培種パレイシヨの原種である *Solanum tuberosum* L. ssp. *andigena* の起源に関しては不明な点が多いが, その原産地である低緯度のアンデス山地 (標高2,000~4,000 m) において数種の *Solanum* 属の自然交配により生まれたものと考えられている。この *andigena* 種は短日条件下でのみ塊茎を形成する。16世紀にヨーロッパに伝播された4倍体の *andigena* 種は¹⁰¹⁾ 高緯度地域では夏期の長日のため十分な塊茎形成をきたさなかった。その後選抜により短日要求性の低い系統, ssp. *tuberosum* が育成され, 高緯度地域におけるパレイシヨ栽培の基盤が確立された。この栽培種パレイシヨ (以降パレイシヨとする) は, 祖先の形質により弱いながら短日感

応性を有し、短日条件下で早期の塊茎形成をきたす^{17,33,36,129}。またパレイシヨは冷涼な気候に適しており、長日条件下でも低夜温を与えると塊茎を形成する¹¹¹。これらの環境要因に対する塊茎形成の依存度は品種により大きく異なるが^{28,110}、どの品種も短日低夜温条件下で最も良好に塊茎を形成する。*Andigena* 種の循環選抜により育成された *neo-tuberosum* 種は明期のみの条件下でも塊茎を形成するが、暗期を長くするにつれて強い塊茎誘導を受けることから、基本的には短日要求型であると言える。

品種の早晩性と短日要求度との間には密接な関係があり、一般に早生種ほど短日要求性が低い²³。また高温耐性を示す品種も同様に短日要求性が低い。

パレイシヨ塊茎は地下の匍枝先端の次頂部の肥大生長により形成される。匍枝は長日高夜温条件(塊茎非誘導条件)では伸長を続けるが短日低夜温条件(塊茎誘導条件)では伸長を停止し、塊茎を形成する。GREGORY³⁶)は塊茎誘導条件により葉内で特異的な塊茎形成物質“Tuber inducing stimulus”が形成され、これが塊茎形成を直接誘起するとし、接木実験によってこれを実証した。しかしその物質の実体は現在までのところ明らかにされておらず、既知の植物生長物質のバランス変動が直接塊茎形成を誘起するとする説が有力となっている。塊茎誘導条件下で生ずる葉中のジベレリンの減少^{83,96})およびジベレリン処理による塊茎形成阻害⁸⁶)等の事実、ジベレリンの減退が塊茎形成の必要前提条件であることを明示している。しかし塊茎形成を直接誘起する能動因子がいかなるものであるかは解明されていない。

一般にパレイシヨは塊茎形成に伴い地上部の生育が停止する。KUMAR と WAREING⁶¹)は塊茎形成物質の形成と蓄積が頂芽の生育停止をもたらすと報告している。早期に塊茎が形成されると草丈は低くなり収量も低下する。したがって高収量を得るためには、生育初期の塊茎誘導刺激は微弱で、地上部が十分に繁茂する生育後期にその刺激が増加することが望ましい。

パレイシヨ塊茎形成を直接誘起する因子の解明は、植物の生育機構の理解に役立つのみならず、塊茎形成の人為的制御手法の開発にあたりきわめて重要な課題である。また育種学的観点からも高温耐性種の作出や品種の早晩性の検定に有用な手段を提供するものと考えられる。本研究においては、パレイシヨ塊茎形成因子の究明を試みると共にその生育に及ぼす植物生長物質類の影響について検討を加えた。

本論に入るに臨み、本研究の遂行にあたって懇切なる

御指導を賜った北海道大学農学部岡澤養三名教授および喜久田嘉郎教授に深甚なる謝意を表す。また本論文を取りまとめるにあたり御助言をいただいた同僚藤寛治名誉教授ならびに生越明教授に謹んで感謝の意を表す。

第2章 研究史

パレイシヨの塊茎形成を誘起する最も重要な要因は日長であり、短日条件下で早期の塊茎形成をきたすが^{17,28,33,36,129} 長日条件においても低夜温条件を与えると塊茎を形成する^{16,111}。また老化塊茎を親いもとすると、環境要因の如何にかかわらず塊茎化をきたす^{48,76}。

パレイシヨ匍枝は地上部の側枝とは異なり背地性が無く、地中を水平方向に伸長する横地性を示す。塊茎誘導刺激を受ると匍枝は伸長を停止し、その次頂部は塊茎化する。塊茎形成に伴う匍枝の形態的变化について最初に報告したのは ARTSCHWANGER⁷)であり、匍枝次頂部の肥大はまず髓部細胞の分裂により誘起され、次いで皮層部細胞が放射方向への分裂を起こし、最終的には内外師部組織の生長が旺盛になると述べている。REEVE^ら¹⁰²)も同様に塊茎肥大にあたり、各組織の由来について検討した。また PLAISTED⁹⁵)は生重量が200g以下の塊茎では細胞数の増加が肥大生長の主体をなし、内師部細胞の分裂に起因する髓部細胞の肥大も塊茎肥大に貢献すると報告した。他方 BOOTH¹⁰)は、匍枝先端部の肥大開始時の体積増加は細胞分裂によらず、髓部細胞の放射方向への肥大によることを認め、塊茎形成は匍枝細胞の伸長生長の肥大生長への転換によって開始すると論じている。この見解は CUTTER²²)によっても裏付けられた。匍枝先端部の肥大開始に伴って、澱粉粒の蓄積が旺盛となるが、この蓄積はこれに続く活発な細胞分裂には全く影響しない¹³。

塊茎誘導条件下でつくられ、塊茎形成を誘起する内生的塊茎形成要因の実態については若干の仮説が提示されている。たとえば ARTHUR^ら⁶)は光合成により生産された過剰の炭水化物が直接的要因であると主張した。さらに WERNER¹²⁹)は炭水化物のみならず窒素化合物も塊茎形成に顕著な影響を及ぼし、体内 C/N 比率の上昇が塊茎形成を誘起する主要因と論じた。MILTHORPE⁷⁰)もまた C/N 比率の重要性を指摘し、栄養説を主張した。これに対し GREGORY³⁶)は塊茎誘導条件により葉内で特異的な塊茎形成物質“Tuber inducing stimulus (TIS)”がつくられ、これが塊茎形成の直接的要因であるとし、接木実験によってこれを実証した。この見解は

CHAPMAN¹⁷⁾, KUMAR と WAREING⁶¹⁾ および EWING と WAREING³⁰⁾ によっても支持され、刺激物質説が提示された。MADEC⁶⁶⁾ はこの TIS の抽出を試み、塊茎誘導条件で育成した茎葉の搾汁液に塊茎形成促進効果があると報告した。しかしこの実験の追試をおこなった SIMMONDS¹⁰⁹⁾ はその効果を否定した。その後、この TIS の単離はなされておらず、その物質的実体は解明されていない。

一方 GREGORY³⁶⁾ の報告以来、塊茎形成における既知の植物生長物質の役割に関して多くの研究がなされ、塊茎形成は単一の特異的 TIS により誘起されるものではなく、2種以上の植物ホルモンのバランス変動により誘起されるとする説が有力となってきた。OKAZAWA^{83,84,86)} は塊茎形成とジベレリンの関係について検討し、塊茎誘導条件での葉のジベレリン処理による塊茎形成の阻害を認め、バレイショ体内のジベレリン含量の減少が塊茎形成の主要因であると報告している。このジベレリンの減少と塊茎形成との関連性についてはその後 HARMEY³⁹⁾, PONT LEZICA⁹⁶⁾, BOOTH と LOVELL¹¹⁾, RAILTON と WAREING⁹⁸⁾ および HAMMES と NEL³⁸⁾ によっても指摘されている。またジベレリンの生合成阻害剤である CCC 処理が塊茎形成を促進する事実も認められており^{97,119)}、ジベレリンの減少が塊茎形成の必須前提条件であることが明らかとなった。

これに対し、塊茎形成を直接誘起する能動的要因に関して様々な説が提示されているがいずれも反証され決定的なものはない。カイネチンをバレイショ培養茎断片に添加すると塊茎形成が誘起されることが指摘されて以来⁸⁹⁾、塊茎形成におけるサイトカイニンの重要性が論じられてきた^{32,72,91,114)}。バレイショ塊茎に含まれる主要サイトカイニンである cis-ZR もカイネチンと同様に塊茎形成促進効果を示し⁶⁷⁾、また葉の ZR 含量が塊茎誘導条件により一時的に増加をきたすことから^{31,63)}、MAUK と LANGILLE⁶⁷⁾ は cis-ZR が TIS であると主張した。しかし一方、KUMAR と WAREING⁶²⁾ はバレイショ挿穂にカイネチンを添加すると塊茎形成が阻害されることを見出した。また匍枝先端部に直接カイネチンを添加すると、匍枝は横地性を失ない直立した葉条茎に転換する事実も知られている¹³¹⁾。これらのことから TIZIO と BIAIN¹²⁰⁾ はサイトカイニンの塊茎形成効果を否定した。

他方、ABA の効果に関しても未だ統一した結論は得られていない。EL-ANTABLY²⁶⁾ は ABA 処理により長日条件下でも塊茎形成が誘起されると報告した。ま

た ABA 処理による形成塊茎数の増加¹⁾ および ABA 含量と塊茎形成率との正の相関⁵⁶⁾ も知られている。これらの結果を考慮して HAMMES と NEL³⁸⁾ および KRAUSS と MARSCHNER⁵⁹⁾ はジベレリンの減少と ABA の増加が相まって塊茎形成を誘起すると主張した。しかしながら一方 PALMER と SMITH⁹⁰⁾ および CLAVER¹⁹⁾ は培養茎断片への ABA 添加は塊茎形成を阻害することを報告している。また栽培実験においても ABA 処理は塊茎形成を誘起せず¹¹³⁾、葉のジベレリン含量の増加をもたらした⁹⁹⁾。

上記のように塊茎形成に及ぼすサイトカイニンおよび ABA の直接的作用に関しては統一した見解は得られていない。しかし塊茎形成に伴うこれらの物質の含量の大きな変動は^{56,88,104,126,127)}、これらの物質が明らかに塊茎形成において何らかの重要な役割を演じていることを示唆している。

GRACIA-TORRES と GOMEZ-CAMPO³⁴⁾ は、エチレン発生剤の CEPA 処理による塊茎形成率の向上を認めた。また BIRAN⁸⁾ はダリヤの塊根形成に先立ち、一時的に多量のエチレン発生を認め、地下貯蔵器官の形成におけるエチレンの役割を示唆している。しかしその後 PALMER と BARKER⁹²⁾、MINGO-CASTEL^{71,73)} および DIMALLA と VAN STADEN²³⁾ によりエチレンのこのような効果は否定され、エチレンは塊茎形成および澱粉の蓄積を逆に阻害することが明らかにされた。また MINGO-CASTEL⁷³⁾ および ARTECA⁵⁾ は土壌中の高濃度 CO₂ が塊茎形成に促進的に働くことを認めたが、CO₂ が直接的な塊茎形成要因であるとは考えられない。

バレイショ塊茎形成の短日要求性は窒素の施肥量によって左右され、高窒素条件は短日要求性の増加をもたらすと言われている^{57,58)}。この窒素栄養の影響は体内 ABA^{56,59)} およびサイトカイニン^{55,103)} 含量の変動を介して働くものと考えられる。

第3章 実験材料および方法

1. 植物育成法

バレイショ (*Solanum tuberosum* L. ssp. *tuberosum* 品種「男しゃくいも」) を圃場あるいは人工気象器で育成し実験材料とした。圃場における栽培は常法によりおこない、人工気象器による育成は下記の方法によった。

バレイショ塊茎を 4°C 暗所で約 2 カ月間貯蔵し、内生休眠終了後の塊茎を室温明所に移し、3 週間置いて萌芽させた。これより均一な萌芽 (長さ約 1 cm) を有するも

のを選び、1組織片当り1芽を含むようにコルクボーラーで直径2cm高さ3cmの円柱状組織片を採取した。これを0.1%次亜塩素酸ナトリウム溶液で10分間表面殺菌後水洗し、明所温室で3日間放置し周皮を形成させた。再度表面殺菌後、HOAGLAND培養液⁴⁷⁾を含むパーミキュライト(プラスチックポット、長さ60×幅17×深さ15cm)に10個当て移植し、パーミキュライトで5cmの深さに被覆した。これを人工気象器に入れ長日条件(16時間日長、10,000 lux)26°Cで1カ月間育成した。次いで対照区(長日高夜温)の他に短日条件(12時間日長)および低夜温条件(昼温26°C、夜温15°C)を設定し、引き続き3~4週間育成した。

2. 茎断片培養法

1) 黄化徒長茎育成法

内生休眠終了後、塊茎を0.1%次亜塩素酸ナトリウム溶液で10分間表面殺菌し十分に水洗した。これを25°C暗所に1~3週間静置し萌芽させた。これより1芽を有する円柱状組織片(直径2cm、高さ3cm)を採取し、この組織片を前述の方法で表面殺菌した。水洗後、生長点附近の壊死防止のため²⁴⁾、数滴の0.1M硝酸カルシウム溶液を添加した。これを25°C暗所温室に3日間静置し周皮を形成させた後、再度表面殺菌した。この組織片をHOAGLAND培養液を添加したパーミキュライトに移植し、25°C暗所で3週間育成し、長さ約30cmの黄化徒長茎を得た。この徒長茎の基部第2節より第7節までの部分を用いて、1節をもつ茎断片を調製した。これを1%次亜塩素酸ナトリウム溶液で1時間表面殺菌し、滅菌水で洗浄後両端部を切除し、中央部の1節をもつ茎断片(長さ約1cm)を器官培養の材料とした。

2) 茎断片培養法

茎断片培養の培地としては通常改良White培地を基本培地として用いた。改良White培地の無機塩類組成はOKAZAWAら⁸⁷⁾の処方準じた。また培地1ℓ中に添加した有機物は蔗糖、20g;カサミノ酸、1g;イノシトール、100mg;ビタミンB₁、5mg;ビタミンB₆、2mg;パントテン酸カルシウム、5mgおよびニコチン酸1mgであり、これに6gの寒天を加えて固化させて用いた。

前述の方法で得られた茎断片を3個当て10mlないし20mlの培地を含む100ml容フラスコ中に移植し、25°C暗所で3週間培養した。各区5本のフラスコ(茎断片15片)を用いた。

培養終了後、(肥大または塊茎化した側芽数)/(全側芽数)を算出し、これを塊茎形成率とした。

3. 組織切片作成法

組織観察には試料をFAA液(ホルマリン:酢酸:EtOH:水2:1:10:7v/v)で固定し、常法により厚さ10μmのパラフィン切片を調製した。切片はサフランin+ファストグリーンの二重染色法⁴⁹⁾により染色後、光学顕微鏡で観察した。

4. 生長物質の抽出および分画

試料に充分量のEtOHを加えて摩砕し、最終EtOH濃度を70%に調整した。これを4°Cで一晩放置後、EtOH抽出液を濾別し、この抽出液を用いて下記の方法によりそれぞれの生長物質を抽出し、更に分画を行なった。

1) オーキシン

EtOH抽出液を減圧濃縮しEtOHを除去後1N HClでpH 2.5とした。これを等量の酢酸エチルで3回振盪抽出し、酢酸エチル分画を半量の0.5Mリン酸緩衝液(pH 8.0)で3回抽出した。緩衝液分画を濃塩酸によりpH 2.5に調整し、酢酸エチルで3回振盪抽出した。これに少量の無水硫酸ナトリウムを加え水分を除去し、濃縮乾固した。これをイソプロパノール:アンモニア:水(10:1:1v/v)を溶媒とするペーパークロマトグラフィーにより分画した。

2) アブシジン酸(ABA)様物質

ABA様物質の抽出と分画は前記オーキシンに準じた。

3) ジベレリン(GA)様物質

GA様物質の抽出と分画はオーキシンに準じ、リン酸緩衝液は1M(pH 6.3)を用いた。

4) サイトカイニン

EtOH抽出液を1N HClでpH 2.5とし、Dowex 50 W×4(50-100メッシュ、H⁺型、試料100g生重当り50ml容)の陽イオン交換樹脂カラムに通した。このカラムを70% EtOHと水で順次洗浄し、非吸着物を除去した後、吸着物は500mlの3N NH₄OHで溶出した。溶出液は減圧濃縮し(40°C以下)アンモニアを除き、pH 8.0とした。これを等量のn-ButOHで3回振盪抽出し、ButOH可溶性分画と水溶性分画に分けた。ButOH可溶性分画は濃縮乾固し、ペーパークロマトグラフィーあるいはSephadexカラムクロマトグラフィーにより分画した。一方水溶性分画は減圧濃縮し高粘性溶液を得た。これを少量の水で再溶後4倍量のEtOHを加え-20°Cで一晩静置し、不溶性沈殿を遠心除去した。この上清を濃縮乾固し、残渣を直接あるいは加水分解酵素処理後クロマトグラフィーに供した。

Sephadex LH-20カラムクロマトグラフィーはARM-STRONGら⁴⁾の方法に準じた。サイトカイニン分画は

3 ml 35% EtOH に再溶し 35% EtOH を溶媒としてカラム (2.6×40 cm) に 40 ml/時の流速で通した。カラムからの流出液は 10 ml ずつ分取し、濃縮乾固後サイトカイニンのバイオアッセイに供した。

ペーパークロマトグラムは展開後充分に乾燥し、Rf 値に応じて 10 等分しバイオアッセイに供した。

5) サイトカイニンの酵素処理法

高等植物の水溶性サイトカイニンとしてはゼアチンリポチド^{14,69)}、リボシルゼアチングルコシド^{94,128)}などが知られている。バレイショ塊茎の水溶性サイトカイニンの種類を知るため、水溶性分画をアルカリ性ホスファターゼ (Boehringer Mannheim grade I) または β -グルコシダーゼ (同) で処理した。アルカリ性ホスファターゼ処理は 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.8, 1 mM 酢酸マグネシウム, 1 mM 塩化亜鉛) を用いて 37°C で 6 時間おこなった。また β -グルコシダーゼ処理は 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) を用いた。酵素処理後、溶液を pH 8.0 とし等量の n-ButOH で 3 回振盪抽出した。この ButOH 分画は濃縮乾固後、クロマトグラフィーに供した。

5. 生長物質の活性測定法

1) オーキシン

オーキシン活性の測定はエンバク子葉鞘伸長法を用いた。果皮を除いたエンバク種子 (*Avena sativa* L. 品種ビクトリー 1号) を水飽和パーミキュライトに播種した。これを 25°C で赤色光照明下に 24 時間置いた後、パーミキュライトで被覆し 25°C 暗所に 2 日間置いて子葉鞘を伸長させた。この子葉鞘を採取し頂端部 1 mm を切除した後、25°C 暗所湿室中で 2 時間放置した。この頂部 2 mm をさらに切除し、長さ 5 mm の切片を得た。この切片を 2 本通したガラス毛细管を 5 本当て 1 ml の検液を含む小型シャーレ (直径 2.5 cm) 上に浮遊させた。25°C 暗所で 24 時間放置した後、子葉鞘切片の長さを測定した。

検液としては 2% 蔗糖を含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH 5.0) に、Rf 値に応じて 10 等分したペーパークロマトグラム、あるいは既知の濃度の IAA を添加したものを供した。試料中のオーキシン含量は IAA 標準曲線を用いて IAA 当量で算出した。

2) ABA 様物質

ABA 様物質の活性測定はオーキシンに準じ、エンバク子葉鞘伸長法を用いた。使用した検液には 10^{-7} M の IAA を添加し、生長阻害度により ABA 活性を測定した。試料中の ABA 様物質の含量は ABA 標準曲線を用いて ABA 当量で表示した。

3) GA 様物質

GA 様物質の活性測定はエンバク胚乳法⁵³⁾を用いた。果皮を除いたエンバク種子を短軸方向に半切し、胚を含まない部分を 0.4% 次亜塩素酸ナトリウム溶液で 5 分間表面殺菌し、滅菌水で充分に洗浄した。これを 2 ml の検液を含む 30 ml 容フラスコに 4 片当て移植し、25°C 暗所で 2 日間静置した。この検液を濾別し不溶性物質を除去し、濾液中の還元糖量を NELSON-SOMOGYI 法⁷⁸⁾により測定した。

検液としては 50 mM リン酸緩衝液 (pH 6.8) に Rf 値に応じて 10 等分したペーパークロマトグラムまたは既知の濃度の GA₃ を加え、3 分間加圧滅菌したものを供した。

試料中の GA 様物質含量は GA₃ 標準曲線を用いて GA₃ 当量で算出した。

4) サイトカイニン

サイトカイニンの定量法としてはその作用特性を利用したバイオアッセイ法と紫外部吸光特性による物理的定量法が広く用いられている。後者は純化した試料を高速液体クロマトグラフィーにより分画し、吸光度 (254 nm) から定量するものである。この方法は簡便迅速であるが、不純物の混在により結果の斉一性を欠くことがある。また本法はリポチドやグルコシド等のサイトカイニン誘導体の定量には適さない。これに対し、バイオアッセイ法は長時間を要するが試料の高度な純化を必要とせず、また誘導体の検出も容易である。したがって本研究ではバイオアッセイ法を用いた。

まずサイトカイニンによる細胞分裂促進効果を利用したダイズカルス法⁶⁸⁾とクロロフィル分解抑制効果を用いたエンバク葉片法¹¹⁸⁾の二方法について検出能力の比較をおこなった。供試した合成サイトカイニンはカイネチン (KIN) とそのリポシド (KINR)、およびベンチルアデニン (BA) とそのリポシド (BAR) で、また天然サイトカイニンは Z, ZR, IPA および IPAR である。Z および ZR は cis-trans 混合品を用いた。

(1) **ダイズカルス法** MILLER⁶⁸⁾の方法に準じ、無菌発芽したダイズ [*Glycine max* (L.) Merrill 品種 Acme] の子葉切片をカルス誘導培地 (IAA 3 mg/l, BA 0.3 mg/l) に移植し、26°C 蛍光灯連続照明下で 3 週間培養しカルスを誘導した。このカルスを同様な方法で 3 代以上継代培養した後、バイオアッセイ実験に供した。IAA 3 mg/l を含む Miller 培地に濃度範囲 10^{-10} ~ 10^{-5} M のサイトカイニンを添加し、この培地 20 ml を含む 100 ml 容フラスコ中にカルス片を 3 片ずつ移植し (約 8 mg 生

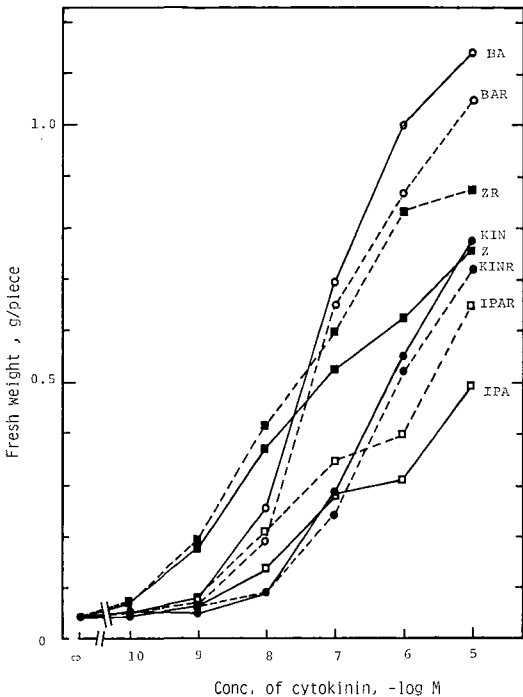


Fig. 1. Effects of various cytokinins on soybean callus growth. BA, benzyl adenine; BAR, benzyl adenine riboside; KIN, kinetin; KINR, kinetin riboside; IPA, isopentenyl adenine; IPAR, isopentenyl adenosine.

重/カルス片) 4 週間培養した。培養終了後カルス塊を濾紙上に移し、過剰の水分を除き、生重量を測定した。

各種サイトカイニンに対するダイズカルスの生長濃度曲線を Fig. 1 に示した。各サイトカイニンはいずれも遊離型とリポソド型の間にも効果の差異はなく、類似した濃度曲線が得られた。Z および ZR は低濃度域で顕著なカルス生長促進作用を示し、 10^{-10} ~ 10^{-5} M の濃度域でほぼ濃度の対数に比例した作用を示した。BA および BAR は高濃度域での促進作用が顕著であった。IPA および IPAR の作用は最も弱かった。

(2) エンバク葉片のクロロフィル保存法

果皮を除いたエンバク種子 (*Avena sativa* L. 品種ビクトリー1号) を加湿パーミキュライトに播種し、蛍光灯連続照明下 (約 3,000 lux) 25°C で 1 週間発芽させた。この第 1 葉を採取し、先端から 5 cm の個所で切り、上部の葉片をバイオアッセイに供した。

濾紙を入れた 9 cm シャーレに 4 ml の蒸留水を加え、スライドグラスを置いた。この上に葉片 10 枚を並置し、

葉片の中央に $10\ \mu\text{l}$ の検液を添加した。このシャーレを 25°C 暗所に 72 時間静置した後、葉片のクロロフィルを沸騰 80% EtOH で 2 回抽出し、冷却後さらに 80% EtOH を加えて 25 ml に定容し 665 nm の吸光度を測定した。検液としては 10 倍に希釈した McIlvain のクエン酸-リン酸緩衝液 (pH 4.7, 2% tween-80) にサイトカイニンを添加して用いた。

各種サイトカイニンのクロロフィル保存効果を Fig. 2 に示した。合成サイトカイニンのクロロフィル保存効果はいずれも高く、 10^{-8} M 以上で検出可能であった。しかし天然サイトカイニンの効果は著しく低いものであり、本法は天然サイトカイニンの検定法としては適さないことが判明した。

以上の結果から、ダイズカルス法が優れていることが判明し、以後本研究においてはダイズカルス法を用いることとした。またサイトカイニンの種類によりダイズカルスの濃度曲線に大差があることが明らかとなった。この結果は、試料中のサイトカイニン含量を標準曲線に基づいて算出する場合、基準とするサイトカイニンにより値に大差をきたすことを示している。高等植物の主要サ

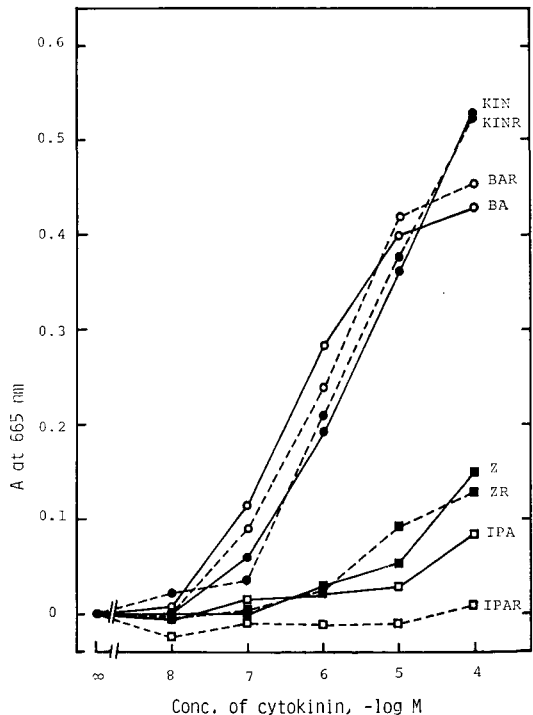


Fig. 2. Effects of various cytokinins on chlorophyll retention of *Avena* leaves. Abbreviations are the same as in Fig. 1.

イトカイニン Z および ZR であることから、本研究においては Z を基準サイトカイニンとし、その標準曲線を用いて Z 当量でサイトカイニン含量を算出、表示した。

なおバイオアッセイに供したダイズカルスは3週間の継代培養により約30代培養を続けたが、この間カルスの生長量は常に添加したサイトカイニン濃度の対数に比例した値を示し、サイトカイニンの定量に適したものであった。

第4章 塊茎形成と環境要因

1. 個体の生育と塊茎形成

パレイショは日長、温度等の環境要因の変動を感受して塊茎形成をきたす。この塊茎形成の環境依存性は品種により異なることも知られている^{28,110}。

本研究に当り、塊茎形成に及ぼす環境要因の影響について検討をおこなった。

1) 実験方法

人工気象器を用いてパレイショを育成し、1週間毎に10個体を採取し、草丈を測定すると共に地下部の塊茎形成状況を観察した。塊茎形成率は(塊茎を形成した個体数)/(全個体数)により表示した。匍枝の肥大による先端フック組織(hook)の消失をもって塊茎形成とした。

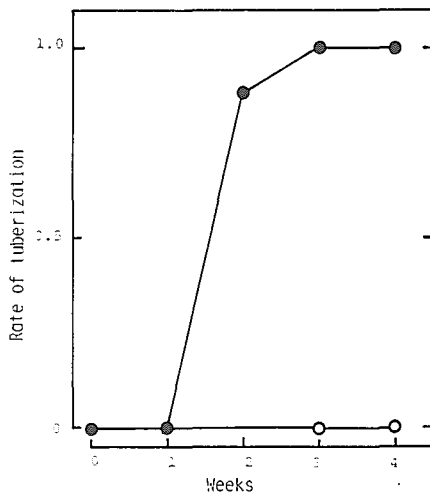


Fig. 3. Time course changes in the rate of tuberization in potato plants under tuber-inducing (12 h photoperiod, 26°C day and 15°C night temperatures, ●) and non-inducing (16 h photoperiod, 26°C constant temperature, ○) conditions. Potato plants which had been grown under the tuber-non-inducing condition for 4 weeks were transferred to each condition.

2) 実験結果

親いもとして短期貯蔵塊茎(貯蔵期間7カ月以下)を用いた場合、長日高夜温条件では育成期間を通じて、全く塊茎形成は認められなかった(Fig. 3)。他方短日低夜温下では処理後1週目に匍枝が肥大を始め、その後急速に塊茎化が進行し、3週間目には全個体に塊茎が形成された。両条件の4週間目の生育状況をFig. 4に示す。草丈は1週目までは両区共ほぼ等しく増加したが、それ以後は差異を生じ短日低夜温区では地下部の塊茎形成に伴い草丈の伸長は停止した(Fig. 5)。

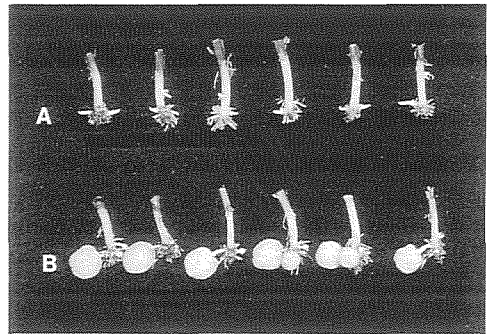


Fig. 4. Appearances of basal parts of potato plants grown under the tuber-non-inducing condition (A) and inducing condition (B) for 4 weeks.

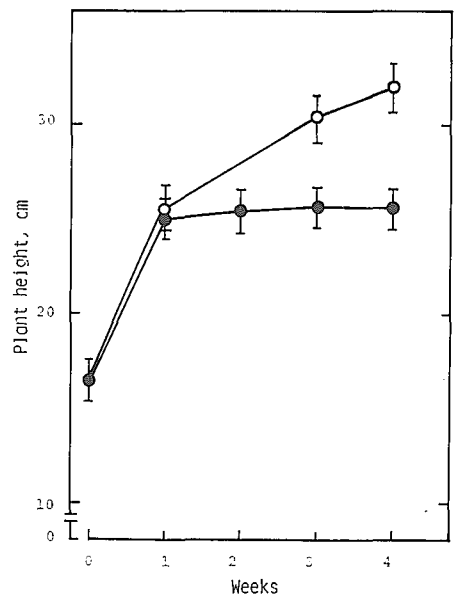


Fig. 5. Changes in plant height under the tuber-inducing (●) and non-inducing (○) conditions. (\pm SD, $n=10$)

Table 1. Effects of photoperiods and temperatures on potato tuberization. Potato plants (cv. Irish Cobbler, early maturing type) which had been grown under long days (16h) and high temperatures (26°C) for 4 weeks were transferred to each condition. After 4 weeks the rate of tuberization was measured

Photo-period (h)	Day temperature (°C)	Night temperature (°C)	Rate of tuberization
16	26	26	0
16	26	15	0.75
12	26	26	1.0
12	26	15	1.0

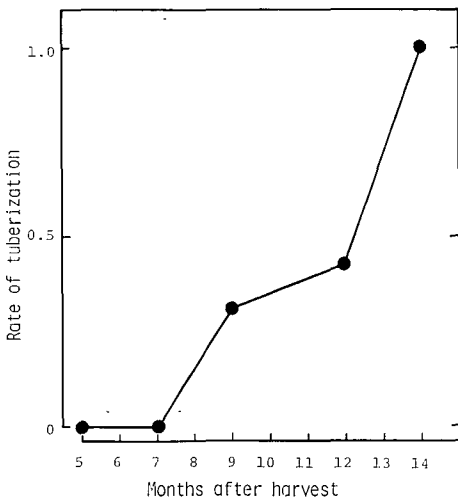


Fig. 6. Effect of physiological age of mother tubers on tuberization under the non-inducing condition.

塊茎形成に及ぼす日長と夜温の影響についてみると (Table 1), 長日条件では低夜温区で塊茎形成率は 0.75 を示したが, 塊茎は小型で個体当りの塊茎数も少なかった。これに対し短日条件では夜温の高低にかかわらず, 全個体に塊茎が形成された。

長日高夜温条件で植物体を育成し, 塊茎の貯蔵期間 (齢) の影響について検討した。貯蔵期間 7 カ月以上の塊茎を親いものとすると, 本条件下においても容易に塊茎化をきたし, その形成率は親いもの齢の進行に伴って増加を示した (Fig. 6)。さらに貯蔵期間 14 カ月の老化塊茎では全個体に塊茎が形成された。

3) 考 察

本研究に用いた「男しゃくいも」の塊茎形成も日長と夜温の影響が顕著であると判明した。すなわち短日条件では夜温の高低にかかわらず塊茎形成をきたすが, この塊茎の生重量は低夜温の方が大であった。したがって塊茎の形成と生育には短日低夜温が好適であると認められた。これに対し長日条件でも低夜温区では 0.75 の塊茎形成率がみられた事実を考慮すると, 男しゃくいもの塊茎形成は短日条件に優先的に依存し, 低夜温はそれに次ぐ要因であると解される。

親いもの齢が環境要因に優先する事実は, SAVIC¹⁰⁵⁾, MONTALDI と CLAVER⁷⁶⁾ および IRITANI⁴⁸⁾ も認めている。

2. 培養基断片の塊茎形成

パレイショの塊茎形成機構を究明するためのモデル実験系として, 茎断片を用いた器官培養法が広く用いられている。本法は比較的簡便で, 結果の再現性も高く反復も容易である。また無菌状態のため, 塊茎形成に及ぼす各種栄養要因の影響を知ることもできる。

本研究においてはこの手法を用い, 塊茎形成に及ぼす環境要因および栄養要因の影響について追求した。

1) 材料および方法

暗所で育成した黄化徒長茎の一節を含む茎断片を種々の物質を添加した改良 White 培地に移植した。培養は通常 25°C 暗所で 3 週間行ない, 培養終了後塊茎形成率を測定した。

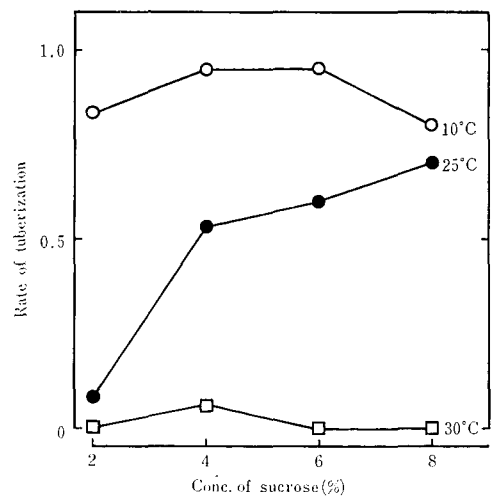


Fig. 7. Effect of culture temperature on *in vitro* tuberization at different sucrose concentrations.

2) 実験結果

(1) 培養温度の影響 塊茎形成に及ぼす培養温度の影響について種々の蔗糖濃度との組み合わせ条件下で検討した (Fig. 7)。蔗糖濃度の如何にかかわらず 10°C では塊茎形成が認められたが、30°C では塊茎形成は全くみられず節部からの側芽の発生阻害も顕著であった。これに反し、25°C では蔗糖濃度の増加に応じて塊茎形成率の増加が認められた。したがって以後の実験は全て培養温度を 25°C に設定した。

(2) 親いもの齢の影響 上記の結果は比較的若齢塊茎 (貯蔵期間 6 カ月以内) を親いものとして用いて得られたものであるが、次に塊茎形成に及ぼす親いもの齢の影響について検討した。貯蔵期間 8 カ月および 10 カ月の塊茎よりそれぞれ茎断片を採取し、種々の蔗糖濃度の培地で培養した。その結果、塊茎形成率は若齢塊茎のもの (Fig. 7) 図に比しいずれも増加を示した (Fig. 8)。特に貯蔵 10 カ月の老化塊茎から得た節の培養では蔗糖濃度に対する塊茎形成の依存性はほぼ失なわれていた。したがって親いもの齢の進行はそれに由来する茎断片の塊茎形成能の増加をもたらすと考えられる。

この点をさらに明確にするために、2% 蔗糖添加培養により塊茎形成に及ぼす親いもの齢の影響について検討した。その結果、親いもの齢の進行は茎断片の塊茎形成率の増加をきたし、貯蔵 14 カ月の老化塊茎より得た茎断片では高い塊茎形成率 (0.96) を示した (Fig. 9)。Fig. 10 の写真は若齢塊茎 (貯蔵 4 カ月) と老化塊茎 (同 14 カ

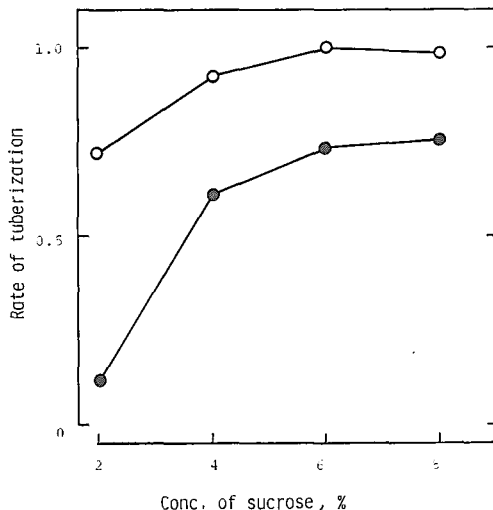


Fig. 8. Effect of sucrose concentrations on *in vitro* tuberization on the single-node segments derived from 8 month-old (●) and 10 month-old (○) tuber.

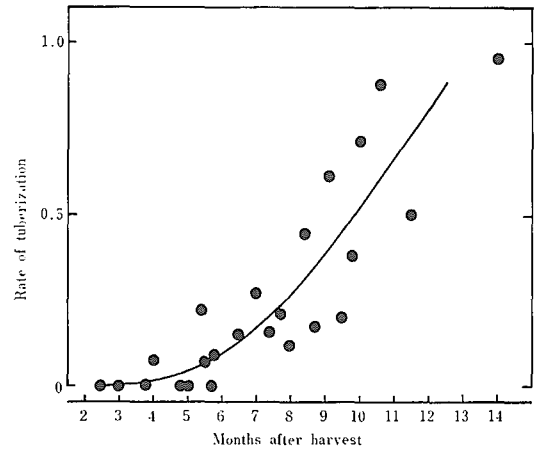


Fig. 9. Change in tuberizing ability of the single-node segments with aging of mother tubers used to obtain them. Sucrose concentration in the medium was 2%.

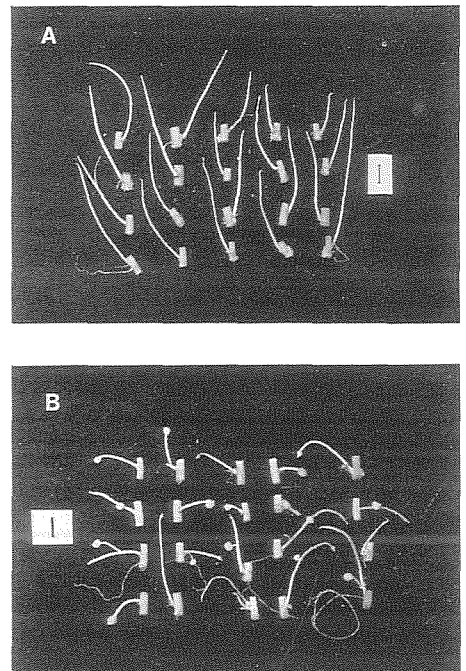


Fig. 10. Appearances of cultured single-node segments derived from young (A, stored for 4 months) and senile (B, stored for 14 months) tubers after culturing for 3 weeks. Sucrose concentration in the medium was 2%.

月)からそれぞれ得た茎断片の培養結果を示す。

(3) 窒素源の影響 塊茎形成に及ぼす窒素源の影響は9カ月間貯蔵した塊茎より得た茎断片を用い、2%蔗糖添加培養により検討した。この際基本培地にはカサミノ

酸を添加せず、3.2 mMの硝酸カリウムを窒素源とした。還元型窒素を含むカサミノ酸および塩化アンモニウムは共に同程度の塊茎形成阻害効果を示したが (Fig. 11), 酸化型窒素 (硝酸カルシウム) は塊茎形成に対しほとんど影響を示さなかった。

次に培地の C/N 比率の影響をみるために硝酸アンモニウムと蔗糖を組み合わせて検討した (Fig. 12)。硝酸アンモニウムは2%蔗糖添加区では塊茎形成を顕著に阻害したが、4%以上の蔗糖添加によりこの阻害効果は消去された。この結果を C/N 比率を横軸として図示したものが Fig. 13 であり、C/N 比率と塊茎形成との間には明白な因果関係は認められなかった。

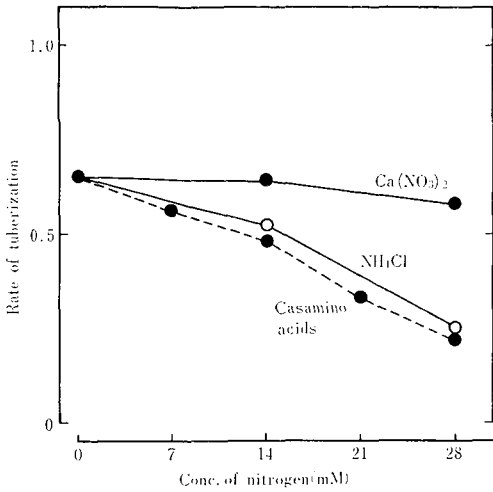


Fig. 11. Effects of various nitrogen sources on *in vitro* tuberization. The single-node segments derived from 9 month-old tubers were used as inoculum. Sucrose concentration in the medium was 2%. Casamino acids contain 10% nitrogen.

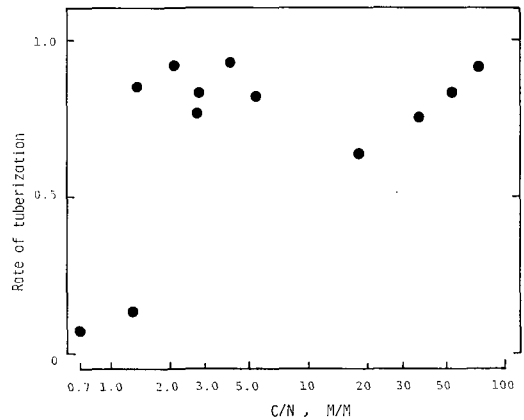


Fig. 13. Effect of C/N ratio on *in vitro* tuberization.

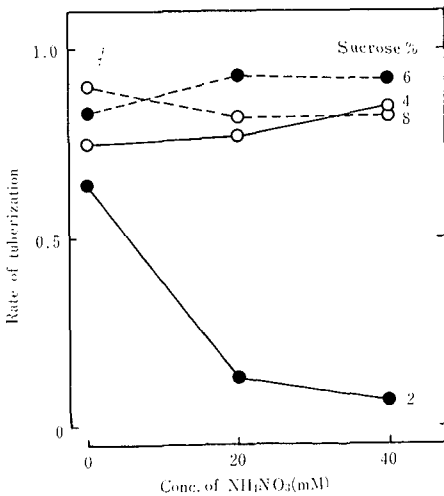


Fig. 12. Effect of ammonium nitrate on *in vitro* tuberization at different sucrose concentrations. The single-node segments derived from 9 month-old tubers were used.

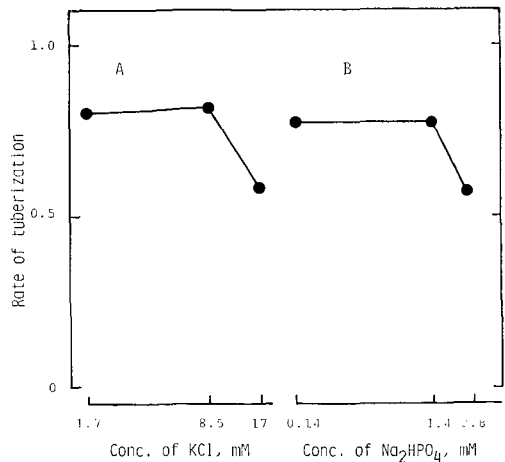


Fig. 14. Effects of potassium (A) and phosphate (B) on *in vitro* tuberization.

(4) カリウムおよびリン酸の影響 培地の塩化カリウム濃度を10倍にすると若干の塊茎形成阻害が認められた (Fig. 14)。またリン酸源としてのリン酸-ナトリウム濃度を20倍に増加した場合も僅少なから塊茎形成阻害が認められた。これらの物質が塊茎形成に及ぼす影響は軽微であった。

3) 考察

古く WERNER¹²⁹⁾ は短日条件、低温条件あるいは窒素の寡肥による C/N 比率の上昇が塊茎形成を誘起する事実を明らかにし、高 C/N 比率が塊茎形成の決定要因であると主張した。しかしその後これを否定する研究も少なくない^{66,110)}。

本実験により培養茎断片における塊茎形成は低温および高濃度蔗糖により促進されることが明らかとなった。この高濃度蔗糖による塊茎形成促進は OKAZAWA⁸²⁾ および GREGORY³⁶⁾ も認めている。これらの結果は炭素源の増加は塊茎形成にとって重要な一要因であることを示している。

一方窒素源による塊茎形成阻害効果は供給される窒素の形態により大差があり、硝酸態窒素は塊茎形成にほとんど影響を及ぼさなかった。また還元態窒素による塊茎形成阻害は低炭素源の下でのみ認められ、高炭素源との組み合わせではその阻害作用はみられなかった (Fig. 12)。したがって C/N 比率は塊茎形成の決定要因ではない。

炭素源や窒素源等の栄養要因は直接的に塊茎形成に影響を及ぼすものではなく、GREGORY³⁶⁾ や CHAPMAN¹⁷⁾ の指摘のように何らかの生長物質の変動を介して働いていると考えられる。

第5章 塊茎形成と内生生長物質

バレイショの匍枝は主茎の地下節部より発生し、その先端にはフック (釣状組織) を有している。塊茎は匍枝次頂部の肥大生長によって形成されるが、初期の肥大は髓部細胞の放射方向への肥大に依存している^{10,22)}。やがて旺盛な細胞分裂により肥大部の膨大が顕著となる。これに伴ってフック組織は肥大部分に取り込まれ、休眠芽に変わり塊茎形成を完了する。

塊茎形成と内生生長物質との関連性を知るため塊茎形成に伴う内生生長物質の変動を検討した報告は多数ある^{10,56,88,96,104,112)}。しかしこれらの研究は全て塊茎形成過程を概括的に大別し、内生生長物質の変動を追求したものである。したがって解剖学的に塊茎形成過程を細分し、これに対応した内生生長物質の継時的変動に関して

は検討していない。

本章では塊茎形成初期過程における解剖学的検討をおこない、あわせて内生生長物質の変動との関連性について追求し、各生長物質の塊茎形成における役割の解明を試みた。

1. 材料および方法

バレイショ塊茎を1981年5月10日に圃場に播種し、常法により栽培した。6月初旬に匍枝が発生し、約2週間後にはその次頂部の肥大が開始した。生長中の匍枝と塊茎を6月8日、15日および21日の3回にわたり採取し、その生育段階に応じて次の4群に分類した (Fig. 15)。A、伸長中の匍枝先端部 (長さ約1 cm)；B、肥大開始直後の匍枝先端部 (肥大部の直径が基部直径の2倍以内のもの、長さ約1 cm)；C、十分に肥大した匍枝先端部 (肥大部の直径が基部直径の2倍以上に達し、フックが消失したもの、長さ約1 cm)；D、生育中の塊茎 (頂芽が完全に休眠芽となったもの、直径1~2 cm)。これらはそれぞれ EtOH を加えて摩砕し、生長物質の抽出に供した。

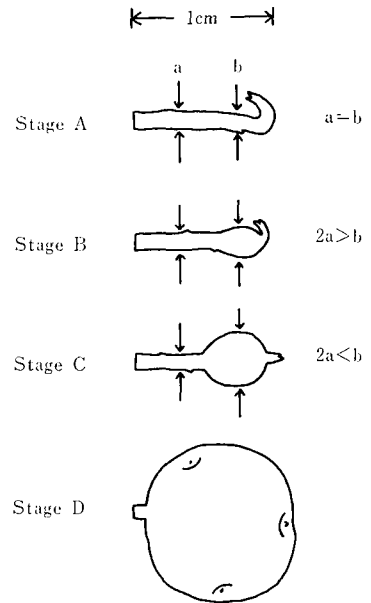


Fig. 15. Diagram showing classification of growing stages of stolons.

2. 実験結果

1) 生育中の匍枝の経時的組織変化

塊茎形成に伴う内生生長物質の変動と細胞組織の変化の関連性を追求するために、まず各生育段階の匍枝の正中断切片を調製し、光学顕微鏡で観察した。伸長中の匍

枝 (stage A) の細胞には全く放射方向への肥大生長は認められなかった (Fig. 16)。Stage B には匍枝次頂部にわずかな肥大が認められたがフックは明瞭に残存していた。しかし Stage C に至ると肥大生長が旺盛となり、フックは消滅していた。

この stage B および C の肥大生長が細胞肥大あるいは細胞分裂のいずれに起因するかについて調べるため

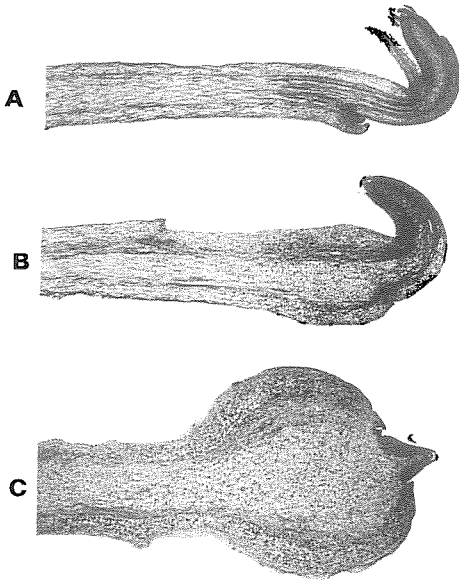


Fig. 16. Cytological comparison of median sections of stolon tips at stage A, B and C.

Table 2. Cytological comparison of stolons between its swelled and non-swelled part at stage B and C

Growing Stage*	Number of cells across diameter		
	Non-swelled part, a	Swelled part, b	Ratio b/a
B	52.0±4.3**	61.7±8.0	1.18
C	51.2±5.0	121.2±7.7	2.36

Growing Stage*	Width of stolon (mm)		
	Non-swelled part, a	Swelled part, b	Ratio b/a
B	1.02±0.07	1.60±0.13	1.57
C	1.21±0.03	3.58±0.38	2.95

* Growing stages are the same as in Fig. 15.

** Average of 5 replicates±SD.

に、肥大部および非肥大部の直径とその直径上の細胞数を計測した。その結果、Table 2 に示すように stage B の肥大部と非肥大部の直径比率は平均 1.57 を示したが、細胞数比率は 1.18 であった。したがってこの時期の匍枝の肥大生長は主に放射方向への細胞肥大に起因すると解される。これに対して stage C の直径比率は 2.96、細胞数比率は 2.36 で肥大生長は主として細胞分裂に由来することが判明した。

したがって stage B は主に細胞肥大による肥大生長期であり、stage C は細胞分裂による肥大生長期に相当することが明らかとなった。

2) 塊茎形成に伴う匍枝の内生長物質含量の変動

塊茎形成に伴う匍枝の内生長物質含量の変動を知るために、各 stage の匍枝の生長物質の含量を測定した。

(1) GA 様物質 まず GA 様物質の活性変動について検討した (Fig. 17)。伸長中 (stage A) の匍枝先端部は比較的高い GA 活性を示したが、その肥大生長に伴い顕著な減少をきたし、その後塊茎形成完了期 (stage D) まで低い値を保った。

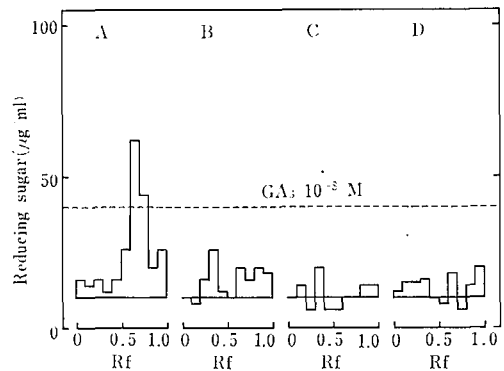


Fig. 17. Changes in the level of GA-like substance during the course of potato tuberization. Each extract equivalent to 10 g fresh weight was chromatographed on paper and assayed by *Avena* endosperm test. Broken line represents the amount of reducing sugar liberated from the endosperm by 10^{-8} M GA_3 .

(2) オーキシシン 塊茎形成初期における匍枝内のオーキシシン活性の変動は僅少であったが、肥大生長初期 (stage B) において最大となり、以後塊茎形成完了期までわずかながら減少を続けた (Fig. 18)。

(3) サイトカイニン ButOH 可溶性サイトカイニンの変動についてみると、伸長中 (stage A) の匍枝先端

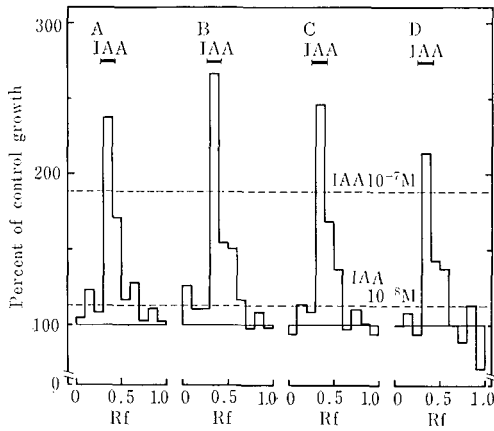


Fig. 18. Changes in the level of auxin during the course potato tuberization. Each extract equivalent to 10g fresh weight was chromatographed on paper and assayed by *Avena* coleoptile straight growth test. Broken lines represent the percent of control growth by 10^{-8} and 10^{-7} M IAA. Markes in the upper part of the figure indicate the position of authentic IAA.

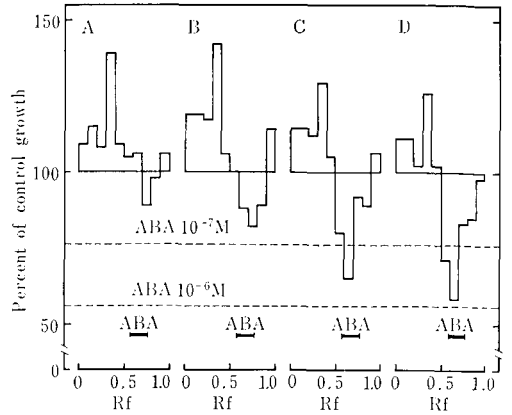


Fig. 20. Changes in the level of ABA-like substance during the course of potato tuberization. The activities were measured by inhibition of *Avena* coleoptile straight growth induced by 10^{-7} M IAA. Broken lines represent the percent of control growth obtained by 10^{-7} and 10^{-6} M ABA. Markers indicate the position of ABA.

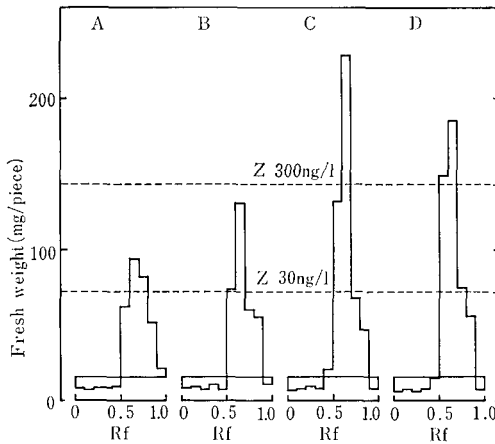


Fig. 19. Changes in the level of butanol-soluble cytokinin during the course of potato tuberization. Each extract equivalent to 10g fresh weight was chromatographed on paper and assayed using soybean callus. Broken lines represent the callus yield with 30 and 300 ng/l zeatin.

部では低い活性を示したが、その肥大に伴い急増し細胞分裂の旺盛な stage C に至り最大値を示した。しかし塊茎形成の完了により若干の減退をみた (Fig. 19)。

Table 3. Changes in the levels of plant hormones during the course of potato tuberization

Growing stage*	Level of plant hormone, $\mu\text{g/kg}$ fresh weight			
	GA-like substance GA ₃ equivalent	Auxin IAA equivalent	Cytokinin Zeatin equivalent	ABA-like substance ABA equivalent
A	2.2	5.9	0.16	0.7
B	—**	8.6	0.25	2.1
C	—	6.5	1.10	10.9
D	—	3.7	0.85	25.5

* Growing stages are referred to Fig. 15.

** Below limit of calculation.

(4) **ABA 様物質** Stage A の匍枝の ABA 活性は僅少であったが、その肥大に伴い増加を開始し塊茎形成完了期まで顕著な増加傾向を維持した (Fig. 20)。

匍枝の各生育段階における内生生長物質の含量を Table 3 に対比表示した。生育中の匍枝の各内生生長物質は、GA 様物質が匍枝伸長期 (stage A)、オーキシンは細胞肥大に起因する匍枝肥大期 (stage B)、サイトカイニンは細胞分裂による匍枝肥大期 (stage C) でそれぞ

れ最大値を示した。また ABA 様物質は stage D に至り最大値を示したが、この時期は休眠芽の形成期に相当した。

3. 考 察

パレイシヨ塊茎形成期にみられる内生生長物質の変動は細胞学的変化と明瞭な相互関係を示した。OKAZAWA⁸⁶⁾は GA 処理は匍枝の伸長を促長し塊茎形成を阻害することを認め、GA の減少は塊茎形成の前提条件であるとした。本実験においても匍枝の肥大生長開始に伴い GA 様物質の急減が認められ、その後塊茎形成完了期まで低値を維持することを確認した (Fig. 17)。

匍枝のオーキシン活性の変動は塊茎形成期間を通じて比較的僅少であったが (Fig. 18)、細胞の肥大生長の盛んな stage B では最大値を示した。オーキシンは主に細胞壁の軟化を促進し、その結果細胞伸長をもたらすと言われる⁶⁴⁾。このオーキシン作用が匍枝細胞の肥大に補助的な貢献をなしているものと解される。その後の stage C における細胞分裂誘起にあたっては、オーキシンはサイトカイニンと協同して有効に働いていると思われる⁶⁵⁾。

パレイシヨ塊茎形成期において ABA 様物質の含量は顕著な増加を続けた (Fig. 20)。この増加した ABA 様物質は stage A から B への転換期における匍枝の伸長停止に関与しているものと考えられる。さらに塊茎形成完了期 (stage D) における高濃度のこの物質の存在は、休眠芽の形成と密接な関連性を有するものと推察される。また ABA はサイトカイニンの細胞分裂促進に対し高揚効果があることも知られており⁹⁾、細胞分裂を伴う活発な肥大生長にも補助的に貢献しているものと思われる。

一方、塊茎形成に伴う ButOH 可溶性サイトカイニンの変動についてみると、この物質は匍枝の肥大開始と共にわずかな増加を示し (stage B)、細胞分裂の活発化に伴い著しい増加をみせた (Fig. 19)。このサイトカイニンは細胞分裂促進作用を介して、匍枝あるいは塊茎の肥大に多大に貢献するものと解される。

パレイシヨの塊茎形成期において匍枝内の内生生長物質含量はそれぞれ特徴的な変動を示した。しかしこれらの結果から塊茎形成の引き金となる直接要因を特定することは困難である。サイトカイニン含量の一時的な急増はこの物質がその要因である可能性を示唆している。しかしサイトカイニンは単に塊茎肥大を促進する因子であり、塊茎誘導因子ではないことも考えられる。

第 6 章 塊茎形成における生長物質の役割

前章においてはパレイシヨ塊茎形成過程における内生生長物質の変動を調べることに、各生長物質の役割について考究した。

本章では茎断片培養法を用いて各生長物質の塊茎形成に及ぼす影響について検討し、またあわせて茎断片の生長物質含量についても調べた。これらの結果と前章の結果を総合して、塊茎形成における生長物質の役割について論じた。

1. 材料および方法

収穫後 4°C に 2 カ月以上貯蔵した塊茎より黄化徒長茎を採取し、1 節を含む茎断片を調製した。通常は貯蔵期間 6 カ月以内の比較的若齢の塊茎を用いた。

茎断片は表面殺菌後、改良 White 培地上に移植し 3 週間培養し、塊茎形成率を測定した。

2. 実験結果

1) ゼアチンリボシド (ZR)

パレイシヨ塊茎内の内生サイトカイニンの主体は ZR であることが知られている^{51,67,122)}。したがって本実験ではサイトカイニンとして ZR を用い、その塊茎形成に及ぼす効果について検討した。2% 蔗糖との組み合わせ添加の場合、ZR は全く塊茎形成促進効果を示さず単に側芽の分枝のみを誘起した (Fig. 21)。

しかし蔗糖濃度を 4% 以上に増すと ZR の塊茎形成促進効果が認められた (Fig. 22)。この効果は蔗糖の効果と相加的に高めるものであった。4% 蔗糖の下で塊茎形成率の経時変化に及ぼす ZR の影響を検討した結果、

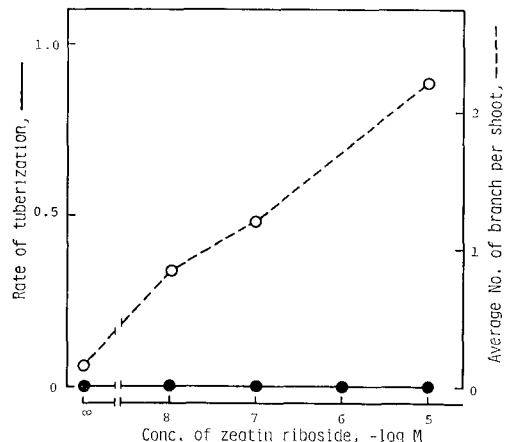


Fig. 21. Effect of ZR on *in vitro* tuberization and branching. Sucrose concentration in the medium was 2%.

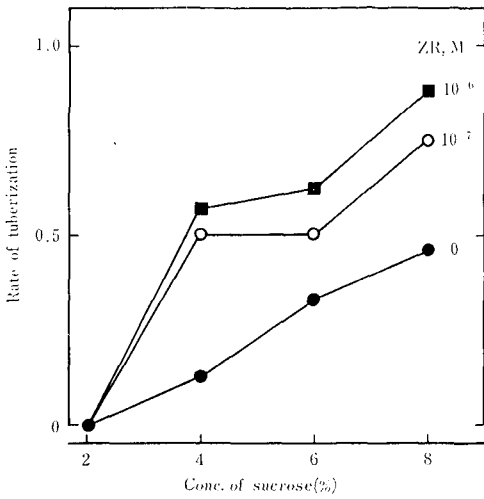


Fig. 22. Effect of ZR on *in vitro* tuberization at different sucrose concentrations.

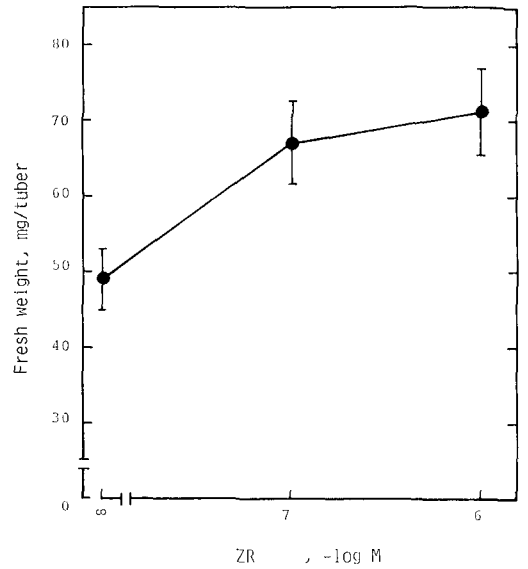


Fig. 24. Effect of ZR on growth of tubers. Sucrose concentration in the medium was 4%. \pm SD, n=10.

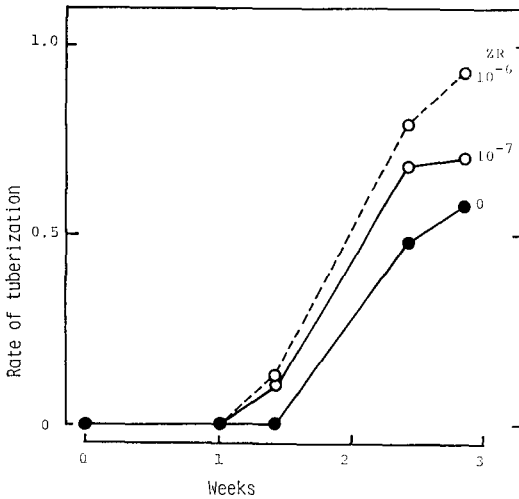


Fig. 23. Time course changes in the rate of tuberization at different ZR concentrations. Sucrose concentration in the medium was 4%.

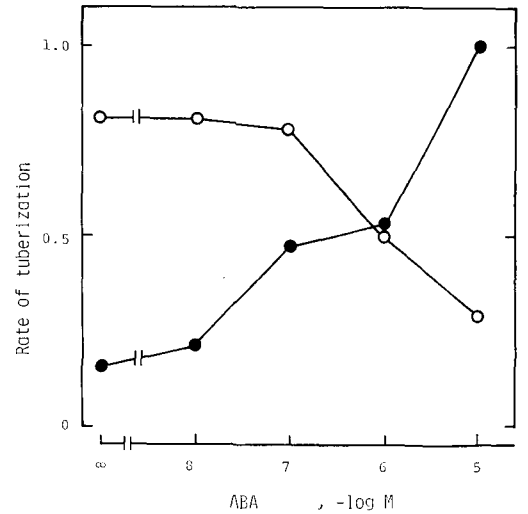


Fig. 25. Effect of ABA on *in vitro* tuberization at different sucrose concentrations (●, 2%; ○, 8%).

ZRは塊茎形成の開始時を若干早めることが判明した (Fig. 23)。またこの際に形成された塊茎の生重量は ZR の添加により増加を示した (Fig. 24)。

2) アブシジン酸 (ABA)

2% および 8% 蔗糖の共存下で塊茎形成に及ぼす ABA の影響について検討した (Fig. 25)。2% 蔗糖区では ABA は塊茎形成促進効果を示した。しかしここで見られた塊茎は側芽の先端部が若干肥大したものがほとん

どで、完全な塊茎化 (頂芽の休眠芽形成) は認められなかった。またこの塊茎形成促進作用は再現性に乏しく後述の如く (Fig. 67) 10⁻⁵ M 添加区の塊茎形成率が零を示す場合もあった。

8% 蔗糖添加区において、ABA は塊茎形成率の低下をきたした。

3) ジベレリン酸 (GA₃)

GA₃ は8% 蔗糖添加により誘起された塊茎形成を強く阻害した (Fig. 26)。

4) CEPA と ACC

エチレン発生剤 CEPA とエチレンの前駆物質 ACC²⁾ を用い塊茎形成に及ぼすこれらの影響について検討した。これらの物質はフィルター除菌後培地に添加し培養したが、いずれも塊茎形成促進効果は全く示さなかった (Fig. 27)。しかし側芽の伸長方向を変え横地性を誘起した。

5) 茎断片の生長物質含量の比較

先に示したように (第4章2節) 茎断片培養における

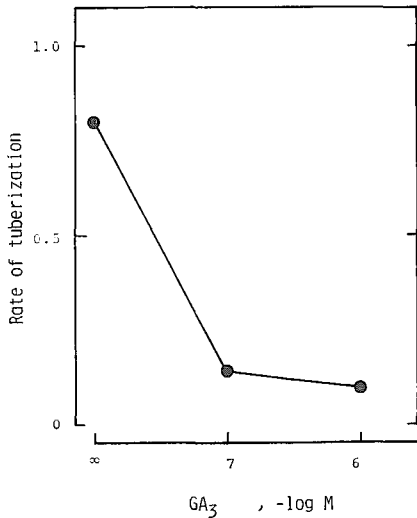


Fig. 26. Effect of GA₃ on *in vitro* tuberization. Sucrose concentration in the medium was 8%.

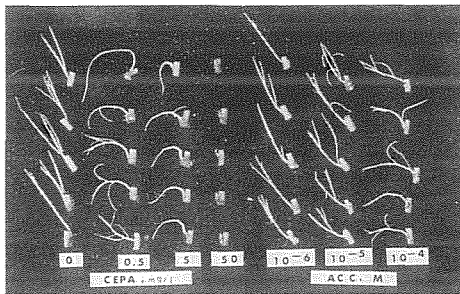


Fig. 27. Effect of ethylene on *in vitro* tuberization. CEPA which is an effective ethylene releasing reagent or ACC which is the direct precursor of ethylene was incorporated into medium.

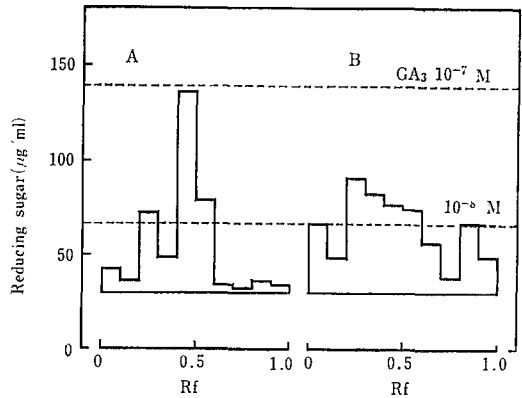


Fig. 28. Comparison of the levels of GA-like substance in the single-node segments derived from young (A, stored for 4 months) and old (B, stored for 14 months) tubers. GA activities were detected by *Avena* endosperm test. Broken lines represent the amount of reducing sugar liberated from the endosperms by 10⁻⁸ and 10⁻⁷ M GA₃.

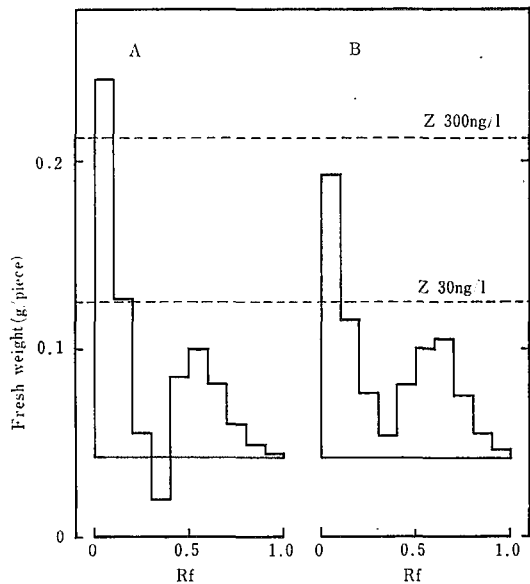


Fig. 29. Comparison of the levels of cytokinin in the single-node segments derived from young (A) and old (B) tubers. Cytokinin activities were detected by soybean callus assay. Broken lines represent callus yields with 30 and 300 ng/l zeatin.

塊茎形成率は親いもの齡により著しい影響を受け、老化塊茎に由来する莖断片は容易に塊茎化した (Fig. 10)。もし生長物質類の内生変動が塊茎形成を直接誘起するのであれば、老若2種の塊茎に由来する莖断片の内生長物質含量に相異が期待される。したがって貯蔵期間4カ月の若齡塊茎と、同14カ月の老化塊茎より得た莖断片のGA様物質、サイトカイニンおよびABA様物質の含量の比較を行なった。なおサイトカイニンはButOH抽出には依らず、イオン交換樹脂の溶出物を直接ペーパークロマトグラフィーによって分画した。

(1) GA様物質 Fig. 28に示すようにGA様物質の含量は若い塊茎に由来する莖断片の方が高いことを確認した。

(2) サイトカイニン サイトカイニン活性はペーパークロマトグラム上のRf 0.0-0.2とRf 0.4-0.7の部分に認められた (Fig. 29)。Zリポチドに相当する前者の活性は、わずかに若い塊茎の莖断片に高かった。しかしZRを主体とする後者の活性は老若両塊茎の莖断片間に差異は認められなかった。

(3) ABA様物質 ABA様物質の活性は、親いもの老若にかかわらず大差は認められなかった (Fig. 30)。

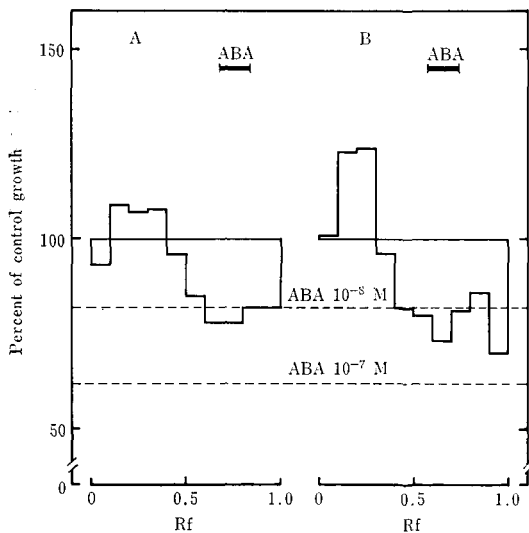


Fig. 30. Comparison of the levels of ABA-like substance in the single-node segments derived from young (A) and old (B) tubers. The activities were detected by inhibition of *Avena* coleoptile straight growth. Broken lines represent the percent of control growth obtained by 10^{-8} and 10^{-7} M ABA.

3. 考 察

GREGORY³⁶⁾ および CHAPMAN¹⁷⁾ が塊茎形成物質 (TIS) の存在を予測して以来、塊茎形成における生長物質の役割について多くの研究がなされてきた。

PALMER と SMITH⁸⁹⁾ は器官培養法を用いた塊茎形成実験により、サイトカイニンの塊茎形成促進効果を明らかにし、これが塊茎形成の重要な要因であると報告した。また MAUK と LANGILLE⁶⁷⁾ も ZR が TIS であると主張した。しかしながら、これらの研究はいずれも高濃度蔗糖添加培養 (蔗糖濃度4%以上) によって得られた結果である。これに対し本実験では低濃度蔗糖 (2%) を用いた場合、ZR の塊茎形成促進効果は全く認められなかった (Fig. 21)。また、もしサイトカイニンを TIS と仮定すれば、莖断片培養において塊茎化の容易な培養材料ほど高サイトカイニン含量が期待される。しかし予期に反し塊茎化の難易とサイトカイニン含量との間には有意な関連は認められなかった (Fig. 29)。したがってサイトカイニンが塊茎形成の直接的な誘導因子である可能性は極めて低い。

莖断片培養において高濃度蔗糖 (4%以上) の添加により、ZR の塊茎形成促進効果がみられ (Fig. 23)、その塊茎の生重増加も認められた (Fig. 24)。前章において匍枝内のサイトカイニンは細胞分裂の旺盛な時期に最大値に達したが (Fig. 19)、これらの結果を総合すると、サイトカイニンは塊茎細胞の分裂促進を介してその生育を進めるものと解される。

ABA は培養莖断片の側芽次頂部の肥大生長を誘起するが、完全な塊茎化はきたさず、また高濃度蔗糖による塊茎形成を阻害した (Fig. 25)。さらに莖断片の塊茎化の難易と ABA 様物質含量との間には関連性は認められなかった (Fig. 30)。以上の結果より、ABA もまた塊茎形成の決定因子ではなく、莖の伸長生長阻害を介して塊茎形成の補助要因として作用しているものと考えられる。

CEPA および ACC は共に莖断片培養における塊茎形成に対し全く促進効果を示さなかった (Fig. 27)。この結果は、エチレンは塊茎形成に対し何らの影響も与えないことを示している。しかしながら PALMER と BARKER⁹²⁾ の指摘のように、莖断片上の側芽はこれらの物質により横地性を示した。したがって、エチレンは少くとも匍枝の横地性の発現に何らかの役割を果たしている可能性がある。

バレイショの GA 含量の減少が塊茎形成の誘因として指摘されて以来^{83,84)}、GA と塊茎形成との関連性について各方面より研究され、その重要な役割が明らかとな

った^{11,96,98,119})。本実験においても GA は茎断片培養における塊茎形成を強く阻害し (Fig. 26), また塊茎形成の困難な茎断片では GA 様物質含量が、塊茎化の容易な茎断片に比して明らかに高かった (Fig. 28)。また前章の結果でも、匍枝の肥大に伴って内生 GA 様物質は顕著な減少を示している (Fig. 17)。したがって GA 含量の減少が塊茎形成の必要条件であることが再確認された。

従来多くの研究成果において、既知の植物生長物質類のパレイシヨ塊茎形成機構への関与が指摘されてきたが、その作用実態については異論が少なくない。本研究において、これらの植物生長物質の役割について再検討したが、いずれも塊茎の形成と生育に当たり何らかの役割を果たしているが、単独で塊茎形成を直接誘起する要因と結論することは困難であった。したがって GREGORY³⁶) および CHAPMAN¹⁷) が示唆したような未知の特異的 TIS が、GA の減少と相まって塊茎形成を誘起する可能性⁸⁵) が残されている。

植物生長物質のうちでサイトカイニンは塊茎肥大促進因子として塊茎の生長促進に貢献することが判明した。サイトカイニンの多寡により塊茎の生長が左右される可能性がある。今後、TIS の検索とあわせて、パレイシヨ植物体におけるサイトカイニンの消長について検討する必要があるものと思われる。

第7章 内生サイトカイニンの動向

前章においてパレイシヨ塊茎の肥大生長におけるサイトカイニンの重要性を指摘した。サイトカイニンは塊茎の肥大のみならずパレイシヨの生育諸段階に関与していることが知られている。本章では別個な視点からパレイシヨのサイトカイニンに関して検討を加えた。

1. 塊茎の ButOH 可溶性, および水溶性サイトカイニン

Wareing 一派は *S. tuberosum* ssp. *andigena* の匍枝の発生と伸長方向はサイトカイニンの他にオーキシンおよび GA の三者の協同効果によって制御されていると主張している^{60,130,131})。すなわち頂芽部を除去し頂芽優勢を解除すると側枝が伸長するが、主茎が根を有する場合その伸長方向は背地性を示し、それ自身は正常な葉条茎になるが、主茎の根端を切除すると側枝は横地性を有する匍枝となった。さらにこの際、匍枝の先端部にカイネチンあるいはベンチルアデニンを添加すると、匍枝は直立して葉条茎に転換した。他方 GA と IAA を同時に主茎の截頭面に添加すると側枝は匍枝として生長した。したがって匍枝の横地性の維持と伸長には GA と

IAA が促進的に働き、サイトカイニンは匍枝の質的変換をきたすことを指摘した。

パレイシヨの内生サイトカイニンに関してはいくつかの報告が出されている。VAN STADEN¹²²) は塊茎抽出物の酢酸エチル可溶性分画に ZR, Z および IPAR を検出した。また KODA と OKAZAWA⁵¹) は ButOH 可溶性分画に Z グルコシド, および微量の Z リポチドおよび IPA リポチドの存在も認めている。塊茎中の ZR は cis 型である⁶⁷)。これらの有機溶媒可溶性のサイトカイニンは、既述したように (第5章) 塊茎の生育に伴い変動することが明らかとなっている^{88,104})。

一方、塊茎の水溶性サイトカイニンに関しては不明の点が少ない。VAN STADEN と DIMALLA¹²⁸) は水溶性分画に ZR グルコシドを検出し、これは塊茎の休眠終了時に減少することを認めた。高等植物の主要な水溶性サイトカイニンは Z リポチドであり^{14,69})、これは塊茎の ButOH 可溶性分画中にも微量ながら検出された⁵¹)。

したがって塊茎抽出物の水溶性分画にはこの物質が多量に存在するものと推察される。

本実験では、まず塊茎の水溶性サイトカイニンの定性を行ない、ついで塊茎一世代を通じてこのサイトカイニンと ButOH 可溶性サイトカイニンの消長を検討し、両者の関連性について考究した。

1) 材料および方法

パレイシヨを5月中旬に圃場に播種し、常法により栽培した。6月初旬に匍枝が発生し伸長を開始した。約2週間後に匍枝次頂部の肥大が始まり、以降急速に塊茎形成が進行した。生育中の匍枝と塊茎を6月15日から4回にわたって2週間毎に採取し、生育段階に応じて下記のように4群に分類した。A, 伸長中の匍枝先端部 (長さ約1 cm); B, 肥大中の匍枝先端部 (長さ約1 cm); C, 塊茎化完了直後の塊茎 (直径約1~2 cm); D, 完熟直前の塊茎 (直径約4~6 cm)。親いもに関しては、草丈が約10 cm に達した5月下旬と、約30 cm となり匍枝の発生を開始した6月初旬に採取し、それぞれ F および G 群とした。

これらの試料からサイトカイニンを抽出し、ButOH 抽出により ButOH 可溶性分画と水溶性分画に分けた。水溶性分画は直接あるいは加水分解酵素処理後、クロマトグラフィーに供した。

2) 実験結果

(1) 水溶性サイトカイニン パレイシヨ塊茎の水溶性サイトカイニンについて検討するため、C 群より得られた水溶性分画を直接 Sephadex LH-20 カラムクロマト

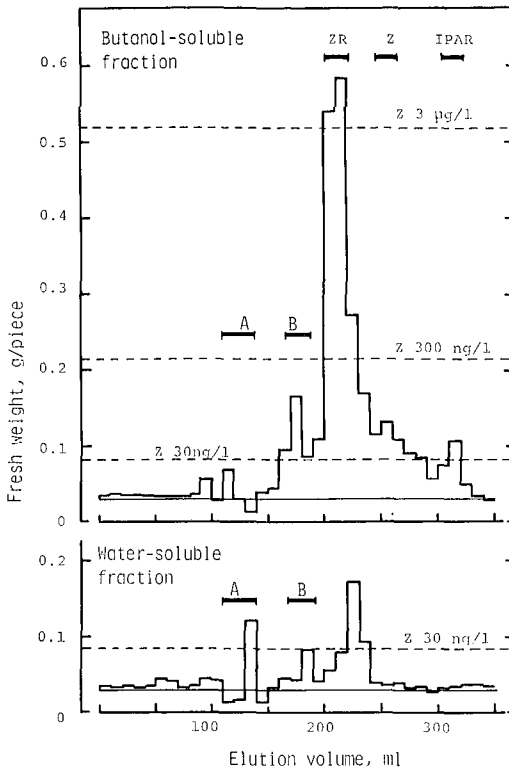


Fig. 31. Soybean bioassays of butanol- and water-soluble cytokinins obtained from growing potato tubers after fractionation on Sephadex LH-20. Broken lines represent callus yield with 30 ng 300 ng and 3 $\mu\text{g}/\ell$ zeatin.

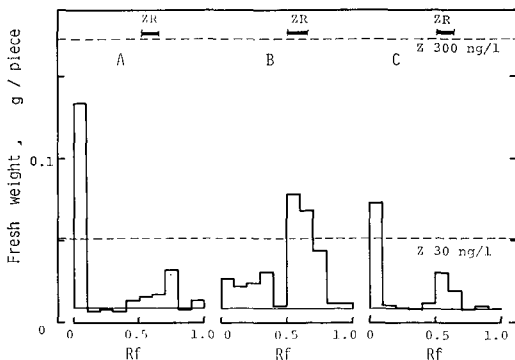


Fig. 32. Soybean bioassays of factor A obtained by Sephadex LH-20 column chromatography after enzyme treatments. A, control; B, alkaline phosphatase; C, β -glucosidase.

グラフィーを用いて分画した。なお比較のため ButOH 可溶性分画も同様に分画しバイオアッセイに供した。Fig. 31 に示すように ButOH 可溶性分画には ZR, Z および IPAR の溶出部位にサイトカニン活性が検出された。またこの三者より速やかに溶出する部位にもう一種の活性が認められた。

水溶性分画には ZR の残存がみられたが, Z および IPA は全く検出されなかった。またこの分画中には ZR の他に二種のサイトカニン活性が検出された。これらのサイトカニンを溶出順に factor A および B と名付けてさらに検討した。Factor A をペーパークロマトグラムに展開すると, 大部分の活性は Rf 0-0.1 にみられたが (Fig. 32 A), アルカリ性ホスファターゼ処理後に展開すると, その大部分の活性は Rf 0.5-0.8 に移動した (Fig. 32 B)。しかしこの factor A は β -グルコシダーゼに対しては安定であった (Fig. 32 C)。したがって factor A はサイトカニンのリポチドであることが明らかとなった。Factor A のアルカリ性ホスファターゼによる加水分解産物を Sephadex G-10 カラムで分画すると, ZR と同一の溶出部位に大部分の活性が検出され, また IPAR の部位にも弱い活性が認められた (Fig. 33)。したがって factor A は主に Z リポチドであり, これに少量の IPA リポチドを含むことが判明した。

一方, factor B を Sephadex LH-20 の小型カラム (1.5 \times 30 cm) で分画すると, 活性のピークは Z に先行し

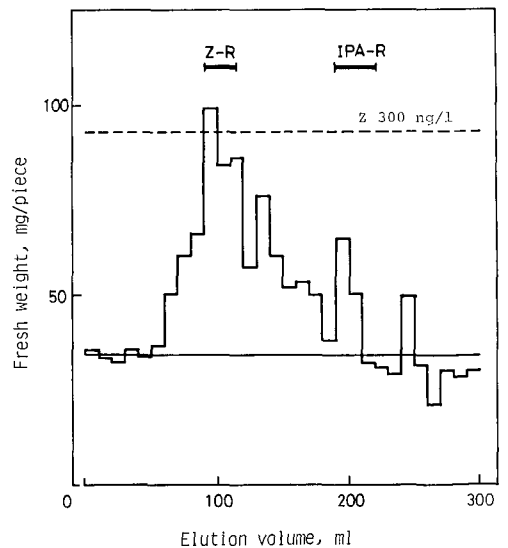


Fig. 33. Soybean bioassay of alkaline phosphatase treated factor A after fractionation on Sephadex G-10.

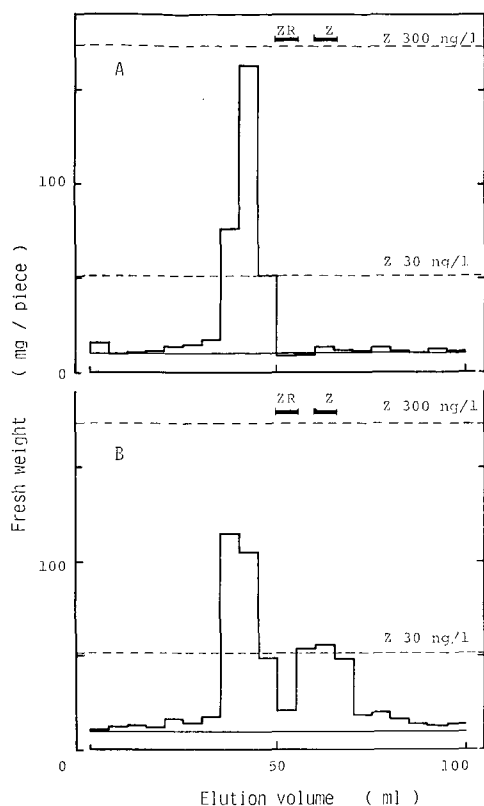


Fig. 34. Soybean bioassays of factor B after β -glucosidase treatment. Factor B was fractionated on a small Sephadex LH-20 column before (A) and after (B) β -glucosidase treatment.

て溶出したが、 β -グルコシダーゼ処理後の分画では、Zに相当する部位に活性が出現した(Fig. 34)。したがって factor B は Z グルコンドと考えられる。

以上の結果から、バレイショ塊茎内の ButOH 可溶性サイトカイニンの主体は ZR であり、水溶性サイトカイニンは Z リポチドが主体であることが判明した。また Z グルコンドは全体の 2/3 が ButOH 可溶性分画に存在した。

(2) 塊茎一代における ButOH 可溶性、および水溶性サイトカイニンの消長

塊茎一代におけるサイトカイニンの量的・質的変動について検討を行なった。本実験においては、第5章とは異なり、塊茎形成過程の細分は行なわなかった。

第5章の結果と同様に ButOH 可溶性サイトカイニンは伸長中の匍枝先端部では微量であったが、その肥大に伴って急激な増加を示した(Fig. 35 A, B)。その後塊茎の生育中はほぼ一定値を維持した(C, D)。他方親いもの含量は、播種後萌芽に伴わずかな減少を示したが(E)、匍枝発生期に至って激減した(F)。

ペーパークロマトグラム上では Z グルコンドは Rf 0.3-0.5 に、Z および ZR は Rf 0.5-0.7 にそれぞれ分布する。伸長中の匍枝には Z グルコンドに相当する Rf 0.4-0.5 部分の活性は認められないが、匍枝の肥大に伴ってこれは急激に出現し(B)、塊茎形成完了期の減少を経て(C)塊茎の完熟によって完全に消失した(D)。

水溶性サイトカイニンはアルカリ性ホスファターゼによる処理後、加水分解産物をペーパークロマトグラフィ

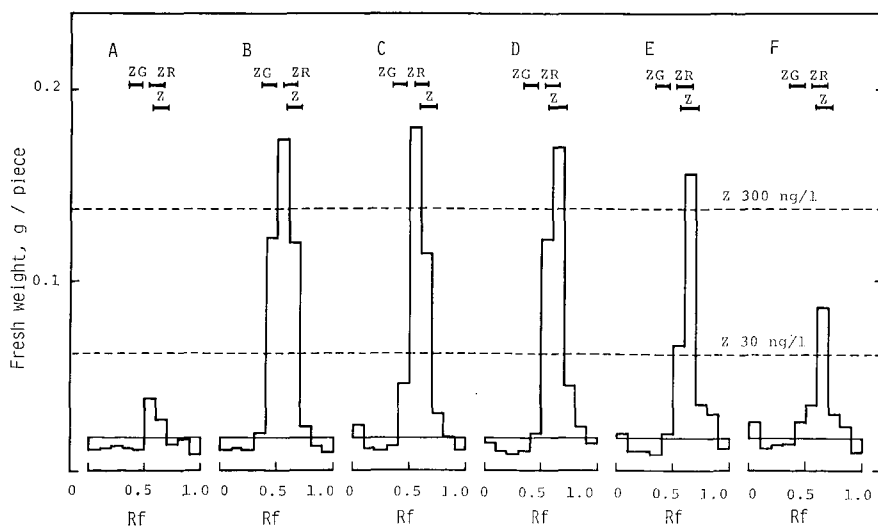


Fig. 35. Changes in the level of butanol-soluble cytokinin during the life cycle of potato tubers. Each extract equivalent to 10 g fresh weight was chromatographed on paper and assayed using soybean callus. A, elongation stolon tips; B, swelling stolon tips; C, developing tuber I; D, developing tuber II; E, mother tuber I; F, mother tuber II.

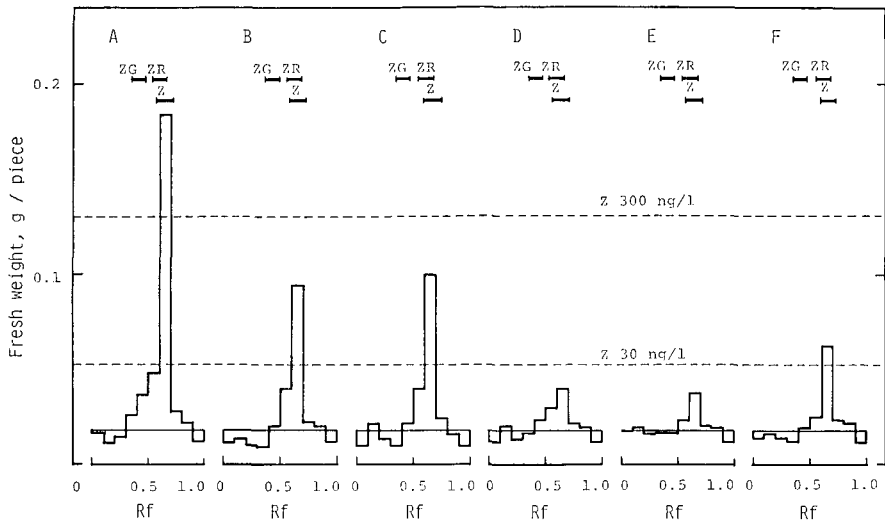


Fig. 36. Changes in the level of water-soluble cytokinin during the life cycle of potato tubers. Symbols mean the same as in Fig. 35.

ーに供した。水溶性サイトカインは ButOH 可溶性サイトカインとは全く対照的な消長を示した (Fig. 36)。すなわち、伸長中の匍枝先端部の含量は著しく高く (A)、匍枝の肥大に伴い急激に減少した (B)。塊茎の生育中には低いレベルを保ち (C) 完熟期に至るとさらに減少を示した (D)。親いもの水溶性サイトカインは萌芽期には低く、匍枝の発生に伴いわずかな増加が認められた (F)。

ButOH 可溶性および水溶性サイトカインの消長

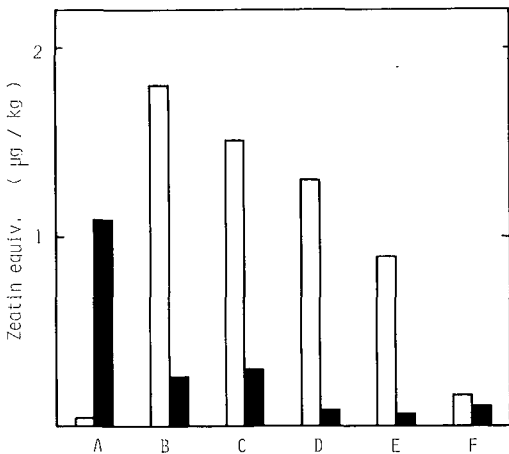


Fig. 37. Changes in the levels of butanol- and water-soluble cytokinins during the life cycle of potato tubers. White bar, butanol-soluble cytokinin; shaded bar, water-soluble cytokinin.

を、塊茎 1 kg 生重当りの Z 当量に換算して Fig. 37 に示した。

(3) 肥大萌芽および茎頂のサイトカイン

休眠を終えた塊茎を常温に放置すると、短縮した萌芽が形成される。これは多数の節を有し、播種すると地上茎と共に多数の匍枝を発生する。

次にこの萌芽と、伸長茎の茎頂の ButOH 可溶性および水溶性サイトカイン含量を測定した。収穫後 4°C で 3 カ月間貯蔵した塊茎を 25°C 暗所に移し、2 週間後に萌芽を採取した。またこの萌芽した塊茎をさらに 3 週間暗所温室中に置き、生じた徒長茎から長さ 1 cm の茎頂を採取した。これらの萌芽と茎頂からサイトカインを抽出し、ButOH 可溶性分画と水溶性分画に分け、後者はアルカリ性ホスファターゼ処理を行なった。

萌芽の ButOH 可溶性および水溶性分画は共に多量のサイトカインを含有した (Fig. 38)。Z 当量に換算すると ButOH 可溶性サイトカインは 2.2 µg/kg 生重、水溶性サイトカインは 7.5 µg/kg 生重であり、両者の比は 0.29 であった。

茎頂のサイトカイン含量は僅少で ButOH 可溶性および水溶性サイトカイン含量はそれぞれ 0.04 µg、および 0.05 µg/kg 生重で、両者の比は 0.8 であった (Fig. 39)。

これに対し伸長中の匍枝先端部には、ButOH 可溶性分画中に 0.03 µg/kg 水溶性分画中に 1.1 µg/kg のサイトカインが存在し、両者の比は 0.03 を示した。この比率は前二者に比してはるかに低い。したがって匍枝におけ

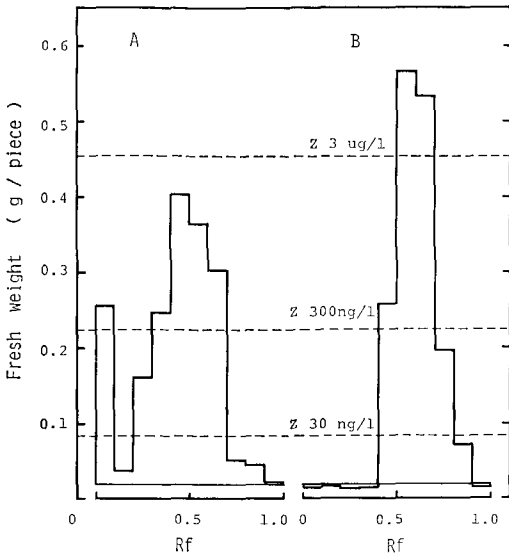


Fig. 38. Comparison of the levels of butanol-soluble (A) and water-soluble (B) cytokinin in etiolated potato sprouts. Water-soluble fraction was treated with alkaline phosphatase.

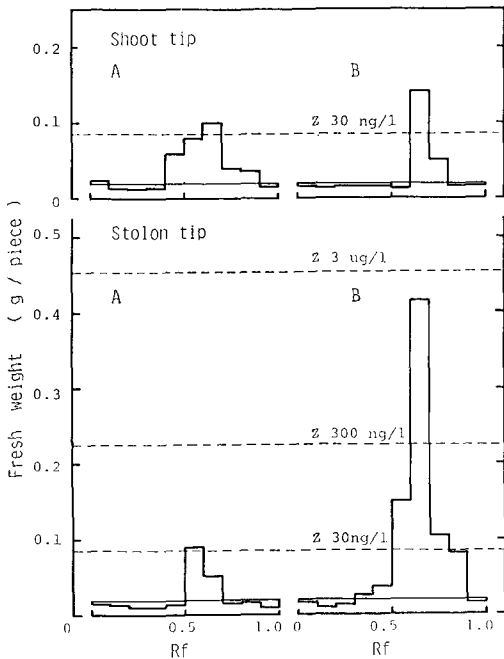


Fig. 39. Comparisons of the levels of butanol-soluble (A) and water-soluble (B) cytokinins in etiolated shoot apices (top) and stolon tips (bottom). Water-soluble fractions were treated with alkaline phosphatase.

る低 ButOH 可溶性サイトカニンと高水溶性サイトカニン含量は、匍枝に特異的なものであることが明らかとなった。

3) 考 察

パレイショ塊茎の ButOH 可溶性、および水溶性サイトカニンはそれぞれ ZR および Z リポチドを主体とするが、塊茎の生活環においてこの両者は相反した推移を示した。すなわち前者の増加は後者の減少をもたらし、前者の減少は後者の増加をきたした (Fig. 37)。

SATTELMACHER と MARSCHNER¹⁰⁴⁾ は水耕栽培のパレイショを用いて塊茎形成に伴う内生サイトカニンの変動を追求した結果、2種のサイトカニンが相反した推移を示すことを認めた。すなわち塊茎には2種のサイトカニンが存在し、これらはペーパークロマトグラム上で Rf 0.3-0.5 と Rf 0.6-0.9 に分けられる。前者は伸長中の匍枝では高含量を示すが、塊茎形成に伴い減少をきたした。またこの塊茎の二次生長に伴い再び増加を示した。これに対し後者は匍枝中には少ないが、その塊茎化により増加をきたし、二次生長により再び減少した。このような両者の関係は本実験に示す Z リポチドと ZR との関係に酷似している。彼らはクロマトグラフィーの溶媒として比較的極性の高いもの (sec-ButOH:アンモニア:水, 3:1:1) を用いているので Rf 0.3-0.5 の活性は Z リポチド, Rf 0.6-0.9 は ZR にそれぞれ相当すると考えられる。

匍枝の肥大に伴い ButOH 可溶性サイトカニンの増加と水溶性サイトカニンの減少が認められたが、前者の増加の一部は後者に由来するものと考えられる。肥大した匍枝はその後旺盛な細胞分裂を続け生重量が著しく増加した。したがって塊茎当りの ButOH 可溶性サイトカニンの増加量はさらに顕著となった。塊茎形成に伴う sink 活性の増加は根端から塊茎へのサイトカニン供給を活発化し、この急激な量的増加をもたらしているものと推察される。この増加した ButOH 可溶性サイトカニンは細胞分裂の促進を介して塊茎形成に寄与しているものと思われる。

伸長中の匍枝先端部には高濃度の水溶性サイトカニンが認められたが (Fig. 36)、この組織内では活発な細胞分裂はみられなかった。この結果はサイトカニンリポチドが活性型ではなく貯蔵型であるとする BROWN と VAN STADEN¹⁴⁾ の見解を支持するものであり、パレイショにおいても Z リポチドは一時的な貯蔵型であると解される。

肥大萌芽の ButOH 可溶性サイトカニン含量は高

いものであったが、水溶性サイトカイニン含量はさらにその3倍以上の値を示した(Fig. 38)。この結果は、塊茎から萌芽に移行した ButOH 可溶性サイトカイニンがここに多量に蓄積したため、貯蔵型である水溶性サイトカイニンへの転換が生じたことを示唆している。

本実験において用いたペーパークロマトグラム上では Z グルコシドは ZR および Z と近接して存在しており、両者を明確に区別することはできなかった。しかし ButOH 可溶性分画の Rf 0.4-0.5 部のサイトカイニン活性の顕著な変動は、塊茎形成過程における Z グルコシドの変動を示唆するものである。Z グルコシドは多くの植物の葉片や師管液に存在することが知られている^{43,45,46,123,124}。したがって本実験でみられた、匍枝肥大に伴って増加を示した Z グルコシドは葉由来する可能性が考えられる。

親いもの ButOH 可溶性サイトカイニン含量は、匍枝の発生により減少を示した(Fig. 35 F)。これは次代の塊茎形成のため、親いもから匍枝へサイトカイニンが移行したことを示している。

伸長中の匍枝の水溶性サイトカイニン含量は極めて高い値を示した(Fig. 36)。生育中の *ssp. andigena* の頂芽や側芽を全て除去すると匍枝は直立して葉状茎に転換すると言われる¹³¹。これはこの処理により根端で生成されたサイトカイニンが匍枝先端部に集積した結果と解される。またカイネチンを匍枝先端部に添加すると、除芽処理と類似した反応がみられた⁶⁰。根端で生成されたサイトカイニンは主に ZR と Z であり^{52,54,107,125}、これらの活性型サイトカイニンは匍枝の横地性の解除に働くと思われ、一方、細胞分裂を伴う匍枝の塊茎化を促進するためには、匍枝先端部におけるサイトカイニンの集積が必要と考えられる。根端由来のサイトカイニンは匍枝先端部で一時不活性型のサイトカイニンリポシドに変換して蓄積し、塊茎形成の開始と共に活性型のリポシドに転化した上で細胞分裂の旺盛化をもたらすものと考えられる。

2. 貯蔵塊茎のサイトカイニン

サイトカイニンはバレイショ塊茎の休眠解除にも関与している。すなわち HEMBERG⁴² は休眠塊茎のカイネチン処理により萌芽開始を認め、この際皮層部の酸性生長抑制物質 (inhibitor β complex) の減退も指摘している。また塊茎に含まれる ButOH 可溶性サイトカイニンは休眠期の終了と共に増加する^{27,128}。一方、この休眠終了期には GA 様物質の増加と共に¹¹² inhibitor β complex の減少が生ずる⁴¹。このようにサイトカイニ

ンおよび GA の増加は inhibitor β complex の減少と対応して芽の生育開始に必要な種々の代謝変動を惹起するものと考えられている。しかしながらこの休眠終了期におけるサイトカイニンの増加に関しては不明な点が少ない。前節で述べたように塊茎形成は ButOH 可溶性サイトカイニンの増加と、水溶性サイトカイニンの減少を伴うが、休眠終了期においても類似した現象が期待される。

休眠塊茎に対する傷害は、傷害反応と呼ばれる一連の代謝活性の増大をもたらす⁵⁰、これが休眠の解除をもたらす⁹。この際、休眠の自然終了時と同様に GA¹⁰⁰ およびサイトカイニン²⁰ の増加が認められた。これらの内生長物質の変動が傷害反応の主因であると考えられている。傷害反応の程度は塊茎の貯蔵温度や貯蔵期間の影響を受け、高温で貯蔵した塊茎、あるいは長期間貯蔵塊茎では反応程度が低い¹²。したがって傷害によって誘起されるサイトカイニン含量の増加も、貯蔵温度や貯蔵期間の影響を受ける可能性がある。

本実験では、各種温度で貯蔵した塊茎の ButOH 可溶性サイトカイニンの経時的変動について検討すると共に、傷害によるサイトカイニン含量の増加に及ぼす貯蔵温度や塊茎の齢の影響について追求した。また ButOH 可溶性サイトカイニンの起源についてもあわせて検討した。

1) 材料および方法

収穫後の塊茎を十分に水洗し、生重約 80 g のものを選別した。これを 2 群に分け 4°C と 25°C 暗所に 20 週間貯蔵した。塊茎の休眠状態を知るため両群から 10 個体を無作為に抽出し、1 週間毎に萌芽率を計測した。萌芽率は

$$(\text{萌芽目数})/(\text{全目数})$$

で表示した。芽の生長がわずかでも認められるものを萌芽した目とした。

サイトカイニンの抽出は収穫 3 週間前、収穫後 1 日目、および貯蔵期間に適時回数、5 個の塊茎を用いて行なった。

塊茎のサイトカイニン含量に及ぼす傷害の影響は下記の方法により調べた。最初に細菌による汚染の影響を除去するため、30 個の塊茎を 0.4% 次亜塩素酸ナトリウム溶液で 30 分間表面殺菌し、次いで水で十分に洗浄した。これらを剥皮し、25°C 暗所湿室中に 24 時間放置した。剥皮直後、6 および 24 時間後にこれらの塊茎を皮層部と髓部に分け、それぞれサイトカイニンの抽出材料とした。

2) 実験結果

(1) 貯蔵塊茎の萌芽率と ButOH 可溶性サイトカイニンの変動

塊茎を 25°C に貯蔵した場合、5 週目までは萌芽は全く観察されなかった。したがってこの期間を内生休眠期とする。5 週日以降萌芽が始まり、20 週目には全ての目に萌芽がみられた (Fig. 40)。塊茎抽出物の ButOH 可

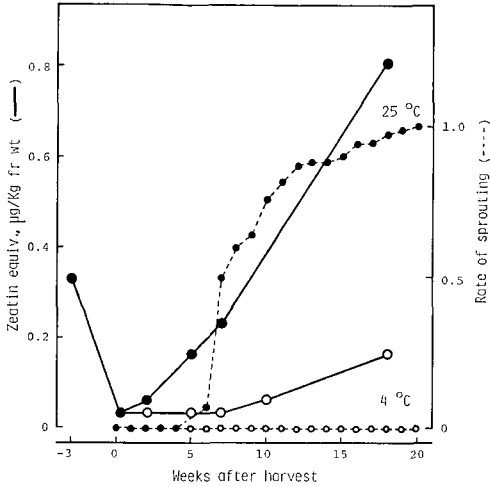


Fig. 40. Post harvest changes in the rate of sprouting and the level of butanol-soluble cytokinin in potato tubers stored at 4°C and 25°C.

溶性分画をペーパークロマトグラムに展開し、サイトカイニン活性を測定した結果、全期間にわたり Z および ZR に相当する部分、すなわち Rf 0.5-0.7 部位にサイトカイニン活性が検出された。この活性を Z 当量で図示すると収穫時に一時的な減退を示したが、その後再び増加に転じ、以後急増を開始した。Fig. 40 よりサイトカイニン含量の増加は萌芽開始の 4 週間前に始まることが認められた。

一方、4°C に貯蔵した塊茎は 20 週間の全貯蔵期間を通じて全く萌芽は認められず、この間 ButOH 可溶性サイトカイニン含量は 7 週目までは低い値を示したが、その後漸増を示した。

上記の 25°C 貯蔵塊茎の ButOH 可溶性サイトカイニンの増加についてさらに検討するため、水溶性サイトカイニン含量もあわせて追求した。この際、収穫後 25°C で 2 週間貯蔵したものを休眠塊茎とし、8 週間貯蔵したものを萌芽塊茎とした。これらの水溶性分画をアルカリ性ホスファターゼ処理後ペーパークロマトグラフィーに供し、サイトカイニン活性の測定を行なった。その結果水溶性サイトカイニンは ButOH 可溶性サイトカイニンとは対照的な推移を示し、休眠中は高く萌芽と共に激減することが判明した (Fig. 41)。

(2) 貯蔵温度の変動に伴う ButOH 可溶性サイトカイニン含量の推移

4°C で 15 週間以上貯蔵した塊茎は 25°C に移すと約 2 週間で萌芽し始めた。したがってこの時期にはすでに塊

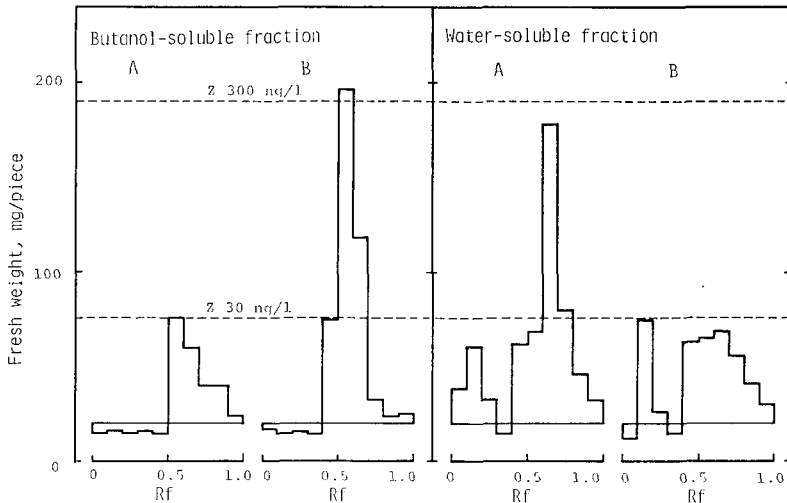


Fig. 41. Comparison of the levels of butanol- and water-soluble cytokinins in potato tubers before (A) and after (B) the breaking of rest. Water-soluble fractions were treated with alkaline phosphatase.

茎は内生休眠を終了し、低温貯蔵による強制休眠状態にあったと解される。この際貯蔵温度の上昇による ButOH 可溶性サイトカイニン含量の急増が期待される。本実験では 4°C で 18 週間貯蔵した塊茎を用い、ButOH 可溶性サイトカイニン含量に及ぼす変温効果について検討し

た。4°C で貯蔵した塊茎を 7 日間 25°C に置くと、サイトカイニン含量の顕著な増加が認められた (Fig. 42)。高温処理終了後再び 4°C に戻すと、その含量は減少し 7 日目に至るとほぼ初期の値に戻った。この実験期間中に萌芽は全く認められなかった。

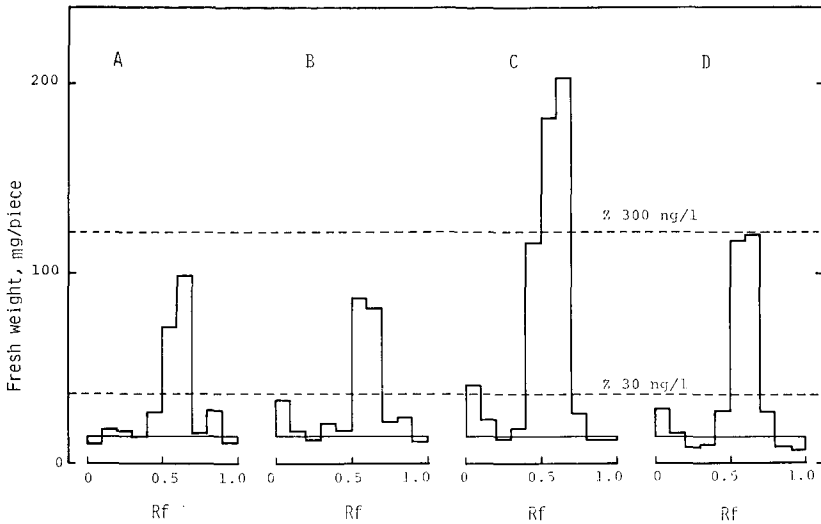


Fig. 42. Effect of changes in the storage temperature on the level of butanol-soluble cytokinin in potato tubers. Tubers stored at 4°C for 18 weeks (A) were transferred to 25°C and kept for one (B) and 7 (C) days, and re-cooled for 7 days (D).

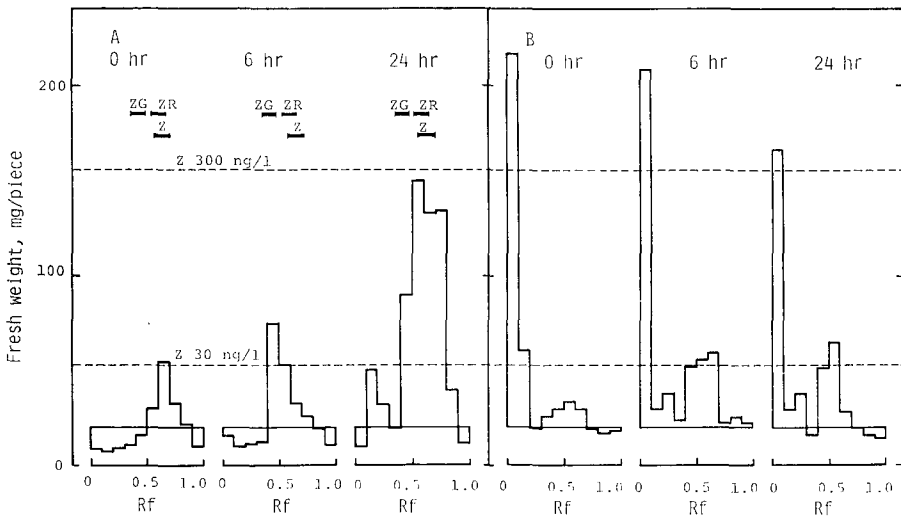


Fig. 43. Changes in the levels of butanol-soluble (A) and water-soluble (B) cytokinins in cortical tissues of cold-stored potato tubers during aging after wounding. Tubers stored at 4°C for 7 weeks were wounded by peeling the periderm.

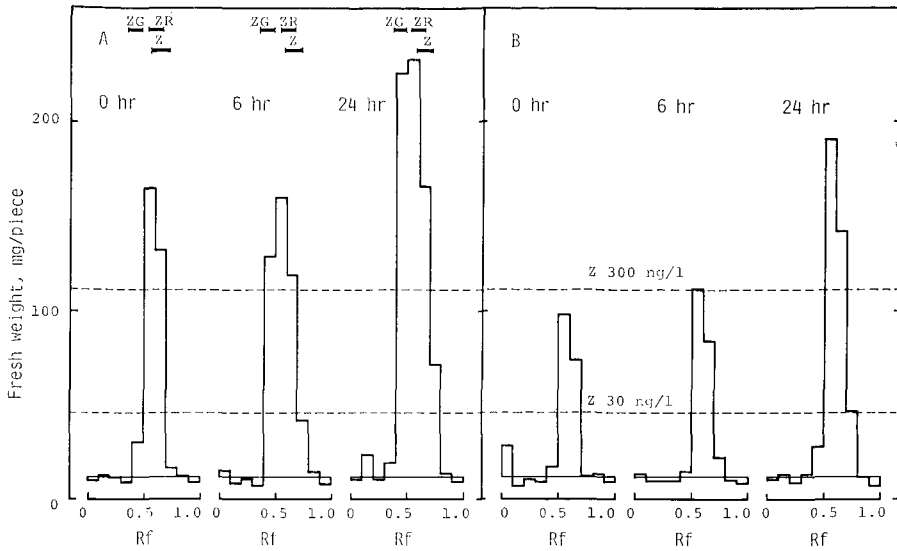


Fig. 44. Changes in the levels of butanol-soluble cytokinin in cortical (A) and medullary (B) tissues of warm-stored potato tubers during aging after wounding. Tubers stored at 25°C for 7 weeks were wounded by peeling the periderm.

(3) 塊茎のサイトカイニン含量に及ぼす傷害の影響

休眠塊茎、萌芽塊茎および強制休眠塊茎にそれぞれ剥皮処理による傷害を与え、これによる ButOH 可溶性サイトカイニンの経時的変動について検討した。

休眠塊茎 (4°C 7 週間貯蔵) を剥皮し、25°C 暗所湿室中に置くと皮層部の ButOH 可溶性サイトカイニンは 24 時間で 23 倍に激増し、その増加量は Z 当量で 1.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 生重であった (Fig. 42 A)。最初の 6 時間に増加したサイトカイニンはペーパークロマトグラム上では Rf 0.4-0.5 部分に分布し、これは Z グルコシドであると考えられる。

一方、水溶性分画のサイトカイニン活性を測定したところ、これは剥皮処理により減少し (Fig. 43 B)、剥皮後の減少量は 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 生重を示した。この結果は ButOH 可溶性サイトカイニンの増加の一部は水溶性サイトカイニンに由来することを示している。

萌芽塊茎 (25°C 7 週間貯蔵) を剥皮処理した場合も同様に皮層部における ButOH 可溶性サイトカイニン含量が増加し (Fig. 44 A)、24 時間で 0.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 生重の増加を示した。先に示したように休眠塊茎では ButOH 可溶性サイトカイニンの増加と交替して水溶性サイトカイニンの減少が認められたが、この減少量は増加量に見合うものではなかった。したがって ButOH 可溶性サイトカイニンが髓部から皮層部へ移行してこの不足分を補

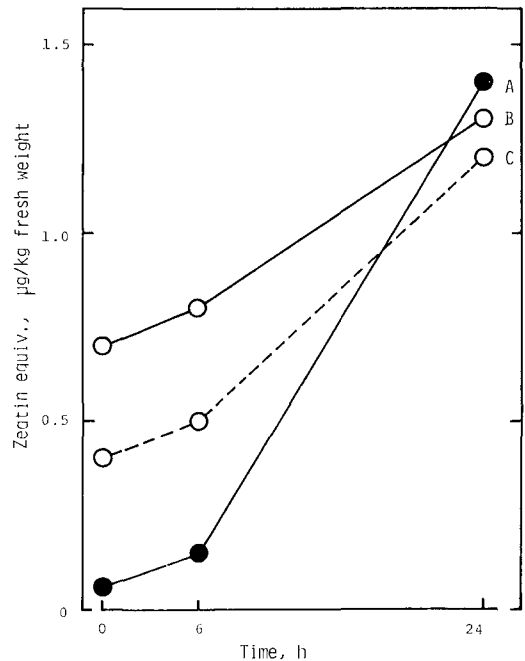


Fig. 45. Effect of wounding on the levels of butanol-soluble cytokinin in cortical tissues of potato tubers. A, resting tubers; B, sprouting tubers; C, tubers forced to rest by low temperature.

充している可能性があり、さらにこの点を追求した。しかし予期に反して髓部の ButOH 可溶性サイトカイニンも傷害後増加を示した (Fig. 44 B)。

強制休眠塊茎 (4°C 20 週貯蔵) に傷害を与えた場合も前記二者の場合と同様に皮層部の ButOH 可溶性サイトカイニンの増加がみられた。

休眠塊茎、萌芽塊茎および強制休眠塊茎の剥皮後における皮層部の ButOH 可溶性サイトカイニン含量の変動を総合して Fig. 45 に示す。これによれば剥皮後 24 時間のサイトカイニン含量は常に 1.2~1.4 μg の範囲内の値を示し、顕著な差異は認められなかった。しかし実験開始時の含量の差異が大であるため、24 時間の増加量の順位は、休眠塊茎>強制休眠塊茎>萌芽塊茎を示した。

3) 考 察

塊茎の ButOH 可溶性サイトカイニン含量は収穫後急減し休眠期間中は極めて低い値を示し、その後休眠覚醒時には再び増加を示した (Fig. 40)。この休眠期間中のサイトカイニンの低含量は ABA 様物質の高含量と対応して、芽の休眠の維持に働いていると解される。また休眠終了に先行して生ずる ButOH 可溶性サイトカイニンの増加は、これが芽の生長再開に必須な種々の代謝変動を誘起する一要因であることを示唆している。

一方、水溶性サイトカイニンは休眠終了に伴い減少を示したが (Fig. 41)、これはこのサイトカイニンが ButOH 可溶性サイトカイニンへ転換したことを示している。

前節において貯蔵期間を除いたパレイショ塊茎の生活環における両サイトカイニンの変動について検討したが、これに本実験の結果を総合すると、塊茎一代全期にわたる両サイトカイニンの変動を图示することができる (Fig. 46)。この図から明らかのように、塊茎一代における顕著な生理的・形態的変動期には両サイトカイニンの相互変換が起っている。これによって活性型のサイトカイニンリポンドのレベルが調節されていると考えられる。水溶性のリポチド型サイトカイニンはパレイショ塊茎では一時的貯蔵型として機能しているものと推察される。このようなりポチド型とリポンド型との間の相互変換現象は種子の休眠時においても起ることが報告されている^{14,121)}。

塊茎の剥皮処理による傷害は ButOH 可溶性サイトカイニンの増加をもたらしたが (Fig. 45)。傷害後 24 時間以内にみられた増加量には、塊茎の貯蔵期間および貯蔵温度による差異が認められた。これらの差異は DNA 合成量の差異をもたらすのみならず¹²⁾ 各種の傷害反応の程度にも影響を及ぼすものと考えられる。

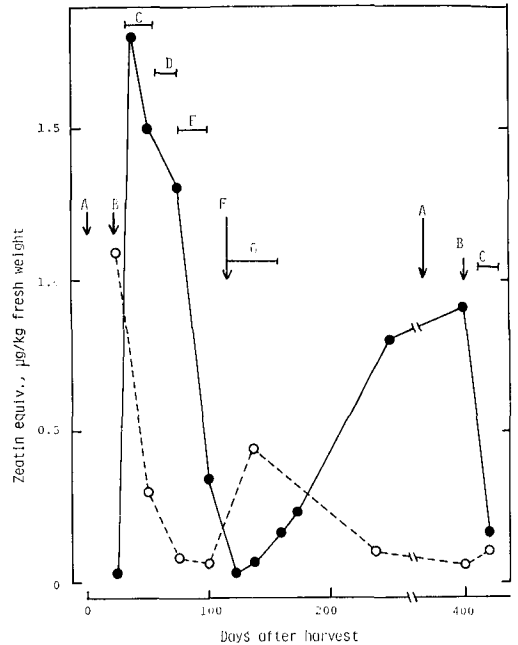


Fig. 46. Changes in the levels of butanol-soluble (●) and water-soluble (○) cytokinins during the whole life cycle of potato tubers. A, sowing; B, stolon outgrowth; C, tuberization period; D, tuber developing period; E, tuber maturation; F, harvest; G, endogenous resting period.

剥皮処理により塊茎髓部の ButOH 可溶性サイトカイニンも増加した (Fig. 44 B)。この結果は皮層部の ButOH 可溶性サイトカイニンの増加は、髓部からのサイトカイニンの移動に起因するものではないことを示している。これらの皮層部および髓部で認められた ButOH 可溶性サイトカイニンの増加の一部は水溶性サイトカイニンの転換に由来するものと思われる。しかし Fig. 43 図でみられた傷害後 24 時間の水溶性サイトカイニンの減少量は約 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 生重で、ButOH 可溶性サイトカイニンの増加量 (1.3 μg) より少なかった。また本実験においては、傷害後 6 時間以内に増加した Z グルコンド様サイトカイニンの由来は解明できなかった。

サイトカイニンは根端^{52,107)}、莖頂⁵⁴⁾およびカルス組織^{25,57,80,81,93,108)}等の分裂組織で生成されると考えられているが、パレイショの塊茎柔組織細胞は静止期 (G_0 または G_1 期) にあり、サイトカイニンの生成部位とは考え難い。VAN STADEN と DIMALLA¹²⁸⁾ は休眠塊茎中に ZR グルコンドが含有されると報告しているが、本実験

においてこれは検出できなかった。したがって傷害による ButOH 可溶性サイトカイニンの増加の一部は未知の貯蔵型に由来するものと考えられる。

3. 塊茎形成に伴う葉身のサイトカイニン含量の変動

サイトカイニンによるパレイシヨ塊茎形成の誘起に関する研究⁸⁹⁾以降、サイトカイニンとパレイシヨ塊茎形成との関連性が注目されてきた。LANGILLE 一派は塊茎誘導条件下における葉身サイトカイニンの一時的増加を報告した^{31,32,63)}。さらにこのサイトカイニンは主に cis-ZR であり組織培養における ZR 処理は塊茎形成をきたすことから ZR が塊茎形成物 (TIS) であると主張した⁶⁷⁾。しかし第6章で述べたようにサイトカイニン (ZR) が TIS である可能性は少ない。

本実験は、上述のような塊茎形成に伴う葉身サイトカイニンの一時的増加を再確認するためにおこなった。

1) 材料および方法

既述の方法によりパレイシヨを人工気象器で育成し、その葉身よりサイトカイニンを抽出した。他方、圃場栽培の葉もあわせて用いた。実験材料は播種後 20 日、30 日、40 日、50 日および 80 日目に採取したが、これらの時期はそれぞれ匍枝発生期、塊茎形成開始期、塊茎形成進行期、塊茎生育期および塊茎完熟期に相当している。

Dowex カラム吸着分画を 3N アンモニアで溶出した後、減圧濃縮してアンモニアを除去した。これを Am-

berlite XAD-2 カラムに通し、次いでカラムを十分に水洗した。カラム吸着物を 40% EtOH で溶出し、これを濃縮乾固後ペーパークロマトグラフィーに供した。

2) 実験結果

人工気象器で栽培したパレイシヨ葉のサイトカイニン含量の変動を Fig. 47 に示した。葉のサイトカイニン活性は僅少であったが、塊茎誘導条件に変えると明瞭な減少が認められた。葉のサイトカイニン含量の変動と塊茎形成の進行状態との関係を見ると (Fig. 48)、塊茎誘導条件では処理 1 週目より塊茎を形成し、これに伴い葉のサイトカイニン含量は半減した。以後全個体に塊茎形成をきたした 3 週間目まで、サイトカイニンは微量で推移した。

一方塊茎非誘導条件では全実験期間を通じて塊茎形成は全く認められず、葉のサイトカイニン含量もほとんど変動を示さなかった。

圃場植物の葉のサイトカイニン含量は、ポット栽培のものに比して高い値を示した (Fig. 49)。ペーパークロマトグラム上のサイトカイニン活性は Rf 0-0.3 と Rf 0.5-0.7 に認められた。Rf 0.5-0.7 部の活性は ZR を主体とするものと考えられるが、これは塊茎形成の開始と共に急減し、以後は塊茎生育期まで低値を維持した。しかし塊茎完熟期に至り再び増加を示した。

一方、Rf 0-0.3 部の活性は Z リポチドによるものと解

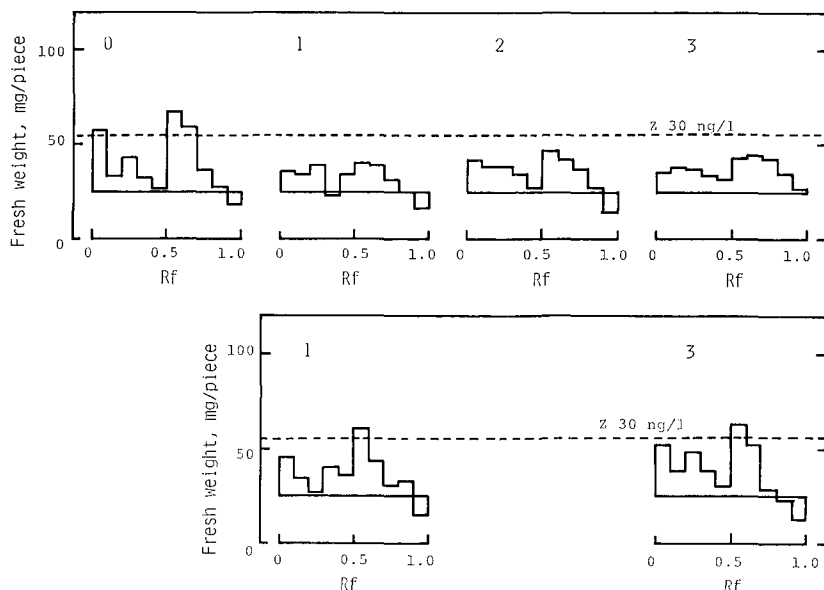


Fig. 47. Changes in the levels of cytokinin in potato leaves during tuberization of the plants. Top, tuber-inducing condition; bottom, non-inducing condition. Numbers indicate weeks after the beginning of the treatment.

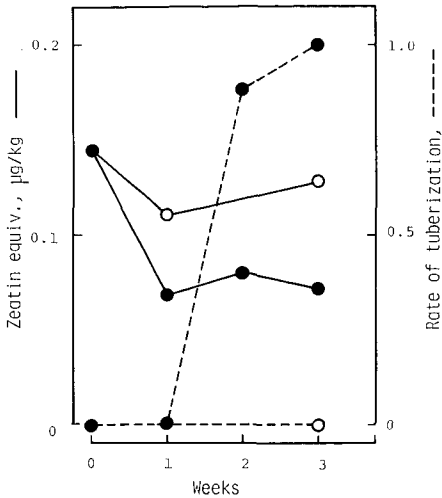


Fig. 48. Changes in the level of cytokinin in potato leaves and the rate of tuberization in the plant. ●, tuber-inducing condition; ○, non-inducing condition.

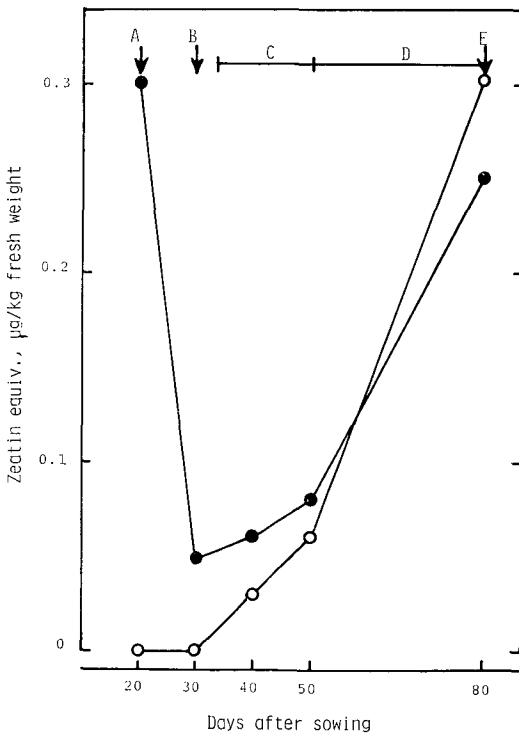


Fig. 49. Changes in the levels of butanol- (●) and water-soluble (○) cytokinins in field-grown potato leaves. A, stolon outgrowth; B, beginning of tuberization; C, tuberization period; D, tuber developing period; E, tuber maturation.

されるが、これは匍枝発生期および塊茎形成開始期の葉には全く検出されなかった。しかし塊茎形成進行期に至ると出現し、さらに塊茎生育期の微増を経て、塊茎完熟期には顕著な増加を示した。

3) 考 察

バレイシヨ葉身のサイトカイニン含量は人工気象器で栽培したものは高く、圃場栽培のものは低かった。高等植物のサイトカイニンの生成部位は根端であるが^{52,54,107}、室内栽培のものは光量不足に起因する根端の栄養欠乏に加えて、根の生育がポットにより制限されている。したがってポット栽培では根端におけるサイトカイニンの生成も制限されているものと思われる。

しかし栽培条件の如何にかかわらず、バレイシヨ葉身のサイトカイニン含量は塊茎形成に伴い減少を示した (Fig. 48, 49)。これは塊茎形成による sink 活性の増加に伴い、葉身のサイトカイニンが匍枝肥大部へ移行することを示唆している。匍枝肥大後期の細胞分裂が活発化する時期に匍枝のサイトカイニン含量は最大値に達した (Fig. 19)。この時期にはサイトカイニンは根端のみならず葉身からも新塊茎へ移行し、これが細胞分裂の誘起と塊茎の肥大生長に貢献しているものと解される。

一方圃場実験では、塊茎の完熟により葉身のサイトカイニン含量は増加に転じ、同時に Rf 値の低い貯蔵型サイトカイニンも出現した (Fig. 49)。これらの結果は塊茎の完熟に伴う sink 活性の減退により、根端から葉身へのサイトカイニン供給が再開し、またこの際過剰のサイトカイニンは貯蔵型に転換したことを示唆している。

LANGILLE と FORSLINE⁶³) によれば、塊茎非誘導条件下で生育したバレイシヨを塊茎誘導条件に移すとサイトカイニン含量は、地上部では4日目に、また地下部では6日目に一時的な増加を示した。バレイシヨは塊茎形成に対する短日要求性が鋭敏ではないため、本実験ではサイトカイニン含量の短期間の変動については追求しなかった。CHAPMAN¹⁷) は葉中に充分量の TIS が蓄積されるためには少くとも14回以上の短日周期が必要であると報告している。また塊茎形成は主茎の基部に近い節より発生した匍枝から始まり、継続的に上位節に移行する。したがって MAUK と LANGILLE⁶⁷) の主張のようにサイトカイニンが TIS であると仮定すると、塊茎形成の継続性によりサイトカイニンの増加は一時的なものではなく、累加的なものでなければならない。したがって LANGILLE らが報告したサイトカイニン含量の一時的増加は環境要因の変化による一時的な現象で、直接塊茎形成に関与するものではないと解される。

結論としてサイトカイニンに関する既述の研究成果を総合的に考慮すると、サイトカイニンは TIS ではないと断定できる。

第 8 章 塊茎形成物質

既述した諸実験成果より既知の生長物質類は、いずれも直接パレイシヨ塊茎形成を誘起する能動要因ではないことを確認した。

GREGORY³⁶⁾は塊茎誘導条件下で育成したパレイシヨ茎葉を接穂として非誘導条件の台木に接ぐと、非誘導条件下でも塊茎形成をきたす事実を明らかにし、塊茎形成物質 (TIS) の存在を仮定した。この物質は若い葉身でつくられ向基的に移行するが、この移行を阻害すると空中塊茎の形成も認められた。CHAPMAN¹⁷⁾もその存在を認め、塊茎形成の誘導完了には少くとも 14 回以上の短日周期を与えその物質の蓄積が必要であると言ひ、またこの物質の茎内の水平方向への移動は少なく向基的移行のみを行うことを明らかにした。しかし KUMAR と WAREING⁶¹⁾は *ssp. andigena* を用いてこの物質の向頂的移動に関して報告し、頂芽の生長停止にも関与すると論じている。さらに EWING と WAREING³⁰⁾は枝葉の挿穂を用いて、短日刺激の感受には完全展開葉を 1 枚着生した挿穂が最も有効であると報告している。これによれば 6 日間の短日処理でも頂芽の生長抑制と基部節の匍枝の生長促進現象がみられることを指摘している。

他方、この TIS は貯蔵中の塊茎でも齢の進行と共に徐々に体内に蓄積し、この過剰蓄積が芽いも形成の原因となっている。このような老化塊茎を親いもとすると、塊茎形成が早期化⁴⁸⁾非誘導条件下でも塊茎形成をきたすことが認められている⁷⁶⁾。

MADEC⁶⁶⁾は塊茎誘導条件下で育成した葉の搾汁 0.2 ~ 0.35 ml を非誘導の挿穂の髓部に注射すると、1 週間後に基部の節部における塊茎化が生ずると報告している。しかしその後の追試は成功をみていない¹⁰⁹⁾。

未知の生理活性物質の追求にはその物質の検定と定量のための生物検定法の確立が必要であり、しかもその検定法には高い再現性と共に簡便性が要求される。また TIS を継続的に追求するためには環境要因や親いもの齢の影響を除去すると共に、検定試料の微生物による変性などを防止しなければならない。MADEC⁶⁶⁾の手法はこれらに関し欠点が多かったが、本研究で用いた茎断片培養法はこの物質の追求を目的とした生物検定法として充分に使用に耐える手法である。

本実験においては、第 4 章で用いた茎断片培養法に若

干の改良を加え、TIS の検索を試みた。

1. 材料および方法

パレイシヨを圃場で常法により育成し、播種後 60 日以上経て塊茎形成完了後の地上部を採取し、これを葉身と、葉柄を含む茎の 2 区に分け、それぞれ既述の方法により EtOH 抽出液を得た。これを TIS 検索の材料とした。

また貯蔵塊茎、および人工気象器で栽培した葉身も同様に抽出し実験に供した。

検定法としての茎断片培養の材料には *ssp. tuberosum* 品種“男しゃくいも”および *ssp. andigena* v. W 553-4 を用い、暗所で黄化徒長茎を育成した。この徒長茎の 1 節を含む茎断片を採取し培養材料とした。10 ml ないし 20 ml の培地を含む 100 ml 容フラスコにこれらの茎断片を 3 個当て移植し、側芽の原基を上にして水平に置床した。これを 25°C 暗所で 3 週間培養し、培養終了後次の式から塊茎形成率を算出し、塊茎形成活性を表示した。

$$\text{塊茎形成率} = \frac{\text{塊茎化または肥大した側芽数}}{\text{全側芽数}}$$

培養は特記しない限り改良 White 培地 (蔗糖は 2%) に各種の抽出物を添加し、7 分間加圧滅菌したものを用いた。既述のように (Fig. 9) 茎断片培養における塊茎形成率は、用いた親いもの齢の進行に伴い増加したが、還元態窒素の添加によりこれを抑制することができる (Fig. 11)。したがって本実験においては対照区の自発的塊茎形成を抑制し、添加物の塊茎形成活性を明確にするため、親いもの貯蔵月数に応じて培地の無機塩類組成

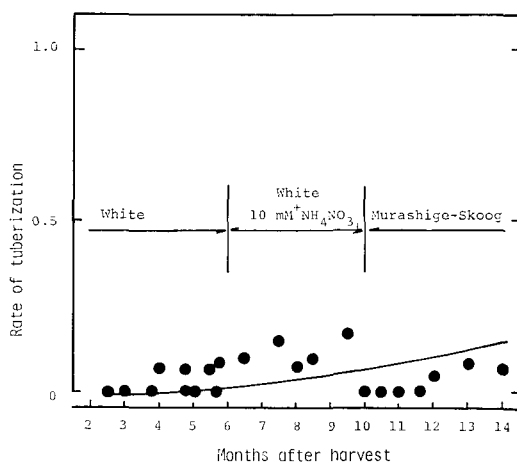


Fig. 50. Suppression of spontaneous tuberization on the single-node segments (Fig. 9) by changing mineral constituents in the medium.

を次のように変えた。すなわち貯蔵6カ月未満の塊茎を親いもとして用いた場合は改良 White 培地を基本培地として使用し、6~10カ月のものにはこの培地に10 mM 硝酸アンモニウムを添加した。また貯蔵10~14カ月のものは Murashige-Skoog 培地⁷⁷⁾の無機塩類(窒素60 mM, うち還元態20.6 mM)を White 培地の無機塩類に替えて用いた。この際の対照区の塊茎形成率の変動を Fig. 50 に示したが、これによれば Fig. 9 でみられたような自発的塊茎形成は抑制され、塊茎の貯蔵月数の如何にかかわらず塊茎形成活性の実質的検出が可能となった。

2. 実験結果

1) 塊茎形成活性の検出

パレイシヨ葉身と、葉柄を含む茎の EtOH 抽出物をそれぞれ減圧濃縮し EtOH を除去後、等量の酢酸エチルで3回振盪抽出し、酢酸エチル可溶性分画と水溶性分画に分けた。この両分画中の塊茎形成活性を測定したところ、葉身の両分画には強い活性が存在することが判明した (Table 4)。これに対して葉柄および茎の水溶性分画には全く活性は検出されず、また酢酸エチル可溶性分画の活性も少なかった。

Table 4. Comparison of the tuber-inducing activities in leaf blades, and in petioles and stems of potato plants. Concentration of the extract in the assay medium was 10 g fresh weight equivalent/20 ml

Position	Rate of tuberization	
	Aqueous fraction	Ethyl acetate fraction
Leaf blades	0.55	0.44
Petioles and stems	0	0.25

2) 塊茎形成物質の検索

パレイシヨ葉身の EtOH 抽出物中には強い塊茎形成活性が存在することが判明したが、次にこれを各種の手法により分画し、TISの実体について検索をおこなった。

抽出物の濃度を変えて、酢酸エチル可溶性分画と水溶性分画の塊茎形成活性を比較したが (Fig. 51)、両分画共ほぼ等しい活性が検出され、この物質は酢酸エチルおよび水の両者に可溶性であることが明らかとなった。したがって以後の実験においては酢酸エチル抽出は行なわなかった。Fig. 52 に両分画の塊茎形成活性の程度の差

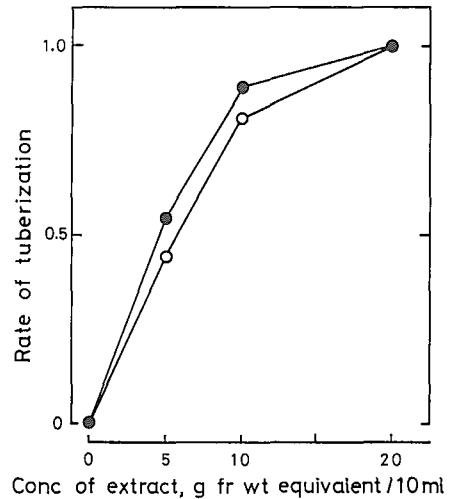


Fig. 51. Tuber-inducing activity in ethyl acetate (○) and aqueous (●) fractions obtained from potato leaves.

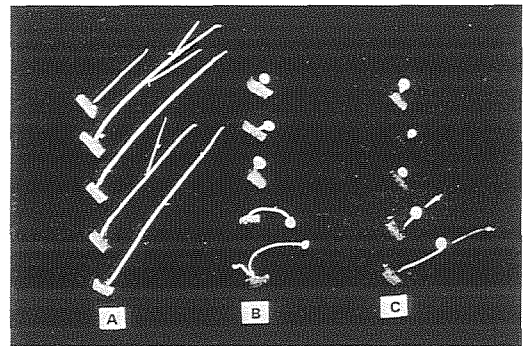


Fig. 52. Typical appearances of tubers induced by ethyl acetate (A) and aqueous (B) fractions obtained from potato leaves.

異を示す。

次に、陰イオン交換樹脂 [Dowex 1×4 (50-100メッシュ, OH⁻型)] および陽イオン交換樹脂 [Dowex 50 W×4 (50-100メッシュ, H⁺型)] に対するこの物質の挙動について検討した。前者を用いる場合は、抽出液を1N NaOHでpH 10.5に調整し樹脂カラムに通し、カラムを十分に水洗後3Nギ酸で樹脂吸着物を溶出した。後者を用いる場合は抽出液を1N HClでpH 2.5とし、吸着物は3Nアンモニア水で溶出した。両樹脂カラムの流出分画と吸着分画の塊茎形成活性を測定した結果、陰イオン交換樹脂吸着分画と陽イオン交換樹脂流出分画に強い活性が認められた (Fig. 53)。したがって TIS は酸性物質であることが判明した。

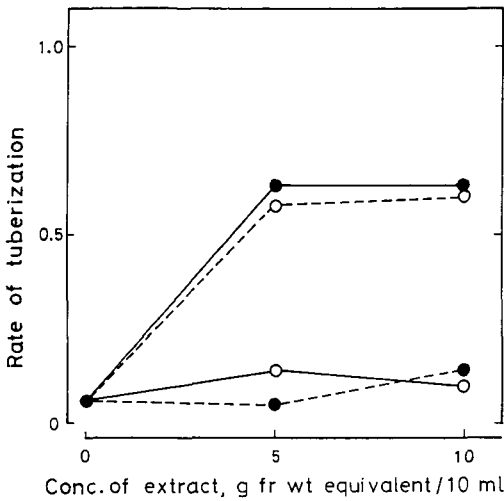


Fig. 53. Tuber-inducing activities in eluates (—) and effluents (---) from cation (Dowex 50 W, ○) and anion (Dowex 1, ●) exchange columns.

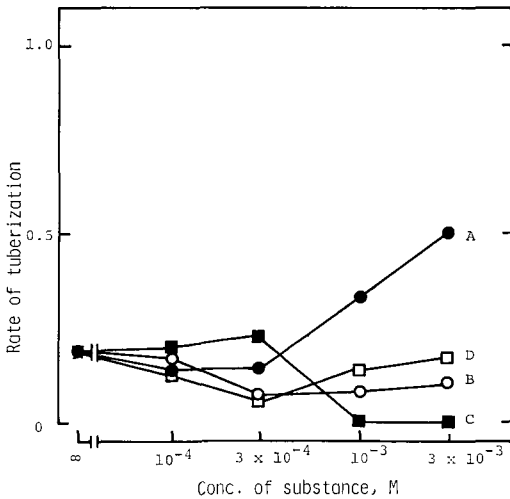


Fig. 54. Effects of acidic sugars on *in vitro* tuberization. A, D-galacturonic acid; B, D-glucuronic acid; C, D-galactonolactone; D, D-gluconolactone.

高濃度蔗糖の塊茎形成誘起能については既に述べたが (Fig. 7), 本実験の結果より TIS は蔗糖とは無関係であることを確認した。しかし酸性糖が TIS である可能性は残されている。したがって次に塊茎形成に及ぼす酸性糖の影響について検討を加えた。Fig. 54 に示すように高濃度の D-ガラクトン酸はわずかな塊茎形成活性を示したが、D-グルクロン酸、D-ガラクトノラクトンお

よび D-グルコノラクトンにはいずれも塊茎形成促進効果は認められなかった。したがって酸性糖も TIS ではない。

陰イオン交換樹脂吸着分画中には、高粘性の不純物が共存するため、これを直接クロマトグラフィーに供することは困難であった。このため Amberlite XAD-2 樹脂を用いて高粘性物質の除去を試みた。Amberlite XAD-2 は疎水性基との親和性が高いため、水溶液から疎水性基を有する物質を選択的に吸着する樹脂である。したがって TIS が疎水性基を有するならばこの樹脂に吸着される。陰イオン交換樹脂吸着分画を濃縮した後 Amberlite 樹脂カラムに通した。このカラムをカラム容量の 4 倍量の 3N 硝酸で洗った後、樹脂吸着物を順次 20%、40% および 60% の EtOH で溶出し、各分画中の塊茎形成活性を測定した。その結果 20% EtOH 溶出区 (Am 20 区と略す) に最も強い活性がみられ、これに次いで 40% EtOH 溶出区 (Am 40 区) に活性の存在を確認した (Fig. 55)。カラム流出分画 (Am 0 区) にも若干の活性が検出されたが、共存する高粘性物質の大部分はこの分画に存在していた。したがって以後の実験では Am 0 区は捨て、50% EtOH で溶出した分画 (Am 20 区および Am 40 区と、Am 60 区の一部を含む) を、さらに分離操作に供した。

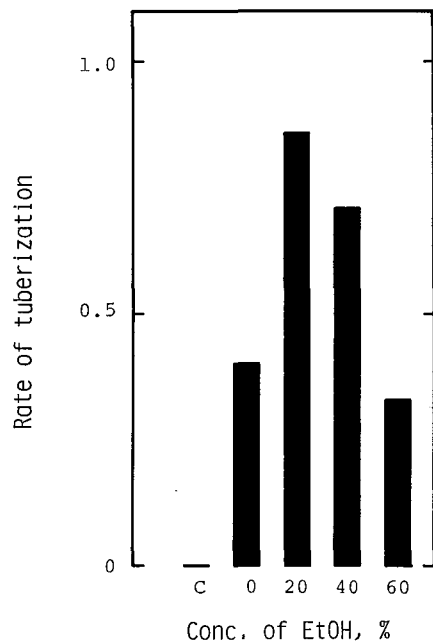


Fig. 55. Fractionation of the tuber-inducing substance by Amberlite XAD-2 column.

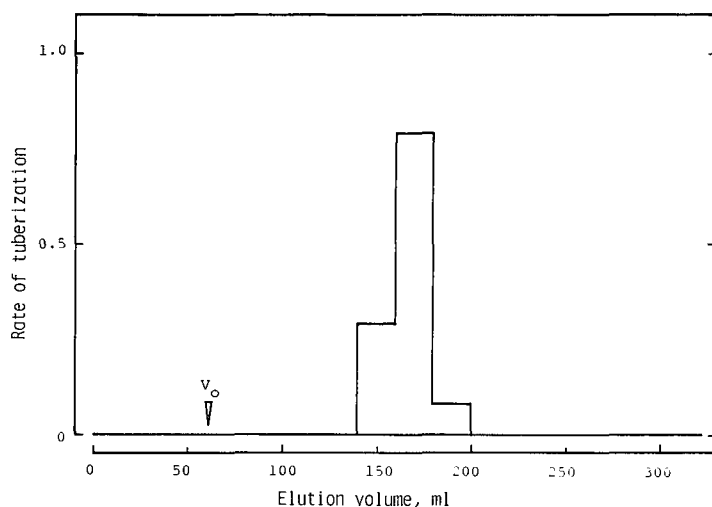


Fig. 56. Fractionation of the tuber-inducing substance by Sephadex LH-20 column with 80% EtOH.

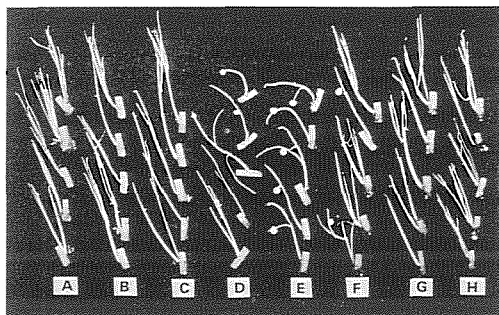


Fig. 57. Appearances of tubers induced by the tuber-inducing substance obtained by Sephadex LH-20 column chromatography. A, control; B, elution volume 60-120 ml; C, 120-140 ml; D, 140-160 ml; E, 160-180 ml; F, 180-200 ml; G, 200-220 ml; H, 220-300 ml.

次に Am 50 分画を Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィーを用いて分画した。生重 1 kg に相当する Am 50 分画を可能な限り濃縮して容量を減じた後、80% EtOH を加えて 10 ml に定容した。これを 80% EtOH を溶媒として 2.6×40 cm の Sephadex LH-20 カラムに流速 40 ml/時で通し、カラムからの流出液は 10 ml ずつ分取した。これらの分画の一部を取って濃縮乾固し、塊茎形成活性を測定した。その結果 140~200 ml でカラムから溶出した分画に塊茎形成活性が認められ、特に 160~180 ml の分画に顕著な活性の存在が確認された (Figs. 56, 57)。

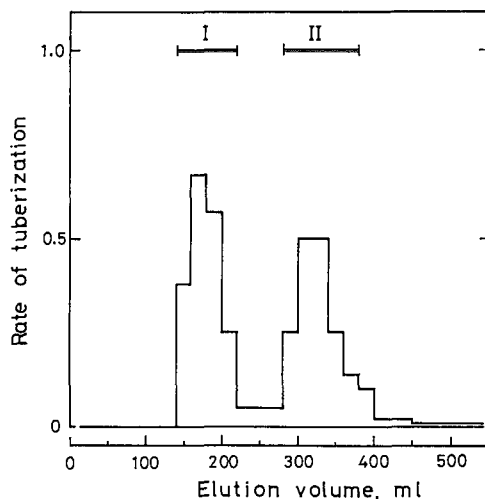


Fig. 58. Fractionation of the tuber-inducing substance by cellulose column with isopropanol : formic acid : water (10 : 1 : 1, v/v). Active fractions eluted 140-210 ml and 290-350 ml were designated as factor I and II respectively.

この 140~200 ml の分画をセルロースカラムクロマトグラフィーによりさらに分画した。濃縮乾固した活性分画を少量の溶媒 (イソプロパノール : ギ酸 : 水, 10 : 1 : 1 v/v) に再溶し、同溶媒を用いてセルロースカラム (東洋セルロース粉末 C, 2.4×36 cm) に流速 4 ml/分 で通した。カラムからの流出物は 10 ml ずつ分取し活性を測定

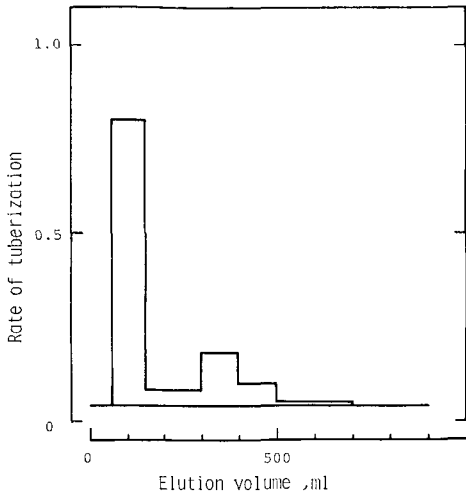


Fig. 59. Fractionation of factor I by silicagel column with chloroform : MeOH : formic acid (9:1:1, v/v).

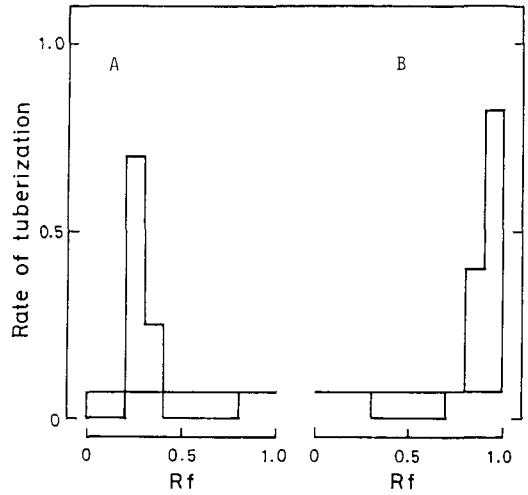


Fig. 61. Separation of tuber-inducing substances by silicagel TLC. A, factor II; B, factor I.

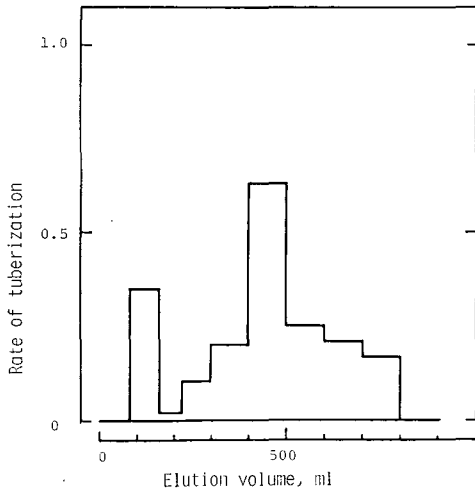


Fig. 60. Fractionation of factor II by silicagel column with chloroform : MeOH : formic acid (9:1:1, v/v).

した。その結果、活性は明瞭な2つのピークに分離した (Fig. 58)。これらを溶出順に factor I および II と名付けた。Factor I は比較的極性が低く、酢酸エチルに容易に溶解した。一方 factor II は酢酸エチルに対しては難溶性で、水溶性を示した。したがって当初この物質は両者に可溶性であるとしたが、これは活性物質が単一なものであると誤って仮定したためであった。

次にこの2種の活性分画をそれぞれクロロホルム：

Table 5. Hydrolysis of factor II with 2M HCl for 1 h at 100°C

Hydrolysis	Rate of tuberization* (10 g fresh weight equivalent/ 10 ml medium)	
	Aqueous fraction	Ethyl acetate fraction
-	0.31	0.08
+	0	0.36

* control=0

MeOH:キ酸 (9:1:1v/v) を溶媒としてシリカゲルカラム (球状シリカゲル CQ-3, 2.4×36 cm) に流速 4 ml/分 で通し、分画した。その結果 factor I と factor II は相互に若干混在することが明らかとなった (Figs. 59, 60)。

このシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分画した factor I および II をそれぞれ同溶媒を用いてシリカゲル薄層クロマトグラフィーに供した。その結果、factor I および II はそれぞれ単一の活性ピークを示した (Fig. 61)。したがってパレイシヨ葉に含まれる塊茎形成物質は2種類であることを確認した。

また両者を展開した薄層プレートをトランスイルミネーター (254 nm) にかけた結果、活性部位に紫外外部吸光は認められなかった。

水溶性である factor II は配糖体であり factor I はそのアグリコンである可能性が考えられ、この点を明らかにするため factor II を 2N HCl で 100°C 1 時間処理

した。処理後溶液を中和し、等量の酢酸エチルで3回抽出し、酢酸エチル可溶性分画と水溶性分画に分けそれぞれの塊茎形成活性を測定した。Table 5 に示すように加水分解処理前の factor II は水溶性であり酢酸エチルには難溶性であったが、加水分解により酢酸エチル可溶性となった。この結果は期待通り factor II は配糖体であり factor I はそのアグリコンであることを示唆している。

3) 生育および塊茎の貯蔵に伴う塊茎形成物質の活性変動

以上述べた結果から、バレイシヨ葉身には塊茎形成促進物質が存在することを確認したが、次にバレイシヨの生育および塊茎の貯蔵に伴うこの物質の活性変動に関し検討を加えた。

前述の方法で各材料から陰イオン交換樹脂吸着分画を得た。塊茎形成を阻害する GA を除去するため、この分画を等量の酢酸エチルで2回洗浄 (pH 3.0) した後、塊茎形成活性の測定に供した。

まず圃場で育成したバレイシヨ葉身の塊茎形成活性の変動について調べた (Fig. 62)。圃場に播種したバレイシヨは30日目頃より塊茎形成を開始するが、塊茎形成活性は15日目から増加し始め、以後連続的に増加した。

次に人工気象器を用いて、バレイシヨを塊茎誘導条件と非誘導条件で栽培し、葉中の塊茎形成活性の変動を比較した。塊茎誘導条件下では活性は継続して増加した

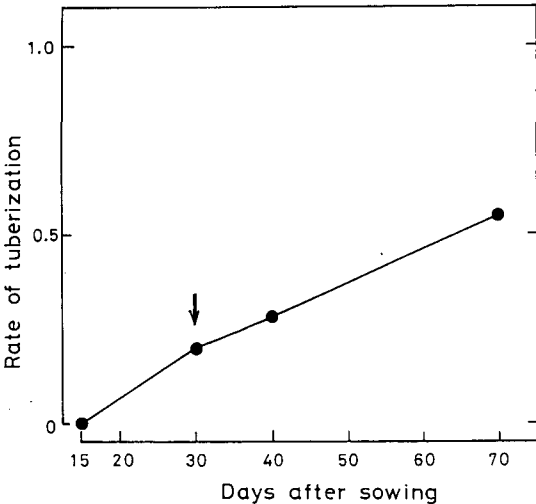


Fig. 62. Changes in the tuber-inducing activity in potato leaves during the growth of the plants. Arrow means the commencement of tuberization on the plants.

が、非誘導条件下では活性は少なく経時的な増加も認められなかった (Fig. 63)。

齢の進行した塊茎を親いもとして用いると環境要因の如何にかかわらず塊茎を形成するが、これは親いも内で TIS が生成、集積するためであると考えられている⁷⁶⁾。

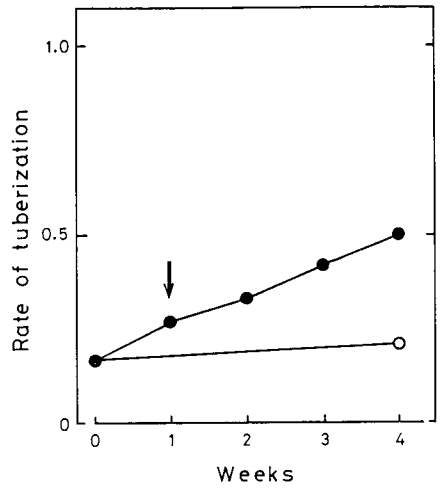


Fig. 63. Changes in the tuber-inducing activity in potato leaves under the tuber-inducing (●) and non-inducing (○) conditions. Arrow means the same as in Fig. 62.

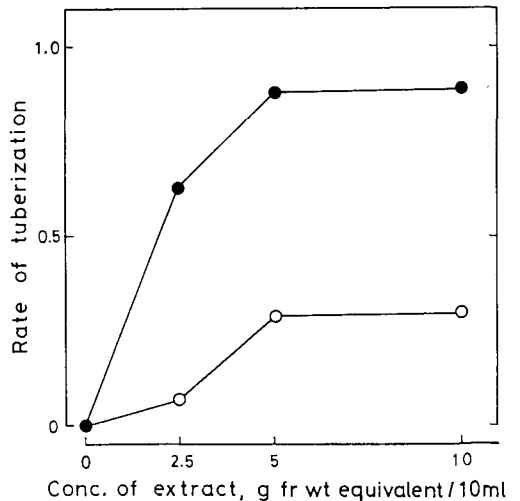


Fig. 64. Comparison of the tuber-inducing activities in old (● stored for 14 months at 4°C) and young (○, stored for 4 months) tubers.

そこで貯蔵4カ月の若齢塊茎と14カ月の老化塊茎を用いて両者に含まれる塊茎形成活性を比較した。その結果、若齢塊茎に含まれる活性は低く、老化塊茎の活性は高いことが判明した (Fig. 64)。老化塊茎内にも酢酸エチル可溶性と水溶性の2種の活性が存在した。

4) 塊茎形成物質の抗ジベレリン作用

GAは塊茎形成の抑制要因であるが、この塊茎形成物質の抗GA作用について葉身より得たAm50分画を用いて検討した。10⁻⁷M GA₃添加による塊茎形成抑制効果はAm50分画の添加により消失した (Fig. 65)。

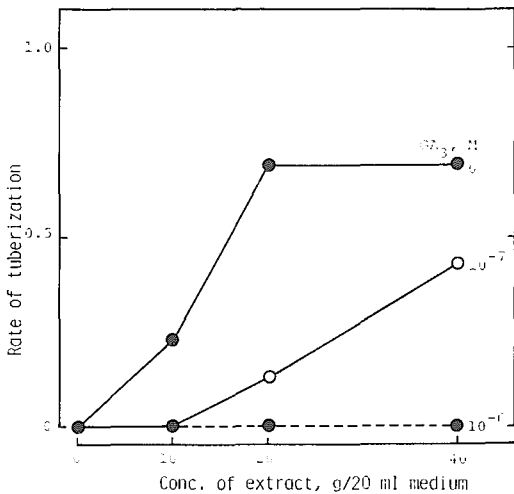


Fig. 65. Antagonism between GA₃ and the tuber-inducing substance on tuberization.

5) 塊茎形成物質の *andigena* 種に対する作用

Andigena 種は塊茎形成の短日要求性がきわめて高いが、これは塊茎形成の誘導のためには高濃度の TIS が必要であることを示唆している。Am50分画を種々の濃度で *andigena* (v. W 553-4) 種の茎断片培養に添加し、塊茎形成活性を調べた。

培養開始後3週目では全濃度を通じて塊茎形成は認められなかった。しかし5週目に至ると、抽出物濃度が20 g/10 ml 以上の高濃度区において塊茎が形成された。したがってこの塊茎形成物質は *andigena* 種の塊茎形成にも有効であることが判明した。

6) 塊茎の形成形態に及ぼす塊茎形成物質濃度の影響

EWING²⁸⁾によれば、塊茎形成刺激の強弱が塊茎の形成形態に影響を及ぼす。すなわち最も強く誘導された場合は無柄塊茎を生じ、中程度の誘導では伸長した匍枝の

先端が塊茎化し、誘導刺激が弱い場合は匍枝の伸長が続く。次にこのような形態的相異が、この塊茎形成物質の濃度により生ずるか否かについて検討した。Fig. 66 に示すように EWING の指摘と同様に、この物質の濃度差は形態的相異をきたし、高濃度添加区では無柄に近い塊茎が形成された。またこの物質の濃度の増加は側芽の横地性を誘起した。したがってこの物質は横地性の発現と維持にも役割を果しているものと思われる。

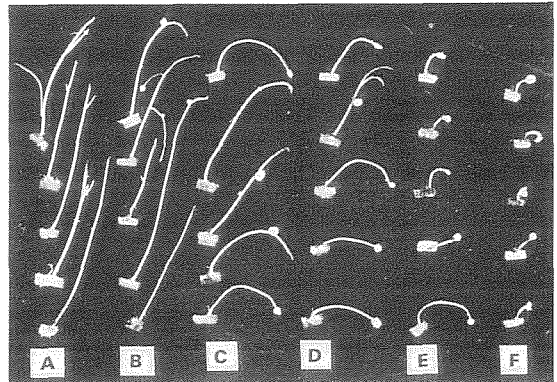


Fig. 66. Effect of various concentrations of the leaf extract on the appearance of the tubers formed on the single-node segments. Concentrations in the medium (g fresh equivalent/10 ml medium) were; A, control; B, 5 g; C, 10 g; D, 20 g; E, 30; F, 40 g.

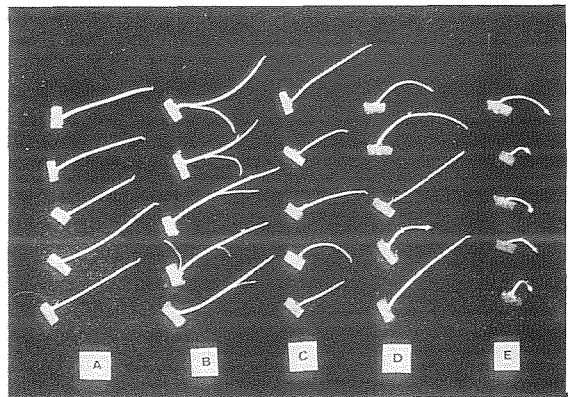


Fig. 67. Effects of ZR and ABA on the tuberization. A, control; B, 10⁻⁵ M ZR; C, 10⁻⁵ M ABA; D, ZR and ABA (10⁻⁵ M respectively); E, the leaf extract (10 g fresh equivalent/10 ml). The single-node segments were cultured for 2 weeks.

7) 塊茎形成物質と ABA および ZR との関連性

Fig. 53 に示したように塊茎形成物質は酸性物質であり、サイトカイニン類とは無関係であることは明白である。Factor I のクロマトグラム上での Rf 値は ABA と若干類似しているが、factor I は紫外部吸光をもたないことから ABA とは考えられない。10⁻⁵ M の ZR および ABA とこの factor I を茎断片培養に添加し 2 週間培養を行ない、それぞれが側芽生育に及ぼす影響を比較した (Fig. 67)。ZR は側芽の分枝を促進し、ABA は側芽の伸長を若干阻害したが、両者共塊茎形成を全く誘起しなかった。この両者を同時に添加した場合はわずかな塊茎形成が認められた。これに対し、factor I には著しい塊茎形成促進効果が認められた。

以上のことから、この塊茎形成物質は既知の植物生長物質とは異なるものであることが明らかとなった。

3. 考 察

塊茎を有するバレイショの葉身および老化塊茎中には茎断片培養において顕著な塊茎形成効果を示す factor I と II の 2 種の物質が存在することを確認した。このうち水溶性を示す factor II は factor I の誘導体であると考えられる。また両者は酸性物質であり、既知の植物生長物質とは全く異なったものであると思われる。

これらの物質の葉身中の活性は高く、葉柄および茎の活性は低かった (Table 4)。また葉身中の活性は圃場においては継時的な増加を示した (Fig. 62)。人工気象器栽培の場合は塊茎誘導条件下では経時的な増加を示したが、塊茎非誘導条件下では一定に推移した (Fig. 63)。これらの結果は、factor I および II は環境要因に応じて葉中で形成されることを示唆している。

他方、塊茎中のこれらの物質の含量はその齢の進行に伴って増加を示した (Fig. 64)。貯蔵期間が 14 カ月を超えた老化塊茎では容易に芽いもが形成されまたこれを親いもとした栽培実験では環境要因に依存せず塊茎が形成されたが (Fig. 6)、この物質の親いも内の蓄積がそれらの原因と考えられる。

この物質の濃度を変えることにより形成された塊茎の形態が変化した (Fig. 66)、この変化は EWING²⁸⁾ が指摘したような塊茎誘導刺激の程度による形成塊茎の形態的相異と酷似していた。またこの物質は抗 GA 作用を有し (Fig. 65)、さらに *andigena* 種の塊茎形成をも誘起した。これらの事実を考慮すると、この物質が GREGORY²⁶⁾ が仮想した塊茎形成物質であり、直接的な塊茎形成因子であると思われる。また OKAZAWA と CHAPMAN⁸⁵⁾ の主張のように、TIS/GA 比率が塊茎形

成の決定要因であると考えられる。

第9章 総合考察

バレイショの塊茎形成は環境要因の影響を強く受け、短日条件下で最も促進される。日長を感じて形態的变化を引き起こすという点において、塊茎形成は花芽形成と類似している。しかし塊茎形成は生長の質的転換、すなわち伸長生長から肥大生長への転換であり、器官分化を伴う花芽形成とは異なっている。花芽形成における日長刺激の受容部位は葉であり、そこで未知の花成ホルモン (florigen) が形成され頂芽部へ送られ花芽分化を誘起すると考えられている。塊茎形成の場合も同様に刺激を受けた葉は TIS を生成し、これが地下部へ伝達されて塊茎形成を誘起するとされている^{17,30,36,61)}。Florigen の場合と同様に TIS の作用は種々の植物生長物質、例えば GA やサイトカイニンの影響を受けるためその実体の把握は困難であった。しかし本研究により、TIS の存在が明確となり、その分離同定が可能となった。

従来の知見に本研究の成果を加えてバレイショの塊茎形成機構をその進行の過程にしたがって考慮すると以下のようになる。

(1) 匍枝の発生と伸長

匍枝は主茎の基部に近い節から順次発生するが、主茎に沿ったオーキシン濃度は基部に向かって減少し¹¹⁷⁾、また根端で生成されるサイトカイニン^{52,54,107)}の濃度は逆に増加する。基部に近い節における低オーキシンと高サイトカイニンが匍枝発生の主要因と考えられる。匍枝は横地性を示すが、この発現にはエチレンと TIS の関与が考えられる。エチレンは塊茎形成には全く影響しなかったが、側芽の横地性を誘起した (Fig. 27)。また TIS は横地性のみならず塊茎形成をも誘起した (Fig. 66)。匍枝発生期の葉中の TIS 濃度は低いことを考慮すると (Fig. 62)、発生期の匍枝の横地性はエチレンに起因し、その維持に TIS が関与すると考えるのが最も妥当である。エチレンは種々の植物において上扁生長 (epinasty) を引き起こす²¹⁾。またエチレン処理は黄化エンドウの芽生えなどの背地性を消去させるが、その原因としてエチレンによるオーキシンの向基的移動の攪乱が考えられている¹⁵⁾。したがって匍枝の横地性もオーキシンの移動阻害を介している可能性がある。

サイトカイニンは匍枝の横地性を消去させるが⁶⁰⁾塊茎形成の開始に伴う旺盛な細胞分裂のためにはある程度のサイトカイニンを匍枝先端部に蓄積する必要がある。この相反する要求を満たすために根端や親いもから匍枝

に転送されたリポソド型のサイトカイニンは貯蔵型(リポソド型)に変換し、匍枝先端部に集積するものと解される(Figs. 36, 37)。

(2) 匍枝次頂部の肥大に伴う塊茎形成

長日高夜温下で伸長を続ける匍枝は、短日低夜温条件ではその伸長を停止し、肥大を開始する。匍枝の伸長停止の第一要因としては、葉中のGA含量の減少が挙げられる^{83,96}この減少が地下部へ波及し、匍枝のGA含量が減少する(Fig. 17)。また葉中のTISの増加(Figs. 62, 63)、およびこの時期から増加を開始するABA(Fig. 20)もこの伸長停止に関与している。

葉中で増加したTISは植物体各部へ転送され、匍枝次頂部ではその肥大を誘起する。匍枝の塊茎化の時期は、TISとGAのバランスにより決定される。TIS/GA比率が低い場合、匍枝は伸長を続け、この比率の増加により塊茎化が起こる。さらにこの増加は無柄塊茎形成の要因となる(Fig. 66)。このTIS/GA比率と塊茎形成との関係をFig. 68に示す。また塊茎の生育中に高温に遭遇すると、この比率が一時的に低下し塊茎の二次生長をきたす。

匍枝肥大の第一段階は細胞の肥大によるが、この時期にはIAAが一時的に増加し(Fig. 18)、細胞壁の軟化を介して細胞肥大を補助的に促進する。

匍枝先端部に一時蓄積したリポソド型のサイトカイニンは匍枝の肥大に伴ってリポソド型へと変換し(Fig. 37)、肥大の第二段階の旺盛な細胞分裂を伴う肥大生長を誘起する。この時期のIAA濃度は比較的高く、細胞分裂を補助している。

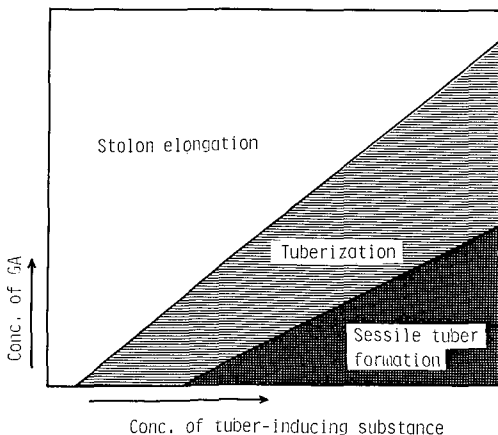


Fig. 68. Diagrammatic representation of antagonistic effect of the tuber-inducing substance and GA on the tuberization.

この時期からは澱粉粒の蓄積が活発化するが、澱粉粒は細胞分裂に何らの影響も与えない¹³。匍枝先端部のフック組織は次頂部の肥大によって次第に伸張し、やがて肥大部に取り込まれる。肥大部は側芽も含有しつつ巨大化していく。

体内TIS濃度は増加を続け(Figs. 62, 63)、頂芽部の生育停止をもたらす。

(3) 塊茎の完熟と休眠芽の形成

生重200g以上の大型塊茎の生長は、細胞肥大に依存すると言われている⁹⁵。

肥大部に位置する頂芽および側芽はやがて休眠状態に入る。この休眠芽の形成には、匍枝の肥大開始以来急増を続けたABA(Fig. 20)の直接的関与が挙げられる。

塊茎の休眠に伴い、塊茎内のリポソド型サイトカイニンは貯蔵型であるリポソド型へ転換する(Fig. 46)。

塊茎形成の直接的要因はTISであることが明らかとなったが、同時にサイトカイニンも塊茎の形成と生育に重大な影響を与えている。パレイショの内生サイトカイニンは生育の転換各期に量的・質的な明瞭な変動を示した(Fig. 46)。すなわち塊茎の萌芽に続く匍枝の発生と新塊茎の形成に伴い、塊茎内のリポソド型サイトカイニンは減少し(Fig. 35)、これと期を同じくして葉身のそれも減少を示した(Figs. 48, 49)。これは活発な細胞分裂を伴う新塊茎へ充分量のサイトカイニンを供給するために、体内に分配されていたサイトカイニンが新塊茎に再分配されたことを示唆している。親いもは次世代の生長に必要な栄養貯蔵器官としてのみならず、サイトカイニンの貯蔵器官としても機能していると考えられる。

リポソド型からリポソド型へのサイトカイニンの質的転換が匍枝の肥大時と塊茎の休眠終了時に観察され(Fig. 46)、またこれとは逆の転換が塊茎完熟時の葉身において認められた(Fig. 49)。これらの結果は活性型のリポソド型が不要な時、あるいは過剰となった時に貯蔵型に転換する調節機構が存在することを示唆している。この機構にはアデノシンキナーゼ¹⁸およびホスファターゼの関与が考えられる。

本研究により、パレイショの塊茎形成はTISにより誘起されることが判明したが、このTISによる細胞肥大誘起の機作については未だ不明である。細胞の伸長方向は細胞壁最内層のマイクロフィブリルの走向方向によって決定され³⁵、またこの走向方向は細胞質外層に分布するマイクロチューブの配列方向により調節されるものと考えられている^{37,44,79}。SHIBAOKA¹⁰⁶はGA処

理によるアズキ上胚軸の表皮細胞の伸長に際して、マイクロチューブスが長軸方向に対し直角に配列することを観察している。またタマネギの鱗茎の形成は細胞分裂ではなく単にその肥大に由来すると言われているが⁴⁰⁾この肥大開始に当りマイクロチューブスの走向方向の変動が認められている。すなわち、肥大開始前は長軸に対し直角であるが、肥大開始と共に次第に特定の方向性を失い、やがて完全に消失する⁷⁴⁾。バレイショにおいても細胞壁合成阻害作用を有するクマリン¹¹⁶⁾処理は匍枝肥大を誘起することが知られている¹¹⁵⁾。これらの事実を考慮すると、TISは細胞壁合成やマイクロチューブスの配列方向に何らかの直接作用を及ぼし、その結果匍枝肥大が誘起されるものと推察される。

バレイショ品種の早晩性と短日要求性には密接な関連があり、早生種ほど短日要求性が低いことが知られている²⁹⁾。これは早生種の環境依存性が低く、TISの生成が容易なことを示している。事実、早生種の「男しゃくいも」の葉身内のTISの増加は速やかである(Fig. 62)。また塊茎内のTISも継続的に増加蓄積し、これが環境要因に依存しない塊茎形成(Fig. 6)の原因となるものと思われる。一方、*andigena*種は晩生でありTIS生成の短日依存度は高く、その生成速度も遅いものと考えられる。しかし*andigena*種の圃場栽培の植物体および黄化徒長茎は共に節間が長く、またTISに対する反応も鈍感であった。これらの点を考慮すると*andigena*種のGA含量は高いと推察され、これがTIS/GA比率を低下させ晩生の原因となっている可能性がある。

本研究の結果、バレイショ塊茎形成の決定要因はTIS/GA比率であり、その後の塊茎生育はサイトカイニンにより促進されることが判明した。TIS/GA比率が高い場合、塊茎形成の誘起のみならず地上部の生育停止もきたす。したがって栽培初期におけるこの比率の上昇は草丈の低下をきたし、これが最終的に収量の低下をもたらす。したがって高収量を得るためには、この比率が生育期前半においては低く推移し、その後地上部が十分に繁茂した生育後期に上昇することが望ましい。また根端におけるサイトカイニンの生成能が高い品種程、高収量が得られるものと推察される。今後TISの分離精製とその構造決定により、塊茎形成の人為的制御が可能となり、増収に資することが期待される。

摘 要

バレイショ塊茎形成を誘起する直接要因を究明すると共に、塊茎の形成および生育に及ぼす植物生長物質の影

響について検討した。

1. 人工気象器を用いて、品種「男しゃくいも」の塊茎形成に及ぼす環境要因の影響を調べた。塊茎形成は短日条件(12時間日長)により最も促進され、低低温条件はこれに次ぐ促進要因であった。この塊茎形成の環境要因に対する依存性は親いもの齡(貯蔵期間)により異なり、齡が進行するとその依存性を失い、環境要因の如何にかかわらず塊茎形成をきたした。

2. 茎断片培養を用いて塊茎形成に及ぼす環境要因および栄養要因の影響について検討した。培養温度は塊茎形成に顕著な影響を及ぼし、10°Cでは強い塊茎誘導効果が認められたが、30°Cでは塊茎は形成されなかった。25°Cでは培地の蔗糖濃度に応じた塊茎形成が認められた。

3. 塊茎形成に伴う匍枝の内生長物質含量の変動と匍枝の形態的变化との関連性について調べた。塊茎は匍枝次頂部の肥大によって形成されるが、初期の肥大は細胞肥大に起因し、その後細胞分裂が活発化する。GA様物質含量は匍枝の肥大開始と同時に急減し、以後非常に低い値を維持した。オーキシン含量の変動は全体としてわずかであったが、細胞肥大による匍枝肥大期において極大値を示した。一方ButOH可溶性サイトカイニン(主にZR)の含量は匍枝肥大に伴ってわずかに増加し、細胞分裂の活発化と共に急増をみせ、塊茎化完了に伴ってわずかに減少した。ABA様物質の含量は、肥大開始に伴って増加し始め以後塊茎化完了まで急増を続けた。

4. 塊茎形成に及ぼす植物生長物質の影響について茎断片培養を用いて追求した。ZRは2%蔗糖との組み合わせでは全く塊茎形成促進効果を示さず、側芽の分枝のみ促進した。しかし高濃度蔗糖(4%以上)を添加するとZRによる塊茎形成促進がみられ、同時に形成塊茎の生重量増加も認められた。ABAは低濃度蔗糖(2%)下では側芽の伸長を抑制し、側芽次頂部のわずかな肥大を誘起したが、完全な塊茎化はきたさなかった。また高濃度蔗糖(8%)により誘起された塊茎形成を阻害した。GA₃は塊茎形成を強く阻害し、エチレンは側芽の横地性を誘起したが塊茎化はきたさなかった。

5. 老化塊茎から得た茎断片は2%蔗糖下でも容易に塊茎化したのに対し、若齡塊茎から得た茎断片は全く塊茎化しなかった。したがってこの両者の内生長物質含量を比較した。GA含量は明らかに若齡塊茎から得た茎断片で高かった。しかしサイトカイニンおよびABA含量に差異は認められなかった。

6. 葉身のサイトカイニン含量の変動と塊茎形成との

関連性について検討した。塊茎誘導条件(短日低夜温)では塊茎形成に先行して葉身のサイトカイニン含量は減少した。塊茎非誘導条件(長日高夜温)では塊茎は形成されず、また葉身サイトカイニンの変動も認められなかった。

7. 以上の結果の総合により、既知の植物生長物質はいずれも直接的な塊茎形成誘起要因ではないことが明らかにされた。GAの減少は塊茎形成の必要条件であり、サイトカイニンは塊茎生育の促進因子であると考えられる。ABAは匍枝の伸長停止と休眠芽の誘導に関与しているものと考えられる。

8. サイトカイニンは塊茎生育の促進因子であることが判明したため、次に塊茎一代におけるサイトカイニンの量的・質的変動を調べた。塊茎の主要サイトカイニンはZRであり、その他にZ、ZグルコシドおよびZリポチド等が検出された。水溶性のZリポチドとButOH可溶性のZRとの間の相互変換が、生育の主要な変動期に認められた。すなわち匍枝の肥大時にはZリポチドの急減とZRの急増がみられ、また塊茎の休眠に伴いこれとは逆の変換がみられた。また塊茎の休眠終了に際しては再びZリポチドの減少とZRの増加が認められた。これはZリポチドは貯蔵型であり、この相互変換によって活性型であるZRの量が調節されていることを示している。次世代の塊茎形成が開始されると親も中のサイトカイニンは急減したが、これは親もは次世代の塊茎形成のためのサイトカイニン供給源としても機能していることを示している。

9. GREGORY³⁶⁾は塊茎形成を直接的に誘起する特異的な塊茎形成物質(TIS)の存在を予測したが、次にこの物質の存否に関して検討を加えた。この物質の活性の検出は茎断片培養(培地の蔗糖濃度は2%に限定)により行なった。その結果、塊茎を有する植物体の葉身には塊茎形成を強く誘起する物質が存在することが明らかとなった。この物質は酸性物質であり、各種のクロマトグラフィーにより水溶性物質と酢酸エチル可溶性物質の2種であることが判明した。水溶性物質は配糖体であり、酢酸エチル可溶性物質はそのアグリコンであると考えられる。

葉中のこの物質の活性は塊茎誘導条件では増加を示したが、非誘導条件では変動しなかった。また塊茎中のこの物質はその齢の進行に伴って増加した。この物質は抗GA作用を有し、*andigena*種の塊茎形成にも有効であることを考慮するとこの物質がTISであり、直接的な塊茎形成誘起因子であると考えられる。

10. 以上の結果を総合すると、バレイショの塊茎形成

の決定要因はTIS/GA比率であり、その比の増加によって塊茎形成が開始されると言える。サイトカイニンは塊茎の生育促進要因であり、ABAはその伸長抑制作用により塊茎の維持に働くと共に休眠芽を誘導する。

引用文献

1. ABUDULLAH, Z-N. and AHAMAD, R.: Effect of ABA and GA₃ on tuberization and some chemical constituents of potato. *Plant and Cell Physiol.* **21**: 1343-1346. 1980
2. ADAMS, D. O. and YANG, S. F.: Ethylene biosynthesis: identification of l-aminocyclopropane-l-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* **76**: 170-174. 1979
3. APPLMAN, C. O.: Biochemical and physiological study of the rest period in the tubers of *Solanum tuberosum*. *Bot. Gaz.* **61**: 265-294. 1916
4. ARMSTRONG, D. J., BURROWS, W. J., EVANS, P. K. and SKOOG, F.: Isolation of cytokinins from tRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **37**: 451-456. 1969
5. ARTECA, R. N., POOVAIAH, B. W. and SMITH, O. E.: Changes in carbon fixation, tuberization, and growth induced by CO₂ applications in the root zone of potato plants. *Science* **205**: 1279-1280. 1979
6. ARTHUR, J. M., GUTHERIE, J. D. and NEWELL, J. M.: Some effects of artificial climates on the growth and chemical composition of plants. *Amer. J. Bot.* **17**: 416-482. 1930
7. ARTSCHWAGER, E.: Studies on the potato tuber. *J. Agric. Res.* **17**: 809-835. 1924
8. BIRAN, I., GUR, I. and HALVEY, A. H.: The relationship between exogenous growth inhibitors and endogenous levels of ethylene, and tuberization of dahlias. *Physiol. Plant.* **27**: 226-230. 1972
9. BLUMENFELD, A. and GAZIT, S.: Interaction of kinetin and abscisic acid in the growth of soybean callus. *Plant Physiol.* **45**: 535-536. 1970
10. BOOTH, A.: The role of growth substances in development of stolons. *In* The Growth of the Potato. (Eds. J. D. IVINS and F. L. MILTHORPE) Butterworths, London. 1963
11. BOOTH, A. and LOVELL, P. H.: The effect of pretreatment with gibberellic acid on the distribution of photosynthate in intact and dis-

- budded plants of *Solanum tuberosum* L. New Phytol. **71**: 795-804. 1972
12. BORCHERT, R. and MCCHESENEY, J. D.: Time course and localization of DNA synthesis during wound healing of potato tuber tissue. Develop. Biol. **35**: 293-301. 1973
 13. BRADBURY, D.: Division of starch-containing cells. Amer. J. Bot. **40**: 286-288. 1953
 14. BROWN, N. A. C. and VAN STADEN, J.: The effect of stratification of the endogenous cytokinin level of seed of *Protea compacta* and *Leucadendron daphnoides*. Physiol. Plant. **28**: 388-392. 1973
 15. BURG, S. P. and BURG, E. A.: The interaction between auxin and ethylene and its role in plant growth. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. **55**: 262-269. 1966
 16. BURT, R. L.: Influence of short periods of low temperature on tuber initiation in the potato. Eur. Potato J. **7**: 197-208. 1964
 17. CHAPMAN, H. W.: Tuberization in the potato plant. Physiol. Plant. **11**: 215-224. 1958
 18. CHEN, C-M. and ECKERT, R. L.: Phosphorylation of cytokinin by adenosine kinase from wheat germ. Plant Physiol. **59**: 443-447. 1977
 19. CLAVER, F. K.: The effects of abscisic acid on tuberization of potato sprouts *in vitro*. Phyton **23**: 25-29. 1970
 20. CONRAD, K. and KÖHN, B.: Zunahme von Cytokinin und Auxin in verwundeted Speichergewebe von *Solanum tuberosum*. Phytochemistry **14**: 325-328. 1975
 21. CROCKER, W., ZIMMERMAN, P. W. and HITCHCOCK, A. E.: Ethylene-induced epinasty of leaves and the relation of gravity to it. Contrib. Boyce Thompson Inst. **4**: 177-218. 1932
 22. CUTTER, E. G.: Structure and development of potato plant. In The Potato Crop. (Ed. P. M. HARRIS) Chapman and Hall Press, London, p. 70-125. 1978
 23. DIMALLA, G. G. and VAN STADEN, J.: Effect of ethylene on the endogenous cytokinin and gibberellin levels in tuberizing potatoes. Plant Physiol. **60**: 218-221. 1977
 24. DYSON, P. W. and DIGBY, J.: Effects of calcium on sprout growth and sub-apical necrosis in Majestic potatoes. Potato Res. **18**: 290-305. 1975
 25. EINSET, J. and SKOOG, F. Biosynthesis of cytokinins in cytokinin-autotrophic tobacco callus. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., **70**: 658-660. 1973
 26. EL-ANTABLY, H. M. M., WAREING, P. F. and HILLMAN, J.: Some physiological responses to d. l-abscisic (dormin). Planta **79**: 74-90. 1967
 27. ENGELBRECHT, L. and BIELINSKA-CZARNECKA, M.: Increase of cytokinin activity in potato tubers near the end of dormancy. Biochem. Physiol. Pflanzen **163**: 499-504. 1972
 28. EWING, E. E.: Critical photoperiod for tuberization: a screening technique with potato cuttings. Amer. Potato J. **53**: 43-53. 1978
 29. EWING, E. E.: Heat stress and tuberization stimulus. Amer. Potato J. **58**: 31-49. 1981
 30. EWING, E. E. and WAREING, P. F.: Shoot, stolon, and tuber formation on potato (*Solanum tuberosum* L.) cuttings in response to photoperiod. Plant Physiol. **61**: 348-353. 1978
 31. FORSLINE, P. L. and LANGILLE, A. R.: Endogenous cytokinins in *Solanum tuberosum* as influenced by photoperiod and temperature. Physiol. Plant. **43**: 75-77. 1975
 32. FORSLINE, P. L. and LANGILLE, A. R.: An assesment of the modifying effect of kinetin on *in vitro* tuberization of induced and non-induced tissues of *Solanum tuberosum*. Can. J. Bot. **54**: 2513-1516. 1976
 33. GARNER, W. W. and ALLARD, H. A.: Further studies in photoperiodism, the responses of plant to relative length of day and night. J. Agric. Res. **23**: 871-920. 1923
 34. GRACIA-TORRES, L. and GOMEZ-CAMPO, C.: *In vitro* tuberization of potato sprouts as affected by ethrel and gibberellic acid. Potato Res. **16**: 73-79. 1973
 35. GREEN, P. B., ERICKSON, R. O. and RICHMOND, P. A.: On the physical basis of cell morphogenesis. Ann. N. Y. Acad. Sci. **175**: 712-731. 1970
 36. GREGORY, L.: Some factors for tuberization in the potato plant. Amer. J. Bot. **43**: 281-288. 1956
 37. GUNNING, B. E. S. and HARDHAM, A. R.: Microtubulus. Ann. Rev. Plant Physiol. **33**: 651-698. 1982
 38. HAMMES, P. S. and NEL, P. C.: Control mechanisms in the tuberization process. Potato Res. **18**: 262-272. 1975

39. HARMEY, M. A., GROWLEY, M. P. and CLINCH, P. E. M.: The effect of growth regulators on tuberization of cultured stem pieces of *Solanum tuberosum*. *Eur. Potato J.* **9**: 146-151. 1966
40. HEATH, O. V. S.: Formative effects of environmental factors as exemplified in the development of the onion plant. *Nature* **155**: 623-626. 1945
41. HEMBERG, T.: The significance of acid growth-inhibiting substance for the rest-period of the potato tuber. *Physiol. Plant.* **11**: 615-625. 1958
42. HEMBERG, T.: The action of some cytokinins on the rest-period and the content of acid growth-inhibiting substances in potato. *Physiol. Plant.* **23**: 850-858. 1970
43. HENSON, I. E. and WAREING, P. F.: Cytokinin in *Xanthium strumarium* L.: Distribution in the plant and production in the root system. *J. Exp. Bot.* **27**: 1268-1278. 1976
44. HEPLER, P. K. and PALEVITZ, B. A.: Microtubules and microfilaments. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **25**: 309-362. 1974
45. HEWETT, E. W. and WAREING, P. F.: Cytokinins in *Populus × robusta* Schneid.: A complex in leaves. *Planta* **112**: 225-233. 1973
46. HEWETT, E. W. and WAREING, P. F.: Cytokinins in *Populus × robusta*: Quantitative changes during development. *Physiol. Plant.* **29**: 386-389. 1973
47. HOAGLAND, D. R. and ARNON, D. I.: The water culture method for growing plants without soil. *Calif. Agric. Exp. Sta. Circular* **347**. 1950
48. IRITANI, W. M.: Factors affecting physiological aging (degeneration) of potato tubers used seed. *Amer. Potato J.* **45**: 111-116. 1968
49. JENSEN, W. A.: *Botanical Histochemistry*, W. H. Freedman Co. p. 78-94. 1942
50. KAHL, G.: Metabolism in plant storage tissue slices. *Bot. Rev.* **40**: 263-314. 1974
51. KODA, Y. and OKAZAWA, Y.: Cytokinins in growing potato tubers. *Japan. J. Crop. Sci.* **46**: 492-498. 1977
52. KODA, Y. and OKAZAWA, Y.: Cytokinin production by tomato root: Occurrence of cytokinins in staled medium of root culture. *Physiol. Plant.* **44**: 412-416. 1978
53. KODA, Y., HAGA, T. and OKAZAWA, Y.: A revised method of gibberellin assay by oat endosperm tissues. *J. Fac. Agric. Hokkaido Univ.* **59**: 254-261. 1979
54. KODA, Y. and OKAZAWA, Y.: Cytokinin production by asparagus shoot apex cultured *in vitro*. *Physiol. Plant.* **49**: 193-197. 1980
55. KODA, Y. and OKAZAWA, Y.: Cytokinin production by tomato root: nutritional and hormonal factors affecting the amount of cytokinin released from the root. *J. Fac. Agric. Hokkaido Univ.* **61**: 261-271. 1983
56. KRAUSS, A.: Tuberization and abscisic acid content in *Solanum tuberosum* as affected by nitrogen nutrition. *Potato Res.* **21**: 183-193. 1978
57. KRAUSS, A. and MARSCHNER, H.: Einfluss der Stickstoff ernährung der Kartoffeln auf Induktion und Wachstumsrate der Knille. *Z. Pflanzenern. Bondek.* **128**: 153-168. 1971
58. KRAUSS, A. and MARSCHNER, H. Einfluss von Stickstoffernährung und Wucksstoffapplikation auf die Knolleninduktion bei Kartoffelpflanzen. *Z. Pflanzenern. Bondek.* **139**: 143-155. 1976
59. KRAUSS, A. and MARSCHNER, H. Influence of nitrogen nutrition, daylength and temperature on contents of gibberellic and abscisic acid and on tuberization in potato plants. *Potato Res.* **25**: 13-21. 1982
60. KUMAR, D. and WAREING, P. F.: Factors controlling stolon development in the potato plant. *New Phytol.* **71**: 639-648. 1972
61. KUMAR, D. and WAREING, P. F.: Studies on tuberization in *Solanum andigena*. I. Evidence for the existence and movement of specific tuberization stimulus. *New Phytol.* **72**: 283-287. 1973
62. KUMAR, D. and WAREING, P. F.: Studies on tuberization in *Solanum andigena*. II. Growth hormones and tuberization. *New Phytol.* **73**: 833-840. 1974
63. LANGILLE, A. R. and FORSLINE, P. L.: Influence of temperature and photoperiod on cytokinin pools in the potato *Solanum tuberosum* L. *Plant Sci. Lett.* **2**: 189-191. 1974
64. LEOPORD, A. C.: *Auxins and Plant Growth*. Univ. of Carif. Press. 1955
65. LETHAM, D. S.: Cytokinins. *In Phytohormones and Related Compounds: A Comprehensive Treatise*. (Eds. D. S. LETHAM, P. B. GOODWIN and T. J. V. HIGGINS) Vol. 1, p. 205-

- 251, Elsevier 1978
66. MADEC, P.: Tuber-forming substances in the potato. *In* The Growth of the Potato. (Eds. J. D. IVINS and F. L. MILTHORPE) p. 121-131. Butterworth, London 1963
67. MAUK, C. S. and LANGILLE, A. R.: Physiology of tuberization in *Solanum tuberosum* L. *Plant Physiol.* **62**: 438-442. 1978
68. MILLER, C. O.: Kinetin and kinetin-like compounds. *In* Modern Methods of Plant Analysis. (Eds. H. F. LINSKENS and M. V. TRACEY) Vol. 6, p. 194-202. Springer-Verlag, London 1963
69. MILLER, C. O.: Evidence for the natural occurrence of zeatin and derivatives: compounds from maize which promote cell division. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* **54**: 1052-1058. 1965
70. MILTHORPE, F. L.: Some aspects of plant growth. *In* The Growth of the Potato. (Eds. J. D. IVINS and F. L. MILTHORPE) p. 3-16. Butterworth, London 1963
71. MINGO-CASTEL, A. N., NEGM, F. B. and SMITH, O. E.: Effect of carbon dioxide and ethylene on tuberization of isolated potato stolons cultured *in vitro*. *Plant Physiol.* **53**: 798-801. 1974
72. MINGO-CASTEL, A. N., YOUNG, R. E. and SMITH, O. E.: Kinetin-induced tuberization of potato *in vitro*: on mode of action of kinetin. *Plant and Cell Physiol.* **17**: 557-570. 1976
73. MINGO-CASTEL, A. N., SMITH, O. E. and KUMATOTO, J.: Studies on the carbon dioxide promotion and ethylene inhibition of tuberization in potato explants cultured *in vitro*. *Plant Physiol.* **57**: 480-485. 1976
74. MITA, T. and SHIBAOKA, H.: Changes in microtubules in onion leaf sheath cells during bulb development. *Plant and Cell Physiol.* **24**: 109-119. 1983
75. MIURA, G. A. and MILLER, C. O.: Cytokinins from a variant strain of cultured soybean callus. *Plant Physiol.* **44**: 1035-1039. 1969
76. MONTALDI, E. R. and CLAVER, F. K.: Tuberization of the potato plant under non-inducing conditions. *Eur. Potato J.* **6**: 223-226. 1963
77. MURASHIGE, T. and SKOOG, F.: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **15**: 473-497. 1962
78. NELSON, N.: A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* **135**: 375-380. 1944
79. NEWCOMB, E. H.: Plant microtubules. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **20**: 253-288. 1966
80. NISHINARI, N. and SHONO, K.: Identification of cytokinins associated with mitosis in synchronously cultured tobacco cells. *Plant and Cell Physiol.* **21**: 383-393. 1980
81. NISHINARI, N. and SHONO, K.: Biosynthesis of cytokinins by tobacco cell cultures. *Plant and Cell Physiol.* **21**: 1145-1150. 1980
82. OKAZAWA, Y.: Physiological studies on the mechanism of tuberization of potato plants. *Proc. Crop. Sci. Soc. Japan* **23**: 247-248. 1955
83. OKAZAWA, Y.: Studies on the occurrence of natural gibberellin and its effects on the tuber formation of potato plants. *Proc. Crop. Sci. Soc. Japan* **28**: 129-133. 1958
84. OKAZAWA, Y.: Studies on the relation between the tuber formation of potato and its natural gibberellin content. *Proc. Crop. Sci. Soc. Japan* **29**: 121-124. 1960
85. OKAZAWA, Y. and CHAPMAN, H. W.: Regulation of tuber formation in the potato plant. *Physiol. Plant.* **15**: 413-419. 1962
86. OKAZAWA, Y.: Physiological studies on the tuberization of potato plants. *J. Fac. Agric. Hokkaido Univ.* **55**: 267-336. 1967
87. OKAZAWA, Y., KATSURA, N. and TAGAWA, T.: Effects of auxin and kinetin on the development and differentiation of potato tissue cultured *in vitro*. *Physiol. Plant.* **20**: 862-869. 1967
88. OKAZAWA, Y.: Physiological significance of endogenous cytokinin occurred in potato tuber during their developmental period. *Proc. Crop. Sci. Soc. Japan* **39**: 171-176. 1970
89. PALMER, C. E. and SMITH, O. E.: Cytokinins and tuber initiation in the potato *Solanum tuberosum* L. *Nature* **221**: 279-280. 1969
90. PALMER, C. E. and SMITH, O. E.: Effect of abscisic acid on elongation and kinetin-induced tuberization of isolated stolons of *Solanum tuberosum* L. *Plant and Cell Physiol.* **10**: 657-664. 1969
91. PALMER, C. E. and SMITH, O. E.: Effect of kinetin on tuber formation on isolated stolons of *Solanum tuberosum* L. cultured *in vitro*. *Plant and Cell Physiol.* **11**: 303-314. 1970
92. PALMER, C. E. and BARKER, W. G.: Influence

- of ethylene and kinetin on tuberization and enzyme activity in *Solanum tuberosum* L. stolons cultured *in vitro*. *Ann. Bot.* **37**: 85-93. 1973
93. PETERSON, J. B. and MILLER, C. O.: Cytokinins in *Vinca rosea* L. crown gall tumor tissues as influenced by compounds containing reduced nitrogen. *Plant Physiol.* **57**: 393-399. 1976
94. PETERSON, J. B. and MILLER, C. O.: Glucosyl zeatin and glucosyl ribosylzeatin from *Vinca rosea* L. crown gall tumor tissue. *Plant Physiol.* **59**: 1026-1028. 1977
95. PLAISTED, P. H.: Growth of the potato tuber. *Plant Physiol.* **32**: 445-453. 1957
96. PONT LEZICA, R. F.: Evolution des substances de type gibbérellines chez la pomme de terre pendant la tubérisation, en relation avec la longueur de jour et la température. *Potato Res.* **13**: 323-331. 1970
97. RADWAN, A. A., EL-FOULY, M. M. and GARAS, N. A.: Retarding stem elongation and stimulating dry matter production and yield of potato with chlomequat chloride (CCC). *Potato Res.* **14**: 173-180. 1971
98. RAILTON, I. D. and WAREING, P. F.: Effect of daylength on endogenous gibberellins in leaves of *Solanum andigena*. I. Changes in levels of free acidic gibberellin-like substances. *Physiol. Plant.* **28**: 88-94. 1973
99. RAILTON, I. D. and WAREING, P. F.: Effect of abscisic acid on the levels of endogenous gibberellin-like substances in *Solanum andigena*. *Planta* **112**: 65-69. 1973
100. RAPPAPORT, L. and SACHS, M.: Wound-induced gibberellins. *Nature* **214**: 1149-1150. 1967
101. RATHLEF, H. V.: Die Stammtafeln des Weltsortiments der Kartoffel und ihre generativ fruchtbaren Sorten. *Kühn-Archiv.* **33**: 297-431. 1932
102. REEVE, R. M., HAUTALA, E. and WEAVER, M. L.: Anatomy and compositional variation within potatoes. I. Developmental histology of the tuber. *Amer. Potato J.* **46**: 361-373. 1969
103. SATTELMACHER, B. and MARSCHNER, H.: Relation between nitrogen nutrition, cytokinin activity and tuberization in *Solanum tuberosum*. *Physiol. Plant.* **44**: 65-68. 1978
104. SATTELMACHER, B. and MARSCHNER, H.: Cytokinin activity in stolons and tubers of *Solanum tuberosum* during the period of tuberization. *Physiol. Plant.* **44**: 69-78. 1978
105. SAVIC, V. M.: The incubation of potatoes. *Sovetsk. Bot.* **6**: 35-41. 1943
106. SHIBAOKA, H.: Involvement of wall microtubules in gibberellin promotion and kinetin inhibition of stem elongation. *Plant and Cell Physiol.* **15**: 255-263. 1974
107. SHORT, K. C. and TORREY, J. G.: Cytokinins in seedling roots of pea. *Plant Physiol.* **49**: 155-160. 1972
108. SHORT, K. C. and TORREY, J. G.: Cytokinin production in relation to the growth of pea-root callus tissue. *J. Exp. Bot.* **23**: 1099-1105. 1972
109. SIMMONDS, N. W.: Observations on tuber induction in potatoes. *Eur. Potato J.* **8**: 92-97. 1965
110. SLATER, J. W.: Mechanism of tuber initiation. *In* The Growth of the Potato. (Eds. J. D. IVINS and F. L. MILTHORPE) p. 114-120, Butterworth, London 1963
111. SLATER, J. W.: The effect of night temperature on tuber initiation of the potato. *Eur. Potato J.* **11**: 14-32. 1968
112. SMITH, O. E. and RAPPAPORT, L.: Endogenous gibberellins in resting and sprouting potato tubers. *Adv. Chem. Ser.* **28**: 42-48. 1960
113. SMITH, O. E. and RAPPAPORT, L.: Gibberellins, inhibitors, and tuber formation in the potato, *Solanum tuberosum*. *Amer. Potato J.* **46**: 185-191. 1969
114. SMITH, O. E. and PALMER, C. E.: Cytokinin-induced tuber formation on stolons of *Solanum tuberosum*. *Physiol. Plant.* **23**: 599-606. 1970
115. STALLKNECHT, G. F.: Coumarin-induced tuber formation on excised shoots of *Solanum tuberosum* L. cultured *in vitro*. *Plant Physiol.* **50**: 412-413. 1972
116. SUNDARESAN, R. V. S. and KIMMINS, W. C.: Effect of coumarin on the synthesis and composition of cell walls in *Phaseolus vulgaris* (L.). *Ann. Bot.* **47**: 283-285. 1981
117. THIMANN, K. V.: Studies on the growth

- hormone of plants VI. The distribution of the growth substance in plant tissues. J. Gen. Physiol. **18**: 23-34. 1934
118. THIMANN, K. V. and SACHS, T.: The role of cytokinins in the fasciation disease caused by *Corynebacterium fascians*. Amer. J. Bot. **53**: 731-739. 1966
119. TIZIO, R.: Action du CCC (Chlorure de (2-chloroéthyl)-triméthylammonium) sur la tubérisation de la pomme de terre. Eur. Potato J. **12**: 3-9. 1969
120. TIZIO, R. and BIAIN, M. M.: Are cytokinins the specific factors for tuber formation in the potato plant? Phyton **31**: 3-13. 1973
121. VAN STADEN, J.: Changes in endogenous cytokinins of lettuce seed during germination. Physiol. Plant. **28**: 222-227. 1973
122. VAN STADEN, J.: The nature of cytokinin in potato tubers. Potato Res. **19**: 249-252. 1976
123. VAN STADEN, J.: Occurrence of a cytokinin glucoside in the leaves and honeydew of *Salix babylonica*. Physiol. Plant. **36**: 225-228. 1976
124. VAN STADEN, J.: Seasonal changes in the cytokinin content of *Ginkgo biloba* leaves. Physiol. Plant. **38**: 1-5. 1976
125. VAN STADEN, J. and DAVEY, J. E.: Cytokinin translocation in xylem sap of herbaceous plants. Z. Pflanzenphysiol. **77**: 377-382. 1976
126. VAN STADEN, J. and DIMALLA, G. G.: Endogenous cytokinins and tuberization in the potato (*Solanum tuberosum* L.). Ann. Bot. **40**: 1117-1119. 1976
127. VAN STADEN, J. and DIMALLA, G. G.: The distribution of cytokinins in tuberizing potatoes. Ann. Bot. **41**: 741-746. 1977
128. VAN STADEN, J. and DIMALLA, G. G.: Endogenous cytokinins and the breaking of dormancy and apical dominance in potato tubers. J. Exp. Bot. **29**: 1077-1084. 1978
129. WERNER, H. O.: The effect of a controlled nitrogen supply with different temperatures and photoperiods upon the development of the potato plant. Nebraska Agric. Exp. Sta. Res. Bull. **75**: 1-132. 1934
130. WOOLLEY, D. J. and WAREING, P. F.: The interaction between growth promoters in apical dominance II. New Phytol. **71**: 1015-1025. 1972
131. WOLLEY, D. J. and WAREING, P. F.: The role of roots, cytokinins and apical dominance in the control of lateral shoot form in *Solanum andigena*. Planta **105**: 33-42. 1972

Summary

Potato tuberization is a physiological process to form a storage organ. The first sign of the tuberization is a swelling at the sub-apical region of the stolon which occurs after cessation of stolon growth. Subsequently, vigorous thickening growth due to division and enlargement of cells occurs and starch is accumulated in the cells. The tuberization is completed when the apical meristem has been incorporated into tuberose portion and forms an eye.

Potato tuberization is under the control of photoperiod. Short days stimulate the process, while long days prevent or retard it. The response to photoperiod is varied by many other factors, including genotype, temperature, nitrogen level and age of mother tubers.

By grafting experiments, Gregory and Chapmann brought forward evidences for the occurrence of a specific tuber-inducing stimulus which is formed in the leaves under the short days and transmitted to under-ground part to induce tuberization. The chemical nature of the substance is still unknown. Some workers have speculated that the stimulus may be similar to cytokinin or ABA. However, there are many conflicting report as to the role of these hormones in the tuberization.

The present study was designed to specify factors which trigger and stimulate the potato tuberization. At first effects of environmental, nutritional and hormonal factors on the tuberization were examined by means of single-node stem segment culture *in vitro*. Then changes in the levels of endogenous plant hormones during the course of the tuberization was measured to see causal relationship between these hormones and potato tuberization.

An attempt was also made to detect a specific tuber-inducing stimulus in the leaves and tubers using the single-node stem segment culture as an assay method. The results obtained are summarized as follows:

1. Using early maturing type cv. Irish Cobbler,

effects of photoperiods and night temperatures on the tuberization in potato plants were examined. Short days (12 h photoperiods) strongly induced the tuberization, whereas long days prevent the process (Figs. 3, 4). Night temperatures (Table 1) and physiological age of mother tubers (Fig. 6) also affected the process.

2. *In vitro* tuberization was greatly affected by culture temperature and sucrose concentration in the medium (Fig. 7). At 25°C, increasing the sucrose concentration in the medium increased the tuberization. However, the tuberization was scarcely observed at 30°C. At 10°C, the tuberization was induced independent on sucrose concentration. Hereafter, all *in vitro* experiments were performed at 25°C. The tuberization was also affected by age of tubers used to obtain the single-node segments (Figs. 9, 10). Reduced nitrogen was inhibitory, while nitrate showed no effect (Figs. 11, 12).

3. Zeatin riboside (ZR) which is known to be a major cytokinin in potato plants showed no effect on the *in vitro* tuberization at a low sucrose concentration (2%) (Fig. 21). The substance exerted a little promoting effect at sucrose concentrations above 4% (Fig. 22). It stimulated the growth of tubers (Fig. 24).

4. ABA failed to induce tubers. It caused only a slight swelling at sub-apical region of the shoot.

5. GA₃ strongly inhibited the tuberization (Fig. 26). Ethylene caused only diageotropism of the lateral shoots (Fig. 27).

6. Changes in the levels of endogenous plant hormones; GA-like substance, auxin, cytokinin and ABA-like substance during the course of the tuberization were examined. The tuberization process was divided into four stages as shown in Fig. 15. Cytological observation revealed that the swelling at stage B was mainly due to cell expansion and the swelling at stage C was caused by cell division (Table 2.) The level of GA-like substance decreased drastically with the swelling of the stolon tips and then kept very low level during the course of the tuberization (Fig. 17). The level of cytokinin which was considerably low in the elongating stolon tips (stage A) showed a slight increase with the swelling of the tips (stage B) and reached a maximum in the fully swelled stolon tips (stage C) (Fig. 19). The level of auxin showed only a little change (Fig. 18). The level of ABA-

like substance began to increase with the swelling and then continued to increase vigorously during the course of the tuberization (Fig. 20).

7. The level of butanol-soluble cytokinin (mainly ZR) in elongating stolon tips was low, while that of water-soluble one (mainly zeatin ribotide) was extremely high. Upon swelling of the tips, the former increased greatly as the latter decreased (Figs. 35, 36, 37). The results suggest that the increased butanol-soluble cytokinin is responsible for the subsequent vigorous thickening growth of stolons to form tubers and that the water-soluble cytokinin is a temporary storage form.

8. The single-node segments derived from old tubers produced new tubers more rapidly than those from young tubers (Figs. 9, 10). The level of GA-like substance in the former was lower than that in the latter (Fig. 28). However, there found no significant differences in the levels of endogenous cytokinin (Fig. 29) and ABA-like substance (Fig. 30) between the two kinds of segments.

9. Under the tuber-inducing conditions, the level of cytokinin in the leaves decreased with the commencement of tuberization. On the other hand, the level kept almost constant under tuber-non-inducing conditions (Figs. 48, 49).

10. These results described above indicate that a reduction of GA level is prerequisite for the tuberization and that neither cytokinin nor ABA is a trigger of the tuberization. Cytokinin stimulates tuber growth by inducing cell division, and ABA inhibits regrowth of apical meristem of a tuber and induce it to rest.

11. Using the single-node segment culture *in vitro* as a bioassay method, an attempt was made to detect a specific tuber-inducing stimulus in the leaves. Two acidic substances which are active in inducing the tuberization could be found (Figs. 51, 52, 53, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61). One seems to be a glycoside of the other one (Table 5). The tuber-inducing activity in the leaves increased under the short days, whereas remained almost constant under the long days (Fig. 63). The activity was also found in physiologically old tubers (Fig. 64). These results suggest that the substances detected here are the trigger of the tuberization.

12. Potato tuberization seems to be regulated by combined action of several plant hormones. A decrease in GA level is a prerequisite for the pro-

cess. The substances detected here cause the cessation of stolon elongation and a swelling of the stolon. Cytokinin (ZR) which is accumulated in the swelled part induces vigorous thickening growth

due to cell division, and ABA which continues to increase during the course of the process inhibits the regrowth of apical meristem and induces it to dormancy.