



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	イチゴの葯培養によるウイルスフリー個体の大量増殖とその生産力に関する研究
Author(s)	大澤, 勝次
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	乙第2796号
Issue Date	1985-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/32770
Type	doctoral thesis
File Information	2796.pdf



イチゴの薬培養によるウイルスフリー個体
の大量増殖とその生産力に関する研究

大 澤 勝 次

イチゴの薬培養によるウィルスフリー 個体の大量増殖とその生産力に関する研究

目 次

第 1 章	緒 言	-----	1
第 2 章	イチゴの組織培養に関する 既往の研究	-----	6
第 3 章	イチゴの薬培養による植物 体の大量誘導	-----	12
I.	材料及び方法	-----	12
II.	結果及び考察	-----	16
第 1 節	薬の発育段階及び品種と 薬からのカルス形成	-----	16
第 2 節	培地条件及び品種と薬か らのカルス形成	-----	20
第 3 節	培地条件及び品種とカル スからの植物体誘導	-----	25
第 4 節	薬培養による植物体の大量 誘導と育成株の染色体数	-----	36

Ⅲ.	論議	50
第4章	イチゴの薬培養によるウイルスフリー個体の大量育成	64
I.	材料及び方法	64
II.	結果及び考察	71
第1節	ウイルス罹病株における培地の種類及び品種と薬からのカルス形成	71
第2節	ウイルス罹病株における培地の種類及び品種とカルスからの茎葉分化	75
a)	カルスを移植しない場合の茎葉分化	75
b)	カルスを移植した場合の茎葉分化	77
第3節	ウイルスの罹病程度と薬からのカルス形成並びにカルスからの植物体の大量育成	83
第4節	培養育成個体のウイルス検定	87

Ⅱ	論 議	-----	92
第 5 章	イチゴの薬培養によって育 成した系統の生産力	-----	107
I.	材料及び方法	-----	107
II.	結果及び考察	-----	111
第 1 節	親株と薬培養育成系統の 生産力の比較	-----	111
a)	ランナー増殖の比較	-----	111
b)	生産力の比較	-----	111
第 2 節	市販ウイルスフリー株と 薬培養育成系統の生産力 の比較	-----	116
Ⅲ.	論 議	-----	128
第 6 章	総合論議	-----	134
第 7 章	摘 要	-----	145
	引用文献	-----	153

第1章 緒言

インドの GUHA と MAHESHWARI (1964, 1966) がチヨウセンアサガオの薬を培養して胚状体 (embryoid) を誘導し、それらから半数体の育成に成功して^{(14), (15)} から、20年が経過しようとしている。その間、薬培養は半数性植物の作出方法として世界中で活発な研究が進められ、すでに60種を超える植物で半数体の育成が報じられている^{(33), (54)}。

しかし、実際の育種の場面に利用しうる技術として確立された薬培養技術は、日本におけるタバコ^{(52), (53)}、イネ^{(73), (74)}、中国におけるコムギ^{(11), (86)}、ナス⁽¹¹²⁾、カナダにおけるナタネ⁽²³⁾ など、わずかな例のみであって、その他の作物については更に多くの研究の成果を待たねばならないのが現状である。また、作物あるいは品種の違いによって、同

様の手法を用いても、半数体の育成に成功しない例も数多く報告されており (17), (24), (49), (65), (106), (115), (116), 対象作物ごとに解決しなければならぬ問題が山積しているといえる。

筆者も半数体の育成を目的として、1968年以來、フロッコリーをはじめとする多くの野菜類の薬培養を実施してきた (63), (65), (84)。その研究の過程で、イチゴについても薬組織を材料としてカルス (callus) を誘導する条件や、カルスから植物体を再分化させる条件等を明らかにして、多数のイチゴ幼植物を育成した (65), (84)。それらの植物体は染色体数が56であったことから、半数体化していなかったのであるが、親株に比べて極めて生育旺盛になるという特徴を有していた。筆者は、この現象は薬培養することによってイチゴのウイルスが除去される (ウイルスフリー化する) ことに起因しているのではないかと考えた。そこでウイルスの罹病が判定済みの、罹病程度を異にする数品種の親株を用いて、再

度薬培養を実施し、育成した薬培養個体のウイルス検定を行い、それら植物体がウイルスフリー個体になっていることを明らかにした(84)。

その後、それら育成個体の圃場生産力を調査したところ、培養に用いた親株に比べて増収したのはもちろんのこと、市販のイチゴウイルスフリー個体に比べても、実験を継続した4年間にわたり、常に120～150%以上の高収量を示した系統の存在が確認された(82)、(83)。

この事実は、従来半数体作出技術としてのみ重要視されていた薬培養技術が、ウイルスフリー個体の作出技術としても、優良変異系統の作出技術としても有効に利用しうることを示すものであると考えるので、ここにとりまとめ報告する。

本研究は旧園芸試験場蔬菜部蔬菜育種第1研究室(神奈川県平塚市)において、1969

年より、１９７３年にわたって実施され、機構改革後も、引き続き野菜試験場育種部育種第１研究室（三重県津市一身田及び三重県安芸郡安濃町）において、１９７４年より、１９８０年にわたって実施されたものである。

本研究の推進上、有益なる御指導を賜わり、また本論文御校閲の労を取られた北海道大学田村 勉教授に対して、深甚なる感謝の意を表します。更に本論文に対して有益な御助言と御校閲を賜わった北海道大学四方英四郎教授、八鍬利郎助教授に対して深く謝意を表します。

また本研究の端緒を与えられ、終始、懇切なる御指導と御鞭達を賜わった、筆者の初代の研究室長西 貞夫博士（前野菜試験場長）に対し、謹しんで深く御礼申し上げます。氏の御理解と御支援があつてはじめて、本研究は遂行出来たものです。更に、本研究の実施期間中に研究室長として、温かい御指導と御

助言をいただいた栗山尚志博士（現野菜試験場長）・山川邦夫博士（野菜試験場育種部長）・菅原祐幸博士（北海道農業試験場作物第2部長）・高柳謙治博士（野菜試験場育種部育種第1研究室長）の各位に対し、深い感謝の意を表します。また研究室の先輩として、本研究の遂行に適切な御助言と御支援をいただいた戸田幹彦氏（静岡県農業試験場植物工学研究室長）・豊田 努氏（株式会社精興園主任技師）および研究実施期間中、筆者の研究室に依頼研究員として研修留学に来訪した多くの府県の研究員及び養成研修生諸君に深く感謝の意を表します。

以上の人達の御援助なくして、本研究の完遂はありませんでした。心より厚く御礼申し上げます。

第2章 イチゴの組織培養に関する 既往の研究

イチゴ (*Strawberry*, *Fragaria* × *ananassa* HORT.) はバラ科に属する8倍体 (染色体数 $2n = 56$) の植物であり、欧米では小果類として分類されている。わが国ではランナーで繁殖する代表的な栄養繁殖性野菜の一つとなっているが、正常な花器をつけるので、交雑による品種改良も行なわれている。

イチゴの組織培養は MILLER ら (1963) が茎頂を培養して Crinkle virus などの数種のウイルスを除去することに利用したのに始まっている⁽³⁶⁾。わが国でも森ら (1969) や高井ら (1970) が茎頂培養によるウイルスフリー個体の作出について報告している⁽⁴⁶⁾、⁽⁹⁴⁾、⁽¹⁰²⁾。それによると、森ら (46) は培養の難易にかなりの品種間差があること、0.2 ~ 0.3 mm 程度の茎頂を介離培養した場合は全株ウイルスフリーになったが、1.0 mm 前後の茎頂を

培養した場合でも半数以上の育成個体がウイルスフリー株になっていたと述べている。

イチゴは栄養繁殖性作物の中では増殖率の高いものの一つであり、1株の親株が1年後にはランナーで100～150株に増殖し得るので、2年後には15,000株程度獲得できる計算となる。したがって、ニンニクやヤマモなど、増殖率の低い作物における培養による増殖の意義とは多少異なるが、隔離網室やガラス室内でのランナーの増殖には多大の面積や労力を必要とするので、その軽減のために組織培養による大量増殖法が種々検討されてきた^{(3), (5), (6), (62), (70), (78), (108)}。又最近では、この大量増殖技術の進歩に支えられて、液体窒素を利用したイチゴの茎頂の凍結保存等による遺伝資源の長期保存技術についての検討も数多く報告されている^{(18), (20), (21), (48), (92)}。

現在までに、イチゴの大量増殖に用いられた培養部位は、茎頂（大澤ら；1973⁽⁸⁵⁾，Boxus；1974⁽⁵⁾，Nishiら；1973⁽⁶²⁾，

KARTHA ら ; 1980⁽²⁰⁾, WAITHAKA ら ; 1980⁽¹⁰⁸⁾,
ANDERSON ら ; 1982⁽³⁾ など), 葯 (大澤ら ;
1974⁽⁸⁴⁾, 西ら ; 1974⁽⁶⁵⁾, ROSATI ら ; 1975
(91), LANERI ら ; 1980⁽²⁸⁾, MOKRAI ; 1981
(38) など), 果実 (浅平ら ; 1977⁽²⁾), 葉柄
(李ら ; 1979⁽²⁹⁾), 葉身 (李ら ; 1979⁽²⁹⁾),
花弁 (西ら, 1972⁽⁶⁴⁾) などが知られてい
る。

浅平ら⁽²⁾はイチゴの果実を用いて詳細な実
験を行っている。彼らは開花後2, 7, 12,
17 日のイチゴ果実を採取し, それぞれ種子
の有無を区分して, BA (6-ベンジルアミノプリン)
と 2,4-D を組合せた 16 種類の MS 培地⁽⁵⁰⁾
で培養した。その結果, 果実の齢・種子の有
無によって生長反応が明らかに異なっており,
その原因は内生オーキシンレベルの差による
ものと考えられている。彼らはその実験の過
程で, 種子を除去した開花 2 日後の果実を,
BA 5 mg/l + 2,4-D 1 mg/l 共存培地で培養し
てカルスを形成させ, そのカルスから茎葉の

分化を認めた。

李ら⁽²⁹⁾はイチゴの葉柄と葉身切片をMS培地で培養し、葉柄切片ではBA 2 mg/l + 2,4-D 0.2 mg/lの共存培地で、葉身切片ではBA 0.2 mg/l + 2,4-D 0.2 mg/lの共存培地で茎葉の原基が形成されたと報告している。この場合、2,4-Dの代わりにNAAを用いた培地ではカルス形成のみで、茎葉の分化は全く認められなかったとしている。

筆者ら^{(64), (81)}のイチゴの大量増殖の試験においては、培養部位として、茎頂・葯・花弁が適当であったが、それぞれの培養部位の培地反応に明らかな差が認められている。特にBA 10^{-5} M (2.25 mg/l) 単独添加培地で、茎頂組織の場合は高率にカルスの形成が認められたが、葯や花弁の場合は全くカルス形成が認められず、これらの組織からのカルス形成には、BAとNAA, IAA, 2,4-Dなどのオーキシンの共存が必須であった。このことは、茎頂組織と葯や花弁との内生オーキシ

ン及び内生サイトカイニン含有量に差のあることを示すものと考えられた。

Boxus (1974) はイチゴの茎頂を MS 培地で培養し、BA 1 mg/l 単独添加培地では多数の腋芽が誘導され、その腋芽を基礎培地に移植することで多数の幼植物が獲得されたと報告した⁽⁵⁾。この大量増殖法は、筆者らの明らかにした培養法（茎頂組織を BA $10^{-5} \text{ M} \approx 2 \text{ mg/l}$ 単独添加培地で培養してカルスからの不定芽を大量に誘導する方法）⁽⁶²⁾ と類似したものであるが、彼らは茎頂組織からカルスの形成は認められなかったとしている^{(5), (6)}。

同じ培養部位でも、供試品種や採取時期の違いによって、培地に対する反応に差のあることが知られている。筆者らは既にイチゴの薬培養において、薬からのカルス形成及びカルスからの茎葉分化（幼植物の誘導）に、品種間差のあることを明らかにした^{(65), (84)} が、Rosati ら (1975) も 9 品種のイチゴを用いて薬培養を行い、カルス細胞から植物体の得

られたのは4品種のみであったと述べている⁽⁹¹⁾し、MOKRAら⁽¹⁹⁸¹⁾も5品種を用いた薬培養で、カルスからの器官の分化は1品種のみで認められたとしている⁽³⁸⁾。これら薬培養で認められた品種間差に比べると、茎頂組織を材料にした場合の品種間差の程度は、かなり小さいものであると考えられる⁽⁷⁰⁾。

以上のように、イチゴの組織培養による幼植物の大量増殖には、茎頂・薬・花弁・果実・葉柄・葉身など多くの組織が利用されているが、これらのうち最も効率の良い培養部位は茎頂組織であると判断される⁽⁸¹⁾。

薬を材料にした幼植物の大量増殖法については、筆者らの方法^{(65), (84)}以上に効率的な方法はまだ報告されていない。本論文はイチゴの薬培養による幼植物体の大量育成方法を示すとともに、それら育成個体のウイルスフリー化と生産力の比較試験の結果をとりまとめたものである。

第3章 イチゴの薬培養による植物体の 大量誘導

I. 材料及び方法

1) 供試材料と殺菌方法

供試品種は旧園芸試験場（神奈川県平塚市）で十数年間にわたって、品種保存用に維持していた‘宝交早生’，‘ダナー’，‘福羽’，‘堀田ワンダー’，‘紅鶴’，‘はるのか’，‘幸玉’の7品種を用い，1969年から6年間にわたり網室内で鉢植えにして育成した個体から，実験の都度蕾を採取した。

蕾の殺菌は99%エチルアルコールに2～3秒浸漬した後，サラシ粉上澄み液（ウィルソン液⁽¹¹⁴⁾）～高度サラシ粉10gを140mlの水に混和したもの）に10～15分浸漬して行い，これから取り出した薬は1本を残して他をそのまま置床した。イチゴは1個の蕾に約25本の薬があるので，1試験管当たり

5~7本を置床した。置床に当たっては花糸が付着しないようにし、また葯を寒天培地中に埋め込まず、表面に置床するように注意した。残りの1本は鉄酢酸カーミンによる押しつぶし法で検鏡し、蕾の長さ、葯の長さとは花粉のステージとの関係を調査した。

2) 培地組成及び培養条件

無機養分の基礎培地として LINSMAIER and SKOOG の培地⁽³⁰⁾ (表1) を用いた。培地添加物として加えたオーキシンやサイトカイニン類等のホルモン濃度は、各実験ごとに表中に示した。すべての培地に共通して、寒天 7 g/l, しょ糖 30 g/l を加え、 $1/10$ N 水酸化ナトリウム又は $1/10$ N 塩酸で pH を 5.8 ~ 6.0 に調整した。培地はオートクレーブ (1 Kg/cm^2 圧, 10 ~ 15 分間) で殺菌した後、斜面培地にして用いた。

培養はフレハブの恒温培養室を用い、 25°C , 12 時間照明 (照度約 3000 lx)・12 時間暗黒の条件下で行った。

表1. 本実験の基礎培地として用いた培地組成

組 成	濃度(%)	組 成	濃度(mg/l)
KNO_3	1,900	KI	0.83
NH_4NO_3	1,650	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
KH_2PO_4	170	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.8
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.3	Na_2EDTA	37.3
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.6	Thiamine-HCl	0.4
H_3BO_3	6.2	Myo-Inositol	100

Linsmaier & Skoog⁽³⁰⁾ に準拠

3) 育成個体の馴化

試験管内の幼植物は、試験管内で茎葉部が20 ~ 30 mm以上に生育したときにこれを分割し、発根促進及び茎葉の健全な生育を目的とする培地に移植した。移植後十分に発根の認められたものから、順次殺菌済みのバーミキュライトを入れたイチゴパックに植え出し、2週間に1度、ハイポネックス1,000倍液を加えて養分補給を行い馴化を図った。馴化により健全に活着したものは、通常の床土を入れた15 cm鉢に植え出した。

4) 育成個体の染色体調査

薬培養で育成した植物体の染色体数は、根端をコルヒチン0.2%液に3~6時間浸漬した後、6°Cの冷蔵庫に24時間入れて前処理し、ファーマー液で固定した。主として根端は馴化育成中に発生した太くて新しい根端を用いた。染色剤には塩酸を含むアセトオルセインを用い、押しつぶし法によって検鏡した。

II. 結果及び考察

第1節 蒴の発育段階及び品種と蒴からの カルス形成

イチゴを含む代表的な数種野菜の、蕾の長さ及び蒴の長さ、花粉のステージとの関係は表2に示すとおりである。この調査結果から、各野菜とも蕾の大きさによって、ある程度花粉のステージを判定しうることがわかった。しかし、トマト・キュウリの例にみるように、蕾の採取時期の違いによって、かなり差の生じている場合も認められた。

イチゴは蕾の大きさや蒴の大きさだけでは簡単には花粉のステージを判定できず、3mmの大きさの蕾で、花粉母細胞の場合と四分前期の場合と一核期の場合とがあり、蒴の大きさも、各ステージで1mm程度のものであって区別が困難であった。しかし、蒴の成熟度は蒴の色によって概ね区別できると、一

表2. 各種野菜類の蕾の長さ・葯の長さとは花粉ステージの関係

作物名 (品種名)	蕾や葯・花 粉粒の長さ ^a (大きさ)	花粉の发育ステージ			
		花粉母細胞	四分子期	一核期	成熟花粉
キャベツ	蕾 (mm)*	~2	1~3	2~4	4~10
	葯 (mm)	~1	1~2	2~3	3~4
ハクサイ	蕾 (mm)*	~1	1~2	2~3	3~
	花粉粒(μ)	8~23	20~25	13~18	20~27
ブロッコリー	蕾 (mm)*	~1.5	1~2	2~3	3~8
	葯 (mm)	~1.5	1~2	1.5~2	2.5~3
ダイコン	蕾 (mm)*	~1	1~2	1~4	4~9
	花粉粒(μ)	12~15	18~25	10~18	18~25
トマト	蕾 (mm)*	~3	3~4	4~6	5~
	蕾 (mm)**	~3	3~6	3~7	7~
キュウリ	蕾 (mm)*	~2	2~4	4~7	7~
	蕾 (mm)**	~2	1.5~3	3~7	7~
イチゴ	蕾 (mm)*	~3	3~4	3~6	6~
	葯 (mm)	~1	1	1	1~2

a. * 春季 ** 夏季

核期以前の葯は白色～乳白色を呈し，若いステージほど透明に近いものであり，二核期～成熟期の葯は黄化していた。したがって，イチゴの花粉の発育段階の判定は，葯の色を観察することで概ね区別できるが，正確には，その都度葯中の花粉粒を検鏡して判定しなければならなかった。

イチゴの葯の発育段階とカルス形成との関係を表3に示した。品種は‘宝交早生’と‘堀田ワンダー’を用い，培地はMS培地にカイネチン $10^{-5} M$ + 2,4-D $10^{-5} M$ の共存培地を用いた。最も高いカルス形成率を示したのは一核期の花粉を含む葯であり，四分分子期がそれに次いだが，どのステージの葯からもカルスの形成が認められた。このことは，同時に行なった実験で，アブラナ科野菜やナス科野菜の葯のカルス形成が，花粉母細胞や成熟花粉を含む葯からはほとんど認められないのに比べると，イチゴの場合の特徴的な現象であり，特に成熟花粉を含む，かなり発育段階

表3. イチゴ葯の發育ステージとカルス形成との関係^a

供試品種	葯の發育ステージ	供試 葯数 (A)	カルス形成葯数 ^b (B)			カルス 形成率 (B/A) %
			+	++	+++	
宝交早生	花粉母細胞期	8	2	0	0	25
	四分時期	20	4	6	0	50
	一核期	24	3	15	2	83
	成熟花粉期	13	1	4	0	38
堀田ワルダー	花粉母細胞期	13	5	2	0	54
	四分時期	45	7	22	4	73
	一核期	71	10	42	11	89
	成熟花粉期	39	12	6	2	51

a. 供試培地は $LS + \text{カイネチン} 10^{-5} M + 2,4-D 10^{-5} M$

b. カルス形成の程度を示す + : カルスの径 1mm 未満

++ : カルスの径 1mm 以上 3mm 未満

+++ : カルスの径 3mm 以上

の進んだ葯からも、高率にカルス形成の認められたことは特筆に値した。しかし、最も高率にカルス形成の認められたのは一核期の葯であり、以後の実験は一核期の葯を中心に用いた。

第2節 培地条件及び品種と葯からのカルス形成

イチゴの葯からのカルス形成について、供試品種別及び供試培地別にとりまとめて表4に示した。カルス形成率は培地添加物によって大きく異なり、すべての品種を通じて、オーキシン（NAA, 2,4-D）単独添加培地では、カルスの形成がほとんど認められなかったが、オーキシンのカイネチンかベンジルアデニン（BA）が共存することによって高率に認められた（図1）。

品種別のカルス形成率にはかなりの差が認められ、供試6品種のうち「堀田ワッダー」

表4. イチゴの葎からのカルス形成に及ぼす生長調節物質の影響

供試品種	培地添加物				置床 葎数 (A)	カルス形成葎数(B) ^a				桑根 カルス 数
	NAA	2,4-D	Kinetin	BA		+	++	+++	(B/A) %	
堀田ワッダー	10 ⁻⁵	0	0	0	335	2	2	1	2	1
	10 ⁻⁵	0	10 ⁻⁵	0	333	51	126	94	81	20
	0	10 ⁻⁵	0	0	342	1	0	1	1	0
	0	10 ⁻⁵	10 ⁻⁵	0	337	46	228	28	90	0
宝交早生	10 ⁻⁵	0	0	0	49	0	0	0	0	0
	10 ⁻⁵	0	10 ⁻⁵	0	51	17	19	2	75	0
	0	10 ⁻⁵	0	0	47	0	0	0	0	0
	0	10 ⁻⁵	10 ⁻⁵	0	46	9	25	1	76	0
福羽	10 ⁻⁵	0	0	0	90	0	1	0	1	0
	10 ⁻⁵	0	10 ⁻⁵	0	96	15	29	7	53	5
	0	10 ⁻⁵	0	0	91	0	0	0	0	0
	0	10 ⁻⁵	10 ⁻⁵	0	85	20	21	15	66	0
	0	10 ⁻⁵	0	10 ⁻⁵	84	18	18	17	63	0
ダナー	10 ⁻⁵	0	0	0	39	0	0	0	0	0
	10 ⁻⁵	0	10 ⁻⁵	0	37	4	0	0	11	2
	0	10 ⁻⁵	0	0	40	0	0	0	0	0
	0	10 ⁻⁵	10 ⁻⁵	0	40	2	9	1	30	0
	0	10 ⁻⁵	0	10 ⁻⁵	44	8	3	2	30	0
紅鶴	10 ⁻⁵	0	0	0	50	2	0	0	4	1
	10 ⁻⁵	0	10 ⁻⁵	0	51	13	5	1	37	5
	0	10 ⁻⁵	0	0	62	1	0	0	2	0
	0	10 ⁻⁵	10 ⁻⁵	0	62	13	11	0	39	0
	0	10 ⁻⁵	0	10 ⁻⁵	64	13	11	2	41	0
はるのか	10 ⁻⁵	0	0	0	35	0	0	0	0	0
	10 ⁻⁵	0	10 ⁻⁵	0	35	4	0	0	11	0
	0	10 ⁻⁵	0	0	35	0	0	0	0	0
	0	10 ⁻⁵	10 ⁻⁵	0	34	2	0	0	6	0
	0	10 ⁻⁵	0	10 ⁻⁵	37	5	5	0	27	0

a. カルス形成の程度を示す. +: カルス径 1mm 未満

++: カルス径 1mm 以上 3mm 未満

+++: カルス径 3mm 以上



図1 イチゴ葯からのカルス形成
品種「堀田ワッダー」
培地 $\text{NAA } 10^{-5}\text{M} + \text{KIN } 10^{-5}\text{M}$
置床後約4週間

が最も容易にカルスが形成され、次いで‘宝交早生’，‘福羽’であった。‘ダナー’，‘紅鶴’，‘はるのか’は比較的カルス形成が困難で、最も高率であった 2,4-D 10^{-5} M + BA 10^{-5} M 共存培地上でさえ、‘ダナー’ 30%，‘紅鶴’ 41%，‘はるのか’ 27% であった。

カルス形成に対するカイネチンと BA の効果の違いについては、各品種を通じて認められなかった。形成されたカルスの形状については、NAA と 2,4-D による差が認められ、NAA とカイネチンの共存培地のカルスは白色～灰白色の柔らかいカルスが多く、ときに発根も伴うが、2,4-D とカイネチンや BA との共存培地のカルスは、黄緑色の硬いカルスとなり、発根は全く認められなかった(図 2)。

薬の置床後、カルスの形成される過程を、経時的に顕微鏡下で調査したところ、一部の薬では 1～2 週間後に薬壁が裂開して、中の

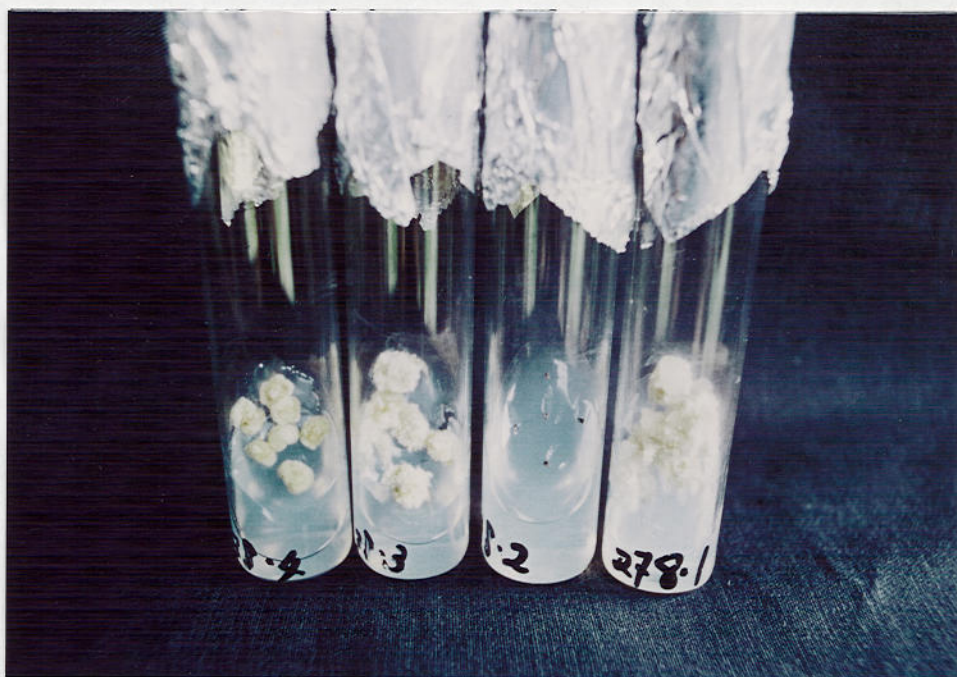


図2. 2,4-D と NAA によるカルス形状の差異
品種「福羽」, 置床後約8週間,
左から右へ

2,4-D $10^{-5}M$ + BA $10^{-5}M$

2,4-D $10^{-5}M$ + KIN $10^{-5}M$

2,4-D

NAA $10^{-5}M$ + KIN $10^{-5}M$

の各培地におけるカルスの形状

花粉粒がカルス形成を始めているものも認められたが、大半の葯では花粉粒からのカルス形成は認められず、葯壁や葯隔組織などの体細胞組織からのカルス形成が認められた。それら葯壁や葯隔組織などのカルスは、2週間以上経過すると増殖して、肉眼的にも認められるようになるのに対し、花粉粒起源のカルスは肉眼的に判別される大きさにまでは増殖しなかった。イナゴの場合、花糸は付着しにくく、花糸からのカルス形成はほとんど認められなかった。

第3節 培地条件及び品種とカルスからの植物体誘導

カルスから植物体を誘導するためには、茎葉と根の両器官を分化させる必要があるが、イナゴの場合、茎葉さえ分化させれば、その茎葉を基礎培地に移植することで、根の分化は容易に行なわれるので、ここでは特に茎葉

の分化について述べる。薬培養によつて形成された「堀田ワンダー」のカルスを9種類の器官分化用培地に移植し、移植12週間後の調査結果を表5に示した。移植後4～8週間ごろから、カイネチン 5×10^{-5} M 単独添加培地と BA 10^{-5} M 単独添加培地で茎葉の分化が認められた(図3)。チミン、チミジンは 10^{-5} M を添加したが効果は認められず、NAA 10^{-5} M の共存培地では、カイネチンや BA の培地でも茎葉分化が認められなくなった。

茎葉分化の過程は、一般的に次のとおりである。すなわち、カルス形成後2週間内外のごく小さなカルスを BA 10^{-5} M 単独添加培地に移植すると、まず粒状の構造をした、かなり大きな黄白色カルスに生長する。続いてそれに緑色の斑臭が現われるようになり、次第に濃緑色の斑臭となって、十数日後その緑斑部から茎葉が分化した(図4)。しかし、緑色斑臭は必ずしも茎葉分化につながるとは

表5. 移植カスからの器官分化に及ぼす生長調節物質の影響(1)

培地添加物濃度					移植 カス 数 (A) ^a	茎葉 分化 カス数 ^b (B)	茎葉 分化 率 (B/A)	根 分化 カス数 ^b (C)	根 分化 率 (C/A)
NAA	KIN	BA	4-Min	4-Min			%		%
M	M	M	M	M					
0	10^{-5}	0	0	0	36	0	0	9	25
0	5×10^{-5}	0	0	0	15	1	7	5	33
0	0	10^{-5}	0	0	52	8	15	6	12
0	0	0	10^{-5}	0	36	0	0	9	25
0	0	0	0	10^{-5}	36	0	0	5	14
10^{-5}	10^{-5}	0	0	0	36	0	0	17	47
10^{-5}	0	10^{-5}	0	0	67	0	0	12	18
10^{-5}	0	0	10^{-5}	0	36	0	0	5	14
10^{-5}	0	0	0	10^{-5}	36	0	0	0	0

a. 供試品種「堀田ワンダー」

カス形成後2~4週間の比較的若いカスを移植した。

1本の試験管に1個のカスを置床した。

b. カス移植後12週間目の調査結果である



図3 イチゴ葯カルスからの茎葉分化第1号
品種 '堀田ワンスター'
培地 BA 10^{-5} M 単独
カルス移植後約6週間

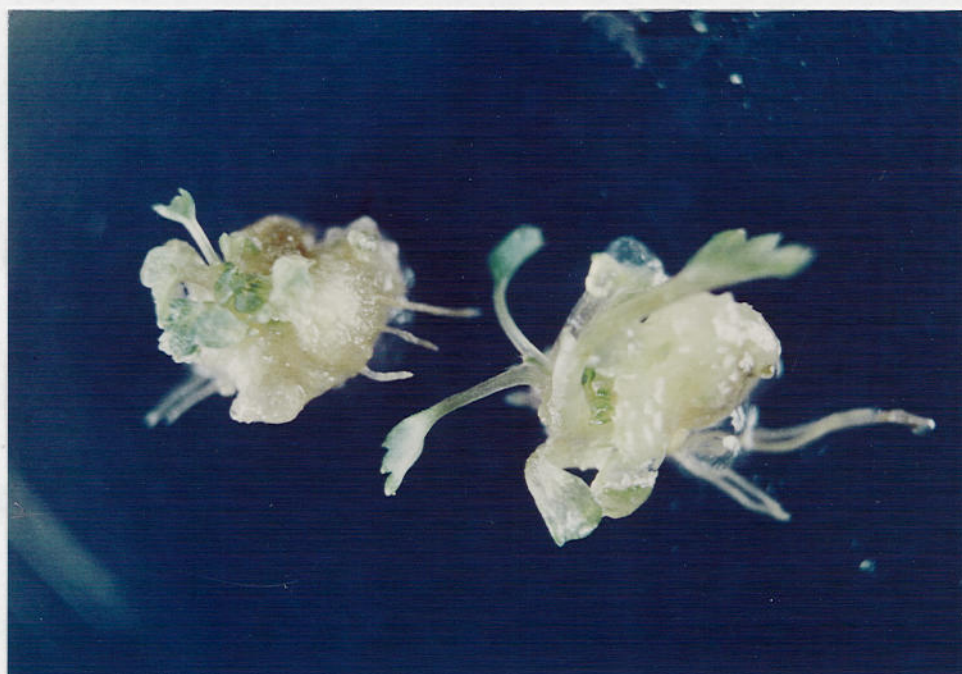


図4. 葯カルスから分化した茎葉と根
品種「堀田ワンダー」
培地 BA 10^{-5} M 単独
カルス移植後約6週間

いえず、ときに直径 10 ~ 20 mm のカルス全体が濃緑色となっても茎葉の発生の認められない場合もあった。再分化用培地に移植してから茎葉が分化するまでの期間は、カルスの状態によって大きな差があり、移植後 2 週間から 12 週間にまでわたることが観察された。

前述のように、BA の単独添加培地が茎葉分化に優れた効果を示したので、BA を 10^{-6} M から 10^{-4} M までの濃度で、カルスの再移植を行い、8 週間後の培養結果を表 6 に示した。前回の実験結果と同様に NAA 10^{-5} M の共存する培地では、茎葉の分化は全く認められなかったが、BA 10^{-5} M の単独添加培地で 9 本 (17 本)、BA 5×10^{-5} M の単独添加培地で 4 本 (8 本) の試験管に茎葉の分化が認められた。この結果、イチゴの葯カルスを再分化用培地に移植して茎葉分化を図るためには、BA 10^{-5} M 単独添加培地の利用が適していると判断された。

表6. 移植カルスからの器官分化に及ぼす生長調節物質の影響(2)^a

培地添加物		移植 カルス 数 (A) ^b	茎葉 分化 カルス数 (B)	茎葉 分化 率 (B/A)	根 分化 カルス数 (C)	根 分化 率 (C/A)
NAA	BA					
M	M			%		%
0	10^{-6}	52	0	0	2	4
0	10^{-5}	52	9	17	5	10
0	5×10^{-5}	52	4	8	2	4
0	10^{-4}	52	0	0	1	2
10^{-5}	10^{-6}	31	0	0	1	2
10^{-5}	10^{-5}	31	0	0	2	4
10^{-5}	5×10^{-5}	31	0	0	0	0
10^{-5}	10^{-4}	15	0	0	0	0

2. 供試品種「堀田ワンダー」

カルス移植後8週間後の調査結果である。

b. カルス形成後2~4週間の比較的若いカルスを移植した。

1本の試験管に1個のカルスを置床した。

したがって、葯からのカルス形成の段階で用いる NAA と BA の添加物のうち、NAA の濃度を低くすることによって、形成されたカルスも移植することなく、茎葉分化を図ることも可能になるのではないかと考えた。そこで、NAA の濃度をそれまで用いていた濃度 ($10^{-5} M$) の $1/10$ ($10^{-6} M \equiv 0.2 \text{ mg/l}$) にして、BA $10^{-4} \sim 5 \times 10^{-7} M$ までの 6 種類の培地と組合せて用い、カルスを移植せずに茎葉を分化させる実験を行った。供試品種は‘宝交早生’と‘タナー’を用い、葯の置床 12 週間後のカルス形成並びに茎葉分化の様子を表 7 に示した。

品種別にみると、‘宝交早生’ではカルス形成・茎葉分化とも容易で、‘タナー’が比較的困難であるという、前回までの培養結果と一致していた。カルスの形成は、両品種とも NAA $10^{-6} M$ + BA $5 \times 10^{-7} M$ の培地上でも十分に認められることがわかった。BA の高濃度培地 ($5 \times 10^{-5} M$, $10^{-4} M$ の培地) で

表7. カルスに移植せずに直接茎葉を分化させる場合の生長調節物質の影響

供試品種	培地添加物		供試 試験管 数 (A)	供試 薬 数 (B)	カルス形成薬数 ^a (C)			カルス 形成 率 (C/B)	茎葉 分化 試験管 数 (D)	茎葉 分化 率 (D/A)
	NAA	BA			+	++	+++			
	M	M						%		%
宝交早生	10^{-6}	5×10^{-7}	12	59	4	13	32	83	0	0
	10^{-6}	10^{-6}	12	53	5	18	23	87	1	8
	10^{-6}	5×10^{-6}	16	67	8	21	27	84	2	12
	10^{-6}	10^{-5}	16	79	4	32	38	94	5	31
	10^{-6}	5×10^{-5}	16	74	25	16	5	62	1	6
	10^{-6}	10^{-4}	18	88	2	0	0	2	0	0
タナ	10^{-6}	5×10^{-7}	12	44	16	3	2	48	0	0
	10^{-6}	10^{-6}	12	45	17	4	3	53	0	0
	10^{-6}	5×10^{-6}	12	46	20	2	0	48	1	8
	10^{-6}	10^{-5}	12	52	21	3	1	48	1	8
	10^{-6}	5×10^{-5}	12	50	10	0	0	20	0	0
	10^{-6}	10^{-4}	12	46	0	0	0	0	0	0

2. カルス形成の程度を示す.

+: カルスの径 3mm 未満

++: カルスの径 3mm 以上 5mm 未満

+++: カルスの径 5mm 以上

はカルスの形成は抑制され、特に 10^{-4} M の培地では、両品種ともほぼ完全に抑制された。したがって、BA の添加濃度としては 10^{-5} M (2.25 mg/l) がそれより低濃度であることが適当であると考えられた。

茎葉の分化についてみると、‘ダナー’では NAA 10^{-6} M + BA 5×10^{-6} M の培地で 1 本 (8%)、NAA 10^{-6} M + BA 10^{-5} M の培地で 1 本 (8%) しか認められなかったもので、どの培地が適当であるかは明らかにならなかった。しかし‘宝交早生’では NAA 10^{-6} M + BA 10^{-5} M の培地で 5 本 (31%) の試験管で茎葉の分化が認められ (図 5)、他の 5 種類の培地に比べて特に優れていた。

以上の結果、イチゴの葯を置床してカルスを誘導し、そのまゝの状態で茎葉を誘導させる培地として NAA 10^{-6} M + BA 10^{-5} M の共存培地が適当であると考えられた。この方法によれば、カルス移植に伴う繁雑な作業が不要になり、茎葉の分化が簡便化された。



図5. イチゴの葯カルスを移植せずに誘導した茎葉
 供試品種「宝交早生」
 培地組成 左: $NAA 10^{-6}M + BA 5 \times 10^{-5}M$
 右: $NAA 10^{-6}M + BA 10^{-5}M$
 (すべての葯がカルス化して茎葉分化している)

第4節 薬培養による植物体の大量誘導と 育成株の染色体数

以上のようにして形成されたカルスと茎葉を、適当な培地に植え継ぐことにより、大量の植物体を獲得する方法について検討した。また、このようにして育成した個体の染色体数について調査した。

a) 幼植物の大量誘導法の検討

薬のカルスから分化した茎葉は、分離して基礎培地に移植して発根を促し、幼植物に育成させ、残った緑斑を含むカルスは、同一培地組成の新しい培地に移植することによって、多くの場合、その培地上で次々に新しい茎葉を分化させることができた。この手順を反復することによって、同一起源のカルスから容易に50個体以上の幼植物を得ることができた。例えば20 mm ϕ $\times$ 95 mmの試験管にカルスを分割して植え替えた場合は、1回の

移植で 10 ~ 20 本, 200 ml 及び 500 ml 三角フラスコに分割して植え替えた場合は, 1 回の移植で 20 ~ 40 本の新しい茎葉の分化が認められた(図6)。しかし, $BA\ 10^{-5} M$ 添加培地で分化した茎葉は, 1.5 ~ 2 か月もすると退化を始め, 3 か月もすると, 退色して枯死するものも多く, 早めに BA を含まない L₁ の基礎培地に移してやる必要であった。このことは, ある程度以上に BA が取り込まれると, 茎葉の生育に阻害的な作用があることを示すものと考えられた。

そこで, 茎葉を移植して幼植物を大量に育成するための培地として, BA 添加培地 ($BA\ 10^{-5} M$, $10^{-6} M$) 及び基礎培地 (BA 無添加培地) との比較試験を行った。移植後 8 週間の調査結果は表 8 に示すとおりである。

基礎培地では茎葉も根も生育良好で, 健全な幼植物が多数獲得され, しかも移植後 8 週間を経過しても退化せず, 比較的長期間にわたり良好な状態で維持しうることが認められ

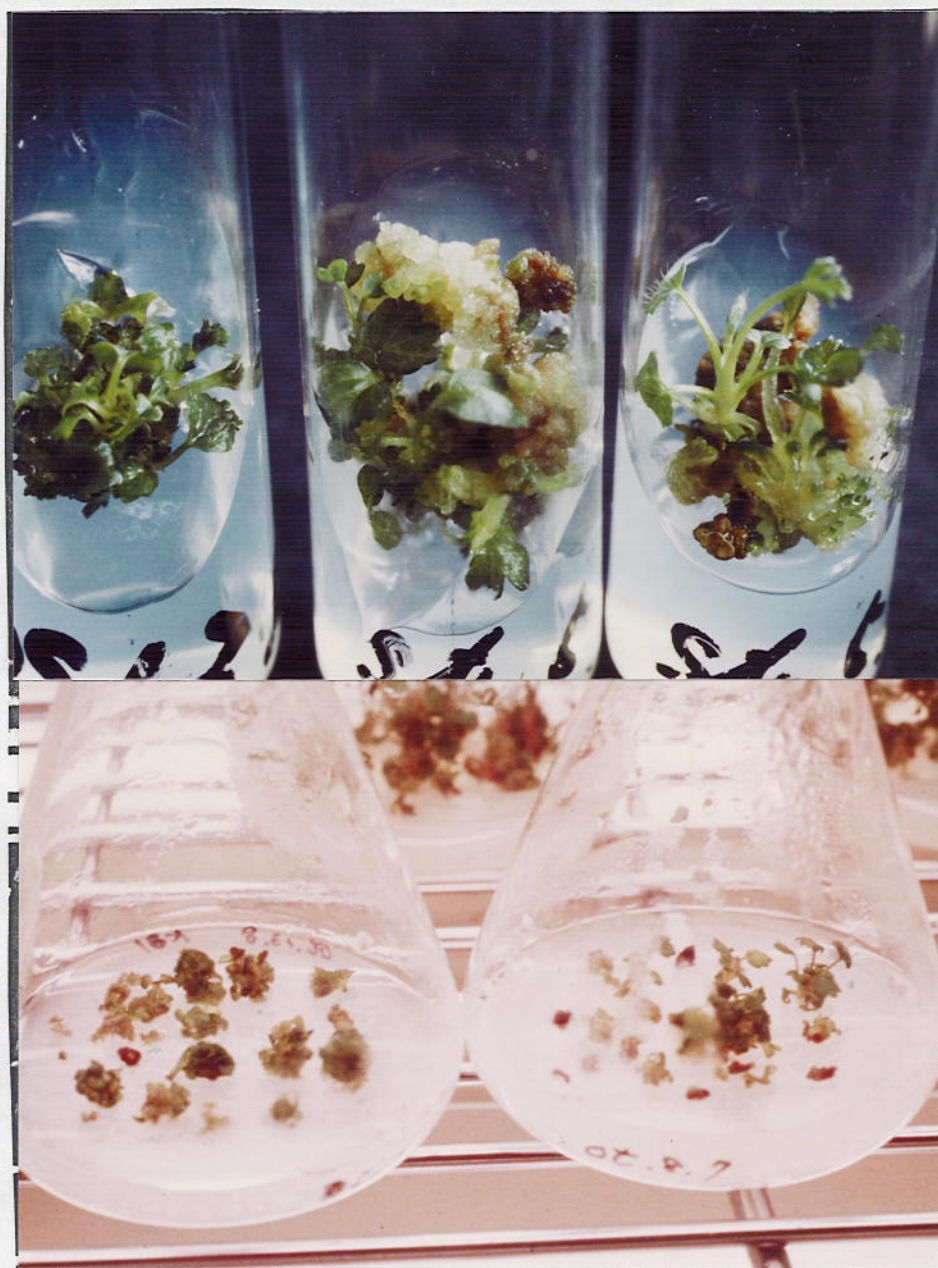


図6. 蔦カルスに移植による茎葉の大量誘導

供試品種
培地組成

‘宝交早生’

上(試験管): $BA 10^{-5}M$

下(三角フラスコ): $NAA 10^{-6}M + BA 10^{-5}M$

表8. 蔦カルスから分割移植した茎葉の移植後の生育^a

添加物	移植 茎葉 数	移植後の 茎葉の生育と伸長 ^b				移植後の 根の形成と伸長 ^c			
		—	+	++	+++	—	+	++	+++
BA									
M									
0	108	4	14	51	39	14	15	60	19
10^{-6}	102	12	20	58	12	58	29	13	2
10^{-5}	114	21	55	33	5	97	13	4	0

a. 供試品種 ‘宝交早生’

移植後約8週間目の調査結果である。

b. 移植後の茎葉の生育・伸長の程度を示す。

—: 移植後の茎葉の生育認めず, +: わずかな生育・伸長を認める

++: 良好な生育・伸長を認める, +++: 十分な生育・伸長を認める。

c. 移植後の根の形成と伸長の程度を示す。

—: 移植後の根の形成認めず, +: わずかに根の形成を認める

++: 良好な根の形成・伸長を認める, +++: 十分な根の形成・伸長を認める。

た。これに対し $BA\ 10^{-5}\ M$ 添加培地では、新しい多数の茎葉の分化が認められるが、これらの茎葉は萎縮しており、移植後6週間目ごろから退化し始めるものが多かった。 $BA\ 10^{-6}\ M$ 添加培地では両者の中間の様相を呈した(図7)。

移植した茎葉からの根の形成と伸長についてみると、基礎培地では供試した104本の茎葉のうち90本(87%)に根の形成が認められ、そのうちの75本は良好な伸長を示していた。これに対し、 $BA\ 10^{-5}\ M$ 添加培地では、供試した114本の茎葉のうち17本(15%)で発根が認められたにすぎず、その根の伸長程度も萎縮気味で、良好な伸長を示したのは4本(3.5%)にすぎなかった。

$BA\ 10^{-6}\ M$ 添加培地では、両者の中間の様相を呈し、供試した102本の茎葉で44本(43%)に発根が認められ、良好な伸長を示したものも15本(15%)認められた。したがって $BA\ 10^{-6}\ M$ (約 $0.2\ mg/l$ 程度) では

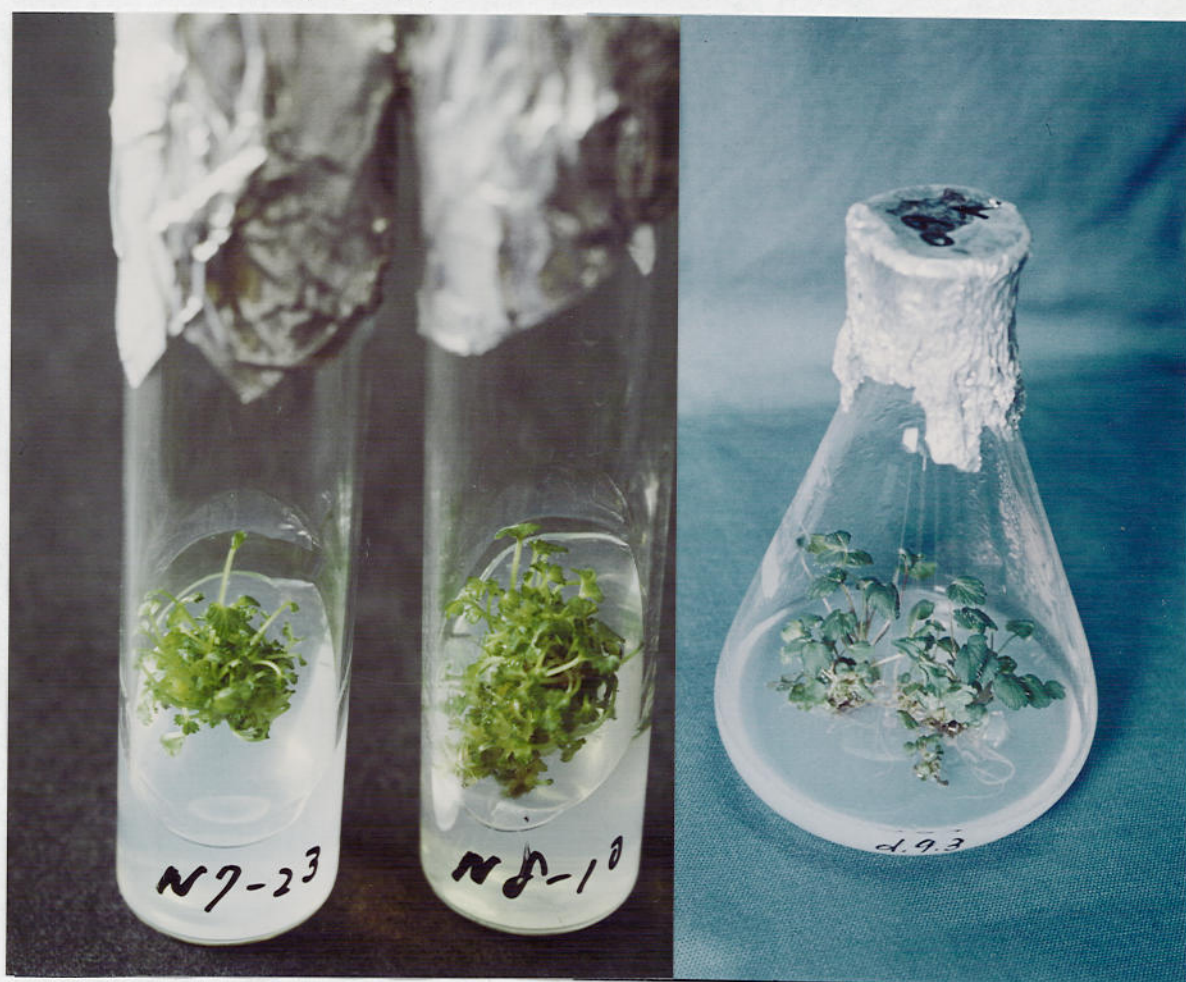


図7. 葯カスからの茎葉の移植培地組成の影響
 供試品種「室交早生」
 左: $BA 10^{-5}M$, 中: $BA 10^{-6}M$, 右: LS 基礎培地

BA の有する発根・伸長阻害作用は軽減されるようであった。

なお、BA 10^{-5} M 添加培地での茎葉は試験管内で萎縮状態であることが観察されたが、その茎葉を基礎培地に移植すると正常な個体になるので、これは培地中の BA による発根抑制作用の二次的な現象であり、茎葉の大量増殖法としての利用は可能であると判断された。

以上のことから、イチゴの薬培養による幼植物の大量誘導法としては、NAA 10^{-6} M + BA 10^{-5} M の共存培地又は BA 10^{-5} M 単独添加培地で、薬カルスから茎葉を分化させ、その分化した茎葉を基礎培地に植えて正常な幼植物を大量に誘導する方法が適当であると考えられた。この方法を多数の三角フラスコを用いて反復して、同一薬カルス起源の幼植物を 100 個体以上、必要に応じて何個体でも容易に誘導しうることを明らかにした（図 8）。



図 8. 薬培養によって誘導した大量の幼植物
(同一薬起源のカルスの分割による誘導)

6) 試験管内育成幼植物の馴化

試験管中の幼植物の根は、寒天培地中の水分や養分を吸収する力はあるが、そのままでは土壌中の水分や養分を吸収する力に乏しく、幼植物の大量誘導法の確立のためには、試験管内幼植物の馴化方法を明らかにする必要がある。本実験では以下の馴化方法を確立した。

基礎培地上で十分に発根が認められた 40 ~ 50 mm 以上の幼植物をバーミキュライトを入れたイチゴパックに植え出す。植え出し後 1 ~ 2 週間、急激な湿度変化を防ぐため、上部に通気穴のあいた別のイチゴパックをかぶせる。かん水は上からせず、下部に水をためて、パックの下面にあげた小穴から吸い込ませる。バーミキュライトは保水性が良いので過湿にならないように注意する。植え出し後 1 週間もすると新しい根の発生が認められ、3 週間もすると活着して葉が展開して肥大を始める(図9)。活着した個体は通常の床土を詰めた径 15 cm 鉢に植えかえて株を養成する。



図 9. 試験管内幼植物の馴化
 によって活着した多数の
 薬培養由来幼植物
 培地「バーミキュライト」
 馴化後 4 週間目

以上の方法によって、試験管中の幼植物をほぼ90%以上の率で、完全な成体にまで育成させることができた。

c) 育成個体の染色体数

薬培養で誘導した多数の植物体の染色体数については、根端を用いて行った。薬カルスについてもアセトオルセイン染色の押しつぶし法で観察したが、核の大きさに変動のあることが認められた程度で染色体数は不明であった。根端の観察も、イキゴの染色体は極めて小さく、かつ染色体数が多い(56本)ので、明確な像を見出した例はまれであった。特に試験管内幼植物の根端では観察不可能で、馴化中に生じた新しい根の根端を用いた時に観察が可能となった。コルヒチン0.2%液の前処理も効果があった。染色体数の調査に用いた株50個体の内、染色体数の確認しえた株は12個体(24%)にすぎないが、そのすべてが、染色体数56であり(図10)、通

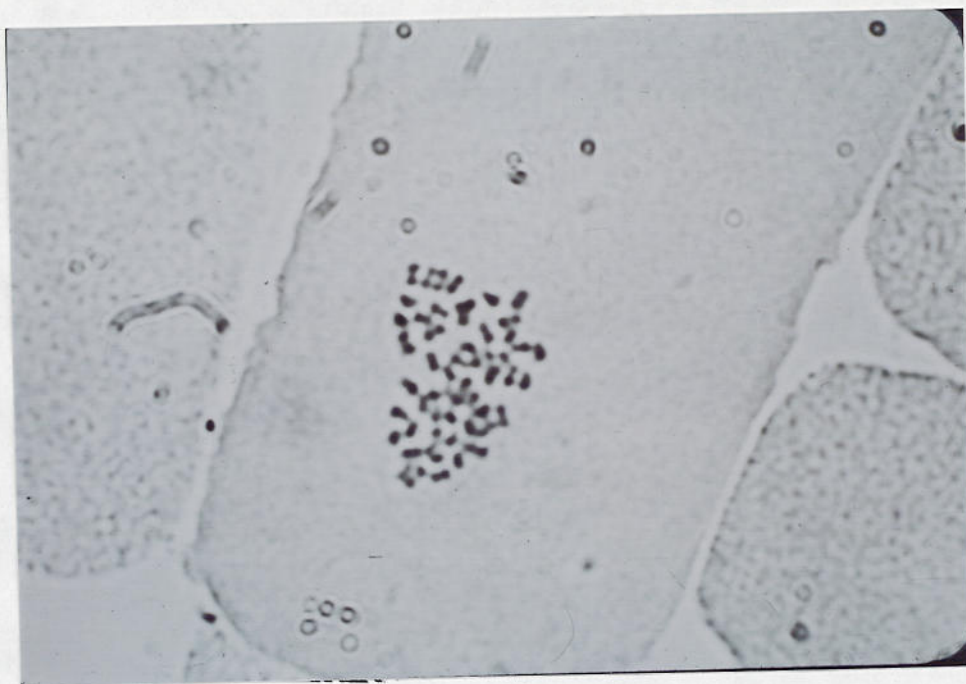
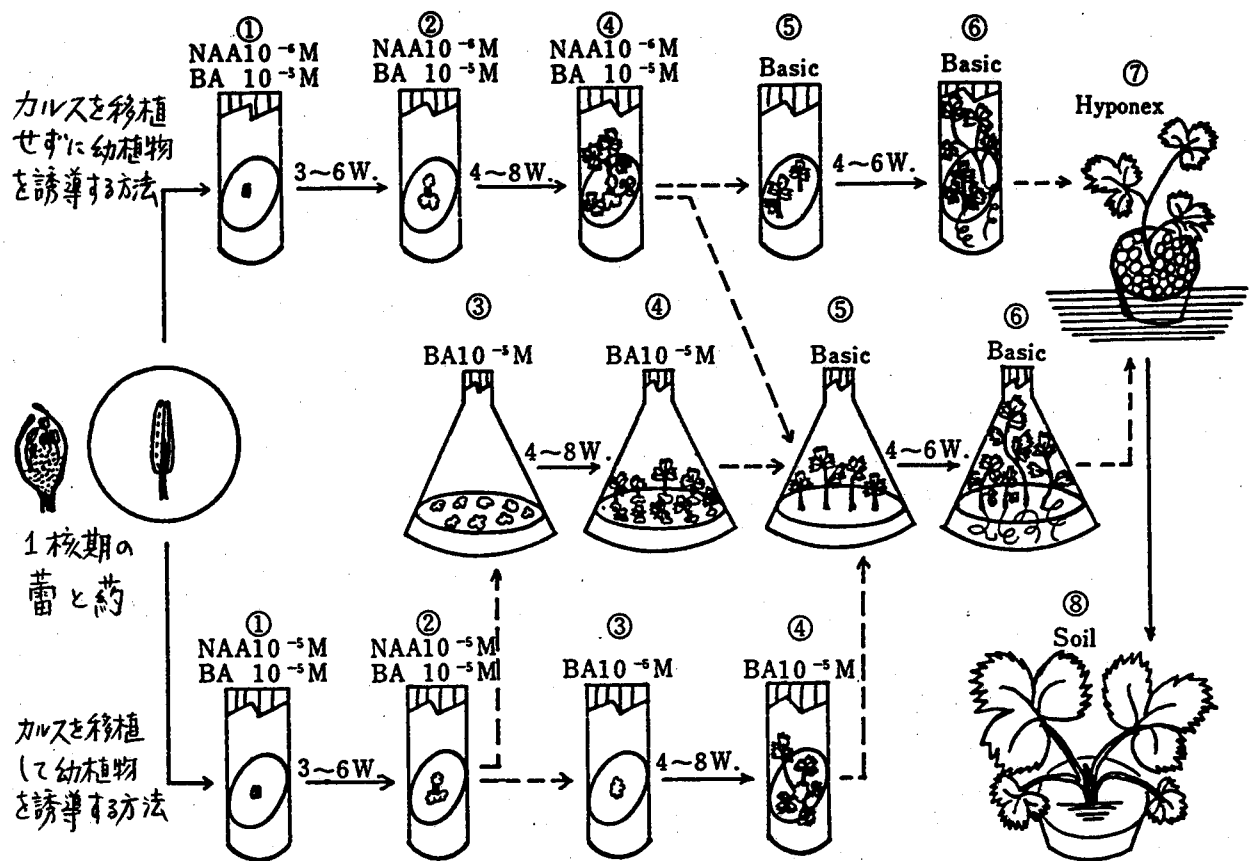


図 10. 薬培養で育成した植物の染色体像
 品種「宝交早生」の根端細胞
 $2n = 56$ 本の染色体が確認できる

常の栽培品種と同様の8倍体であった。検鏡に供した個体は、葯培養で育成した個体のうちのごく一部であり、しかも染色体数の確認しえた個体は12個体しかないので、断定はできないが、本実験による葯培養育成個体のほとんどは、葯壁や葯隔組織などの体細胞由来のものであると考えられた。

以上、イチゴの葯培養によって植物体を大量に獲得する方法をまとめて図11に模式化した。イチゴの葯からカルスを形成させ、そのカルスを再分化培地に移植して茎葉の分化を図る方法、又はカルスを移植せずに茎葉の分化を図る方法のいずれについても、実用に耐えうる方法を明らかにすることができた。

この方法は、多大の面積と労力を必要としていたイチゴのランナーによる従来の増殖法に比べて極めて優れていると考えられる。



①~⑧の説明 ① 葯の置床, ② カルスの形成, ③ カルスの移植, ④ 茎葉の分化
⑤ 茎葉の移植, ⑥ 幼植物育成, ⑦ 馬化 ⑧ 成体育成

図11. 葯培養によるイチゴ幼植物の大量誘導法

Ⅲ. 論 議

緒言で述べたごとく、1966年に報告された Guha らの先駆的研究⁽¹⁵⁾以来すでに60種を越える植物で薬培養による半数体の育成が報告されている^{(33), (57), (122)}。しかし薬培養実験の試みられている大部分の植物で、育種技術として利用しうるほど容易には半数体が得られず、実験が重ねられている段階である。

薬培養によって花粉起源の植物体を誘導する場合、二つの経路が知られている。その一つはキョウセンアサガオ⁽¹⁵⁾とタバコ⁽⁵⁵⁾で報告されているような、花粉が細胞分裂を繰り返して embryoid (胚状体) に発育し、これが胚に分化して幼植物となる例であり、他の一つはイネ⁽⁵⁹⁾やコムギ⁽⁸⁶⁾などのように花粉からカルスを形成させ、それらカルスから器官を再分化させて幼植物を得る方法であ

る。前者のように、花粉から直接 embryoid と分化させる方法は、当初のチヨウセンアサガオとタバコなど、ごく特殊な作物の例に限られていたため、他の植物での利用はかなり困難と考えられて、後者の、いったんカルスを形成させ、そのカルスから植物体を誘導しようとする試みが多くの作物で広く行われていた。しかしながらカルス経由の半数体育成も、当初期待されたほどに容易ではなかった (17), (24), (63), (79), (91), (106), (109), (115), (116)。

この種の試験では、薬からカルスが形成されなかったり、カルスから植物体が誘導されなかった場合の未発表の成績が現実にはなお多数あることが予想される。したがって薬培養の技法を実際の育種技術として発展させるためには、数多くの実験例の集積による原則的な手法の確立もさることながら、現実には障害となっている点は、作物ごとに異なっているといっている点で、今後は個々の作物ごとに、薬の置床から植物体の獲得（半数体の獲

得に限らず、二倍体の育成であってまでも)に至る各段階ごとの障害を、打開する努力が必要になっているといっている。

1) 葯の發育段階及び品種と葯からのカルス形成

タバコやイネなどでは、葯を置床すると、花粉以外の葯の組織はほとんど動かず、茶褐色となって退化し、内部の花粉のみが分裂してembroidになったり、カルスを形成したりすることが認められている(55), (59)。

しかし本実験のイチゴをはじめ筆者が用いた他の多くの野菜類やサツマイモ・ゼラニウム・パチュニアなど半数体育成に成功していない多くの作物では、花粉のみでなく、花糸切断面や、葯壁及び葯隔組織などの体細胞組織からも多くのカルスが形成され、むしろ花粉からのカルスよりも旺盛に生育していることが認められている(1), (24), (65), (84), (91), (115)。これらの事実は、植物体と誘導し得て

いない、他の多くの作物でも認められているところであって、むしろその方が一般的であるといつてよいと思われる。したがって、これら作物で薬培養を成功させるためには、他の薬組織からのカルス形成を抑制し、花粉のみからのカルスを誘導する方法の開発が当面の課題であると考えられる。またタバコやイネなどで、花粉のみが分裂して他の薬組織が動かない理由について明らかにすることも必要であろう。イネやコムギなどでは、一核期に当る薬の培養が半数体育成に最もよい成績を示している⁽⁷³⁾, ⁽⁸⁶⁾。本実験のイチゴの場合でも一核期の薬が最もよくカルスを形成したのであるが、この場合は結果的に薬柔細胞及び薬隔組織起源のカルスであつたので、同ステージの薬であっても、植物によって、花粉と花粉以外の組織の培養での反応が異なっているものと考えられる。また同一植物内でも品種によって反応に差があり、三位⁽¹⁹⁷³⁾ ⁽⁸⁵⁾によると、タバコの embryoid

形成に関する品種間の最適ステージの差は顕著で‘フライト・イエロー’では二核分裂期が良く、‘キサニチ’では一核期が最も良かったとされている。更に両品種とも四分子期以前にはembryoidの形成が全く認められなかったとして、中田ら(1968)⁽⁵⁵⁾の四分子期分裂説とは異なる報告をしている。タバコの場合、一核期から二核期初期の、限られた範囲のみで花粉が胚状体化(embryogenesis)する理由について三位⁽³⁵⁾は、その主因が一核から二核への体細胞分裂期に当ることにあるのではないかと指摘し、この時期には外部からの刺激(この場合は親植物から切り離されて培地上に置かれたということ)によって正常な花粉への発達が妨げられ、脱分化という方向に変わりやすくなったのではないかと述べている。しかし作物によっては、開花直前の成熟花粉を用いて成功している例(チョウセンアサガオ⁽¹⁵⁾、ブラシカ⁽¹⁹⁾)もあり、この点については更に詳しい検討が

必要である。

2) 培地条件及び品種と薬からのカルス形成
山田 (1971) によると, 一般に植物組織からのカルス形成すなわち脱分化には, オーキシンの存在が絶対に必要な条件であり, その種類と濃度が適当であれば, どのような植物の, どの器官からでもカルスの形成が可能と考えられるとしている (119)。NIIZEKI ら (59) はイネで, $2, 4-D \cdot 1 \sim 4 \text{ mg/l}$, あるいは $IAA \cdot 1 \sim 2 \text{ mg/l}$ を加えて花粉からのカルスを誘導し, トウモロコシでは内宮ら (106) が $NAA \cdot 4 \text{ mg/l}$ を, また村上ら (49) は $2, 4-D \cdot 2 \sim 5 \text{ mg/l} + IAA \cdot 0.3 \sim 0.5 \text{ mg/l}$ を必要としたと報告している。またアスパラガスでも八鍬ら (116) は, NAA が $0.01 \sim 1.0 \text{ mg/l}$ の範囲で加えられた培地で, すべての区にカルスが形成され, サイトカイニンが必要でなかったとしている。したがって植物組織 (この場合は薬) からの

カルス形成（脱分化）に対するオーキシン添加の効果は明白である。

本実験のイチゴでは、オーキシン単独添加培地ではほとんどカルス形成が認められず、オーキシン（ $NAA \cdot 2$, $4-D$ とも $10^{-5}M$ 程度）にカイネチン・ $10^{-5}M$ か $BA \cdot 10^{-6} \sim 10^{-5}M$ のいずれかが共存することによって、はじめてカルスの形成が認められた。またニンジンやラッキョウ、オーチャードグラス、タリスグラス、野生イネの数種のもののように、オーキシンやサイトカイニンを添加しても全く葯からのカルス形成の認められない植物も報告されている⁽⁶⁵⁾⁽¹¹⁵⁾。また同一植物でも品種によるカルス形成の明確な差違が認められており、新関ら⁽⁶⁰⁾によると、日本稲・インド稲・交雑 F_1 など22品種でカルスの形成率を比較したところ、‘農林33号’（8%）、‘紫稲（1）’（7.0%）、‘栄光’（5.0%）の3品種が高く、‘とりで2号’（0.8%）、‘奥羽244号’（0.9%）など

は低く、多くのF₁品種も0.5～1.0%であって、明らかな品種間差があったとされている。またGRESSHOFFら⁽¹³⁾はトマトの43品種を用いて薬培養を行い、半数性カルスを誘導し得たのはそのうちの3品種のみであったとしている。したがって供試する品種によって培養の成否が左右される場合もあるといってもよいほどである。本実験でも、‘宝交早生・堀田ワンダー’などの品種に比べ、‘はるのか・紅鷄’などの品種はカルス形成率が劣り、植物体の誘導も困難であった。このようなオーキシシンに対する作物間・品種間の反応の違いについて、その理由はまだ明らかでないが、一般的には作物や品種の違いによる内生のオーキシシンレベル・サイトカイニンレベルの差によるものと考えられている。しかし合成オーキシシンの種類に対する植物体の反応の差も知られるところであり、更にはそれら合成オーキシシンとの関連についても、現状では必ずしも明らかにされていない。いずれにしても、

作物や品種による反応がかはり異なるため、それに応じて培地添加物の組成・濃度を変えることが必要と思われるので、多くの実験の蓄積が待たれるところである。

3) 培地条件及び品種とカルスからの植物体誘導

本来、植物細胞は totipotency (全形成能) を持つ、すなわち、どの器官の細胞も完全な植物体を復元する能力を持つ、といわれている。そのような能力は細胞の核中にある DNA に完全な遺伝情報として保持されており、それゆえにこれらの情報を、いつ・どのようにして引き出すかによって、特定の器官の形成を導いたり、胚発生と同じような過程を経過させることが可能と考えられているのである。したがって、この引き金 (trigger) としての役割を何が担っているのかという点が、多くの研究者の関心の的でもあった。

この点について Skoog ら (1957) は、

タバコ髓組織より得られたカルスと、異なる濃度のカイネチンを含む寒天培地で培養し、その濃度に応じて、根あるいは茎葉が、それぞれ単独に再分化したことを報告した(97)。この実験をもとに彼らは根と茎葉の器官形成には順序と秩序性のあることが想定されると指摘しており(97)、このような秩序性はニンジンの場合(88)にも認められている。しかし、そのような秩序性のみられない作物もある。すなわち NISHIら(1968)によると、イネの場合にはカルスからの茎葉の形成に伴って、根の形成も同時に起こることが認められている(66)し、八鍬ら(1972)のアスパラガスの約カルスからの植物体誘導にしても、茎葉形成はBA・1.0 mg/l 区で集中的に認められるのに対し、根の形成はBA(0.1, 1.0, 10.0 mg/l)とNAA(0.01, 0.1, 0.3, 1.0, 3.0 mg/l)を組み合わせに、15種類のすべての培地で認められている(116)。本論文のイチゴの約培養でも、茎葉誘導の可

能となったものから根を形成させるのは容易で、分化した茎葉を基礎培地に植えかえるか、又は NAA 低濃度培地 ($10^{-7} \sim 10^{-6} M$) に移すことによって、簡単に発根させることができた。また茎葉誘導の不可能であった野菜類についても、カルスからの根の形成は、ほとんどすべての野菜類で認められ⁽⁶⁵⁾、茎葉形成に比較すると根の形成ははるかに容易といってもよかった。したがって本論文における植物体の誘導技術は茎葉の分化技術が主体となった。

約培養による茎葉の分化に関しても、品種間や種間、属間に差のあることが指摘されている。最も約培養の研究の進んでいるタバコにおいても、NITSCH (1972) によると、同じ *Nicotiana* 属の *N. tabacum*, *N. alata*, *N. rustica* 及び *N. glutinosa* の 4 種の 4 属については半数体が得られたが、全く同じ培養条件下で *N. acuminata*, *N. glauca* など 14 種の *Nicotiana* 属では成功しないという⁽⁶⁸⁾。

またイネでも限られた品種からしか植物体が得られないので、実用的に価値のある多くの系統から自由に半数体を作成することができず、この点がこの技術の実際の場面での大きな問題点になっている⁽⁷³⁾⁽¹⁰⁹⁾。また Gress-HOFF ら⁽¹³⁾によると、トマトで43品種（系統も含む）を供試し、そのうち半数性カルスの形成は3品種のみで認められ、半数体植物を誘導し得たのは1品種のみであって、供試する品種あるいは系統の重要性が強調されている。

本実験においても、この例ほど顕著ではないが、カルスからの植物体の誘導に若干の品種間差が認められ、‘ダナー’に比べると、‘宝交早生’の茎葉分化は高率であった。

培地組成については、約のカルスを移植して植物体を誘導する方法と、約を置床した培地上でカルスを移植することなく植物体を誘導する方法のそれぞれを明らかにしたので、今後の研究に有効に利用しうるものと考ええる。

4) 葯培養による植物体の大量誘導と 育成株の染色体数

本試験において、イチゴの葯培養による植物体の誘導法を明らかにしたが、この試験結果に認められた $BA\ 10^{-5}M$ 培地での、分化後の茎葉の生育抑制の現象については、Boxus ら⁽⁶⁾ が茎頂で、Rosati ら⁽⁹¹⁾ は葯で、それぞれ類似の現象を認めている。したがって、 BA の培地で分化した茎葉は、速やかに BA の含まれない基礎培地に（本試験では LS の培地に）移すことによって、その後の正常な伸長が認められるのであり、この方法で容易に大量増殖が可能となった。

試験管内幼植物の馴化方法については、組織培養技術の実用化のために避けて通ることのできない重要な課題であるにもかかわらず、比較的軽視されており、関連する論文もほとんど見当たらない現状である。本試験では、イチゴパックを利用した「簡易馴化法」を明らかにしたので、その利用価値は大きいと思わ

れる。

このようにして馴化して育成した蒴培養植物の染色体数は、親株と同じ8倍体 ($2n=56$) であった。そして解剖学的な観察から、これらは蒴壁や蒴隔などの体細胞組織由来のカルスから復元した植物であろうと判断された。同様な観察はイチゴで ROSATI ら⁽⁹¹⁾ や MAEDA ら⁽³²⁾ も認めており、他の作物でもその例は極めて多い^{(17), (24), (63), (79), (115), (116)}。

半数体作出のための蒴培養としては、本試験は不成功であったが、蒴培養によってイチゴのウイルスが除去されることが明らかとなったので、第4章で述べる。また、蒴培養育成個体の生産力等について数年にわたって調査を続けたところ、優良変異個体の作出の可能性が考えられた。このことについては第5章で述べることにする。

第4章 イチゴの薬培養によるウイルス フリー個体の大量育成

I. 材料及び方法

1) 供試材料

培養に用いた品種・系統と、それぞれの罹病ウイルスの種類及びその来歴は表9に示すとおりである。ウイルスの罹病程度の異なる材料を用いることによって、薬培養によるカルス形成や茎葉分化、さらにはそれら育成個体のウイルス除去の程度について、親株の有するウイルスの種類や罹病程度との関係を明らかにしようと考えた。

供試材料のうち、‘ダナー1, 2’は園芸試験場で品種保存用に維持していた個体であり、検定の結果、‘ダナー1’は Mottle virus の単独感染が、‘ダナー2’は Mottle virus と Mild yellow edge virus の重複感染が確

表9. ウイルスフリー個体育成の実験に供した材料の罹病ウイルスの種類・感染程度

供試品種	罹病ウイルスの種類	感染程度 ^a	導入先
タナ-1	Mottle	+	園試(平塚)
タナ-2	Mottle + Mild yellow edge	++	園試(平塚)
タナ-3	Mottle + Mild yellow edge + Crinkle	+++	栃木(佐野)
タナ-4	Mottle + Mild yellow edge + Crinkle	+++	栃木(佐野)
タナ-5	Mottle + Mild yellow edge + Crinkle	+++	栃木(佐野)
宝交早生	未検定	+	園試(平塚)
はるのか	未検定	+	和歌山
幸玉	Mottle + Crinkle	+++	園試(盛岡)
<u>F. vesca</u> EMC	Latent A	-	園試(盛岡)
<u>F. vesca</u> UC-1	Virus free	-	園試(盛岡)

a. 供試材料に認められたウイルス病徴の程度を示す.

—: ウイルスの病徴なく健全なもの

+: ごく軽徴 (新葉に若干の黄化, ねじれが認められるが, 草勢低下ほとんどない)

++: 軽徴 (株全体に黄化, ねじれが認められ, 草勢の低下も若干認められる)

+++: 明らかな病徴 (株全体の黄化, 萎縮が認められ, 草勢低下も明瞭)

(+++については 図-14 参照)

認められた個体を用いた。

‘ダナー 3, 4, 5’の3系統は、栃木県農業試験場佐野分場から入手した、産地の異なるウィルス罹病の重症株であり、検定の結果、3系統とも Mottle virus と Mild yellow edge virus と Crinkle virus の三重感染が確認されたものである。

‘宝交早生’と‘はるのか’は、それぞれ園芸試験場と和歌山農試で品種保存用に維持していた個体であり、ウィルス罹病は想定されるものの、未検定のまま供試したので、罹病ウィルスの種類は確認されていない。

‘幸玉’と‘Fragaria vesca EMC’及び‘F. vesca UC-1’は園芸試験場盛岡支場から送付されたものであり、‘幸玉’については Mottle virus と Crinkle virus の重複感染が確認されている個体を用いた。

‘F. vesca EMC’と‘F. vesca UC-1’はそれぞれ、イチゴのウィルス病の検定用指標植物として用いられているものであり、‘EMC’

は Latent A virus の単独感染が, 'UC-1' は無ウイルス (Virus free) であることが確認されているものである。

以上の 5 品種, 10 系統の供試個体は, 15 cm の素焼き鉢に植えて網室内で育成して用いた。

2) 薬の置床

網室内の鉢植え個体から蕾を採取し, この蕾から無菌状態で薬を摘出し, 花糸が付着しないように注意して, 1 本の試験管に 5~7 本置床した。蕾の殺菌は 99% エチルアルコールに 2~3 秒浸漬した後, ウイルソン液⁽¹¹⁴⁾ (高度サラシ粉 10 g を 140 ml の水に混和してよくかきませ, その上澄み液を用いる) に 10~15 分以上浸漬して行った。供試した薬のステージは, 第 3 章第 1 節の試験結果で適当と認められた一核期の花粉を含む薬を中心に用いた。

3) 培地及び培養条件

基礎培地には LS 培地⁽³⁰⁾ を用い, しょ糖 3%,

寒天 0.7 g を加え、それぞれの試験の表中に示した培地添加物を溶かした後、pH 6.0 に調整して用いた。それらの培地は 20 mm ϕ $\times$ 95 mm の試験管に 7 ~ 8 ml ずつ入れ、オートクレーブ (1 kg/cm² 圧・10 分間) で殺菌した。培養は 25°C プレハブ恒温室内で 12 時間フラントルクス照明 (試験管頭部で 3,000 lx の明るさ)・12 時間暗黒の条件下で行った。

4) 分化した茎葉の取り扱い

分化の認められた茎葉は、試験管内で茎葉部が 20 ~ 30 mm 以上に生育した時、2 個体以上に分かれているものは株を分割して、発根促進及び茎葉の健全な生育を目的とする培地に植え替えた。移植後十分に発根の認められたものから、順次殺菌済みのバーミキュライトを入れたイチョゴパックに植え出し、2 週間に 1 度ハイポネックス 1,000 倍液を加えて養分補給を行い馴化を図った。馴化により健全に活着したものは、通常の床土を入れ

た 15 cm 素焼き鉢に植え出した。

5) 罹病ウイルスの検定

イチゴのウイルス検定用指標植物として、
Fragaria vesca の 2 系統 (EMC, UC-1)
と Fragaria virginiana を用いた。検定方法に
は BRINGHURSTS (1956)⁽⁷⁾ の開発した小葉
接ぎ法を用い、罹病しているウイルスの種類
の判定には高井^{(100), (101)} の判定法 (表 10)
に従って決定した。

親株の検定は葯採取前に行い、葯培養育成
株については 15 cm 鉢に育成した個体の成
葉 4~5 枚の展開中のものを用いた。小葉接
ぎは接合部をセロテープで巻きつけ、毛糸で
軽く結び、1 株について 3~4 葉行った。接
ぎ葉の活着のためには湿度を保つことが重要
であったので、鉢にはポリ袋をかぶせ、よし
ずをかけて直射日光をさえぎり、人工気象室
(平塚) の 23°C (昼) - 18°C (夜) 室に
置いた。ほぼ 2~4 週間後に、接ぎ葉の活着
具合を見ながらポリ袋を除去した。接いだ葉

表10. イチゴウイルスの種類と指標植物における病斑

ウイルスの種類	指標植物		
	EMC	UC1-2	virginiana
Mottle virus (モットル・ウイルス)	- 不整形の黄色の小斑点 - EMC に Latent-A virus があるため、わい化の激しい場合がある - 小葉の大小、ねじれを伴う - UC-1 にクリンクルの病徴がでたらモットル+クリンクルと考える - UC-1 が比較的大きな斑点なら、モットル単独感染と考える	- 不整形の黄色の小斑点 - わい化は激しくない - 正常な形で小形となり、斑点ができる	
Crinkle virus (クリンクル・ウイルス)	クリンクル単独ではわかりにくい	- 不整形の小斑点 - れん葉、葉脈、葉柄の暗紫色 50日位で斑点や特有のねじれが現れる - この症状は次の葉で消える場合がある	古い縮、ねじれ
Veinbanding virus (ベインバンディング・ウイルス)	- 小葉が後方に反転する風車状になる、先が未展開のまま曲がる - 葉脈にバンド状の退緑部ができる  バンド状に退緑する	バンド状の病斑	わい化
Mild yellow edge virus (マイルド・イエローエッジ・ウイルス)	- 葉が紅葉し、数日で枯れる - UC-1 より紅葉の方が遅く、枯れ方がきれいではない	接ぎ木後30日位でモットル状の病斑ができ、モットルと思っているうちに比較的大きな葉から紅葉する。当初黄色が強く、後に紅葉する	古い葉から紅葉する

高井 (1966)⁽¹⁰⁰⁾, (1973)⁽¹⁰¹⁾ より作成

の1枚でも活着している場合に、接ぎ木接種ができたものと考え（活着率は、ほぼ80%程度）、活着しなかった株については再度小葉接ぎ法を試みた。接種2～3か月後に指標植物上のウィルス病徴の調査を行い、保毒ウィルスの種類を判定した。

II. 結果及び考察

第1節 ウィルス罹病株における培地の種類及び品種と葯からのカルス形成

前章で明らかにした、イチゴの葯培養の最適培地である $NAA\ 10^{-6}\ M + BA\ 10^{-5}\ M$ の共存添加培地を主体に、各品種とも6～9種類の培地に置床した。培養後3か月の調査結果を、品種及び培地別に示すと表11のとおりである。

‘ダナー’の5系統は、培地に対する反応に特別な差を認めなかったが、培養時期や供試培地等に若干異なる点があったので、それ

表11. ウイルス罹病株におけるイチゴ葯からのカルス形成と茎葉分化^a

供試品種	培地添加物				供試 管数 (A)	供試 葯数 (B)	カルス形成葯数 ^b (C)				C/B %	茎葉分化 管数 (D)	D/A %
	NAA	IAA	BA				+	++	+++				
	M	M	M	M									
タナ-A (系統1+2)	0	0	0	0	12	45	0	0	0	0	0	0	0
	10 ⁻⁶	0	0	0	12	46	0	0	0	0	0	0	0
	10 ⁻⁵	0	0	0	12	48	0	0	0	0	0	0	0
	10 ⁻⁶	0	5×10 ⁻⁷	0	12	44	8	8	3	2	48	0	0
	10 ⁻⁶	0	10 ⁻⁶	0	12	45	7	10	4	3	53	0	0
	10 ⁻⁶	0	5×10 ⁻⁶	0	12	46	5	15	2	0	48	1	8.3
	10 ⁻⁶	0	10 ⁻⁵	0	12	52	5	16	3	1	48	1	8.3
	10 ⁻⁶	0	5×10 ⁻⁵	0	12	50	3	7	0	0	20	0	0
	10 ⁻⁶	0	10 ⁻⁴	0	12	46	0	0	0	0	0	0	0
タナ-B (系統3+4+5)	0	0	0	0	30	125	0	0	0	0	0	0	0
	0	10 ⁻⁵	0	0	12	48	0	0	0	0	0	0	0
	10 ⁻⁶	0	0	0	49	196	1	0	0	0	0	0	0
	10 ⁻⁶	0	10 ⁻⁶	0	42	170	9	32	20	19	47	0	0
	0	0	10 ⁻⁵	0	26	105	1	1	0	0	2	0	0
	10 ⁻⁶	0	10 ⁻⁵	0	149	592	95	137	81	26	57	12	8
	10 ⁻⁵	0	10 ⁻⁵	0	60	238	32	46	15	6	42	0	0
	0	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	0	12	45	4	0	0	0	9	0	0
	0	10 ⁻⁵	10 ⁻⁵	0	12	41	5	0	0	0	12	0	0
宝交早生	0	0	0	0	30	121	0	0	0	0	0	0	0
	10 ⁻⁶	0	0	0	32	130	2	0	0	0	1	0	0
	0	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	0	12	50	2	3	0	0	10	0	0
	10 ⁻⁶	0	10 ⁻⁶	0	16	64	3	6	21	10	63	0	0
	10 ⁻⁵	0	10 ⁻⁶	0	16	64	0	4	18	10	50	0	0
	0	0	10 ⁻⁵	0	35	134	6	9	1	0	12	3	8
	10 ⁻⁶	0	10 ⁻⁵	0	61	256	2	39	85	20	57	9	15
	10 ⁻⁵	0	10 ⁻⁵	0	37	147	4	40	23	3	48	0	0
	0	10 ⁻⁵	10 ⁻⁵	0	12	48	0	9	0	0	19	0	0
はるのか	0	0	0	0	30	118	0	0	0	0	0	0	0
	10 ⁻⁶	0	0	0	36	141	1	0	0	0	1	0	0
	10 ⁻⁵	0	0	0	20	80	1	0	0	0	1	0	0
	10 ⁻⁶	0	10 ⁻⁶	0	28	96	9	42	3	4	60	0	0
	0	0	10 ⁻⁵	0	29	73	2	2	0	0	5	0	0
	10 ⁻⁶	0	10 ⁻⁵	0	95	381	6	192	43	22	69	1	1
	10 ⁻⁵	0	10 ⁻⁵	0	34	138	1	65	8	3	56	0	0
幸玉	0	0	0	0	20	67	0	0	0	0	0	0	0
	10 ⁻⁶	0	0	0	20	69	0	0	0	0	0	0	0
	10 ⁻⁶	0	10 ⁻⁶	0	20	70	2	10	0	0	17	0	0
	0	0	10 ⁻⁵	0	20	66	0	0	0	0	0	0	0
	10 ⁻⁶	0	10 ⁻⁵	0	20	72	1	16	3	0	28	0	0
	10 ⁻⁵	0	10 ⁻⁵	0	20	72	0	6	12	0	25	0	0
F. vesca (EMC+UC-1)	0	0	0	0	23	91	0	0	0	0	0	0	0
	10 ⁻⁶	0	0	0	23	93	0	0	0	0	0	0	0
	10 ⁻⁶	0	10 ⁻⁶	0	18	68	0	3	2	0	7	0	0
	0	0	10 ⁻⁵	0	12	36	0	0	0	0	0	0	0
	10 ⁻⁶	0	10 ⁻⁵	0	65	252	12	16	1	0	12	17	26
	10 ⁻⁵	0	10 ⁻⁵	0	20	77	1	3	0	0	5	1	5

a. 培養12週間後の調査

b. カルス形成の程度を示す. +: カルス径2mm未満,
 ++: 2mm以上3mm未満
 ++: 3mm以上5mm未満
 +++: 5mm以上

どれ一括して‘ダナー A’（系統 1・2：園芸試験場品種保存株），‘ダナー B’（系統 3・4・5：栃木農試佐野分場供与株）として表示した。

各品種に共通して言えることは，基礎培地のみ，あるいはオーキシシン（NAA，IAA）単独添加培地では，カルスの形成がほとんど認められず，また，BA 単独添加培地でもカルスの形成率は著しく低く，十分なカルスを形成させるには，培地にオーキシシンとサイトカイニン（この場合の BA）の共存することが必要であった。オーキシシンの種類について検討してみると，IAA と BA の共存培地では，‘ダナー B’では $IAA\ 10^{-6} M + BA\ 10^{-5} M$ の培地で 9%， $IAA\ 10^{-5} M + BA\ 10^{-5} M$ の培地で 12%，‘室交早生’では， $IAA\ 10^{-5} M + BA\ 10^{-6} M$ の培地で 10%， $IAA\ 10^{-5} M + BA\ 10^{-5} M$ の培地で 19% のカルス形成率であった。これらの数値は，両品種とも，NAA と BA の共存培地におけ

るカルス形成率の、おおむね 2~3 割にしか達していないので、イチゴ葯からのカルス形成には $NA A$ と BA の共存培地が適當であることを示すものといえる。また、‘ダナー A’のみで試みられた培地であるが、 $NA A 10^{-6} M + BA 10^{-4} M$ の培地では、全くカルスの形成がみられなかった。これは BA の高濃度添加による抑制作用の結果であると考えられるので、イチゴの葯培養に用いる BA の濃度は $5 \times 10^{-5} M$ 以上は不適當と判断された。

次に、ウイルス検定用指標植物として使用されている、2倍性の野生イチゴ *F. vesca* についてみると、ほとんどカルスを形成せず、最も高率であった $NA A 10^{-6} M + BA 10^{-5} M$ の培地でさえ、12名のカルス形成率を示したにすぎなかった。また、‘幸玉’もそれに次いで低率であり、イチゴの葯からのカルスの形成には、品種間に大きな差のあることが改めて認められた。

$NA A$ と BA の共存培地におけるカルスの

性状は、それぞれの濃度の組合せによって異なった。 $NAA\ 10^{-6}\ M + BA\ 10^{-6}\ M$ の培地では、白～灰白色の柔らかいカルスが多く、増殖も盛んであるが、カルス形成後2～3か月で褐色に変わるものが多くなった。 $NAA\ 10^{-6}\ M + BA\ 10^{-5}\ M$ の培地では黄～黄緑色の分割しやすい粒状カルスとなり、1～2か月もすると緑斑 (green spot) が散見されるようになり (図12)、最終的には最も高い茎葉分化率を示す培地となった。 $NAA\ 10^{-5} + BA\ 10^{-5}\ M$ の培地では、黄～黄緑色の分割しにくい硬いカルスが多かった。

第2節 ウイルス罹病株における培地の種類及び品種とカルスからの茎葉分化

a) カルスを移植しない場合の茎葉分化

前章で、カルスを移植することなく茎葉を分化させる培地として、 $NAA\ 10^{-6}\ M + BA\ 10^{-5}\ M$ の培地が適当であることを明らかに

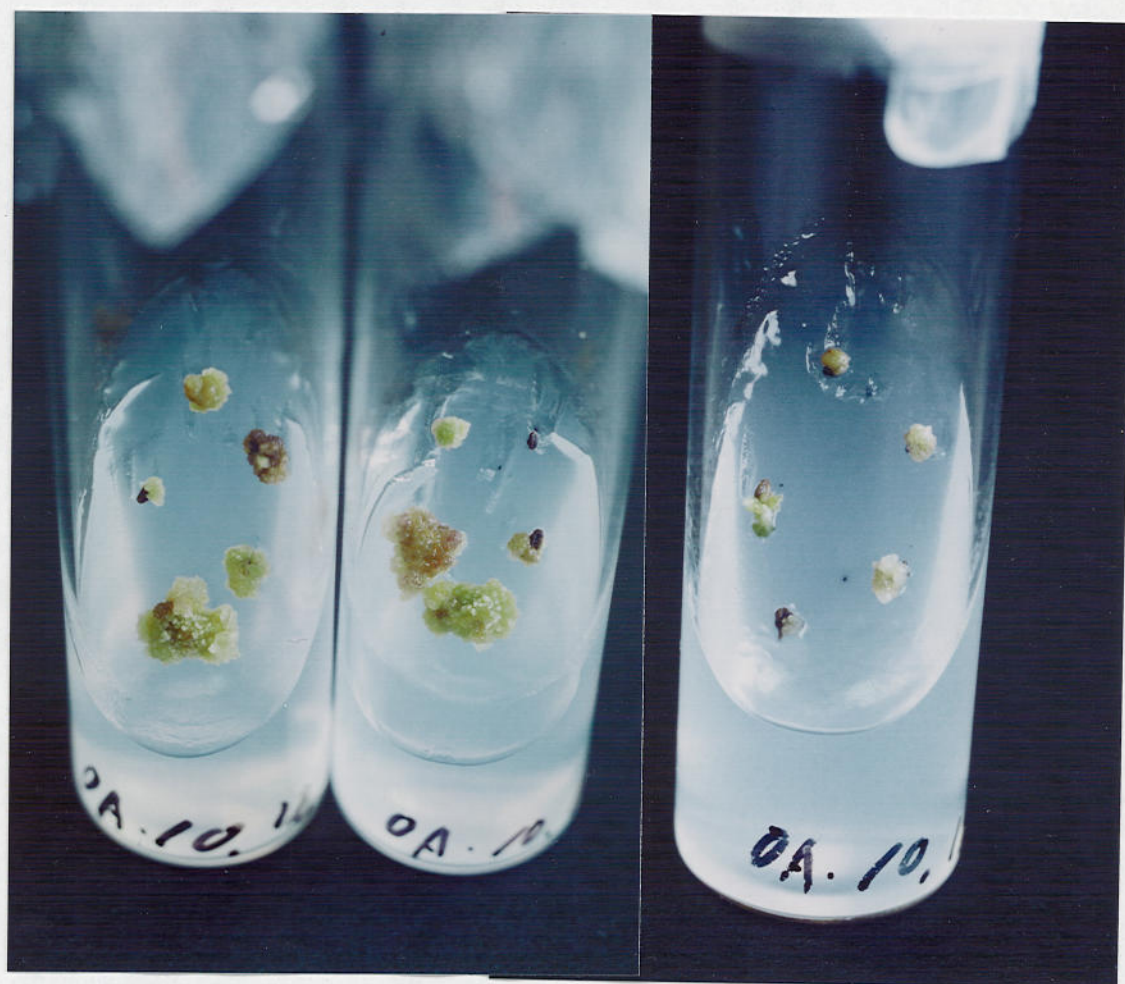


図12. $\text{NAA } 10^{-6}\text{M} + \text{BA } 10^{-5}\text{M}$ の培地における
イキゴ蔕からのカルス形成
左と中: 'ダナ- B', 右: '宝交早生'

したが、本試験でも前出の表ノノに見るごとく、同様の培養結果が得られた。

茎葉分化率は供試試験管数に対する茎葉分化の認められた試験管数の割合で示したものであるが、‘ダナーA’と‘ダナーB’で各8%、‘宝交早生’で15%、‘はるのか’で1%、*F. vesca*で26%であった。‘幸玉’は供試試験管数が少なかったためか、茎葉分化は1本も認められなかった。また‘はるのか’も最適と思われる培地で95本の試験管に381個の蒴を培養したにもかかわらず、わずかに1本の試験管で茎葉分化を認めたのみであった。これに対して *F. vesca* は、カルス形成率は前述のように5品種中最も低く12%であったが、形成したカルスからは容易に茎葉を分化し、茎葉分化率は26%となり、5品種中最も高くなった。

b) カルスを移植した場合の茎葉分化

前述のようにして形成したカルスで、まだ

茎葉分化の認められないものを移植（1本の試験管に分割したカルスの1つを移植）して茎葉の分化を図った結果を表12, 図13に示した。この場合、カルスの前歴は表11中の $NAA\ 10^{-6}\ M + BA\ 10^{-5}\ M$ で形成させたカルスを中心に用い、不足の場合にのみ、 $NAA\ 10^{-5}\ M + BA\ 10^{-5}\ M$ の培地でのカルスも用いた。‘ダナーA’については培養時期や培地条件が異なるため、同一条件での移植実験が行なえず、本試験から除外した。

前章の試験では、イチゴの薬培養のカルスの移植による茎葉分化用培地としては、 $BA\ 10^{-5}\ M$ 単独添加培地が適当であり、 NAA が $10^{-5}\ M$ 共存した場合には茎葉の分化が認められなかった。そこで本試験は、 $BA\ 10^{-5}\ M$ 添加培地を中心に、 NAA の低濃度培地（ $10^{-7} \sim 10^{-6}\ M$ など）とを組合せて、各品種5～9種類の培地を比較検討した。

まず‘ダナーB’と‘宝交早生’についてみると、基礎培地及び $NAA\ 10^{-6}\ M$, 10^{-5}

表12. ワイルス罹病株におけるカルスの移植によるカルス増殖と茎葉分化

供試品種	培地添加物			供試管数 ^a (A)	カルスの増殖 ^b (B)			B/A %	茎葉分化 管数 (C)	C/A %
	NAA	IAA	BA		+	++	+++			
タナ-3 (系統3+4+5)	0 ^M	0 ^M	0 ^M	48	8	0	0	17	0	0
	10 ⁻⁶	0	0	48	5	2	0	15	0	0
	10 ⁻⁶	0	10 ⁻⁶	48	12	8	0	42	0	0
	0	0	10 ⁻⁵	96	47	10	6	66	13	14
	10 ⁻⁶	0	10 ⁻⁵	95	12	42	22	79	6	6
	10 ⁻⁵	0	10 ⁻⁵	76	14	22	23	78	0	0
	0	10 ⁻⁵	10 ⁻⁵	48	40	1	0	85	0	0
宝交早生	0	0	0	27	8	1	0	33	0	0
	10 ⁻⁶	0	0	26	4	11	2	65	0	0
	10 ⁻⁵	0	0	25	3	8	6	68	0	0
	0	0	10 ⁻⁵	28	2	18	4	86	6	21
	10 ⁻⁷	0	10 ⁻⁵	27	8	5	10	85	2	7
	10 ⁻⁶	0	10 ⁻⁵	28	2	5	18	89	1	4
	10 ⁻⁵	0	10 ⁻⁵	25	0	3	20	92	0	0
	0	10 ⁻⁵	10 ⁻⁵	12	2	8	1	92	1	1
はるのか	10 ⁻⁶	0	5×10 ⁻⁵	27	12	10	0	81	0	0
	0	0	0	24	0	0	0	0	0	0
	10 ⁻⁵	0	0	24	5	0	0	21	0	0
	0	0	10 ⁻⁵	24	6	2	5	54	1	4
	10 ⁻⁷	0	10 ⁻⁵	16	2	7	5	87	1	6
	10 ⁻⁶	0	10 ⁻⁵	16	1	4	8	81	0	0
	10 ⁻⁵	0	10 ⁻⁵	24	2	7	10	79	0	0
	0	10 ⁻⁵	10 ⁻⁵	24	7	11	0	75	0	0
幸玉	10 ⁻⁶	0	5×10 ⁻⁵	16	9	3	2	87	0	0
	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0
	10 ⁻⁵	0	0	6	1	0	0	17	0	0
	0	0	10 ⁻⁵	12	9	2	0	92	0	0
	10 ⁻⁶	0	10 ⁻⁵	12	0	2	7	75	0	0
<u>F. vesca</u>	10 ⁻⁵	0	10 ⁻⁵	12	0	2	8	83	0	0
	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0
	10 ⁻⁵	0	0	5	1	0	0	20	0	0
	0	0	10 ⁻⁵	8	4	1	0	63	5	63
	10 ⁻⁶	0	10 ⁻⁵	8	7	1	0	100	8	100
	10 ⁻⁵	0	10 ⁻⁵	8	7	1	0	100	7	88

a. カルス移植 10 週間後の調査, 供試管数 = 供試カルス数

b. カルス増殖の程度を示す, +: 2 倍未満,

++: 2 倍以上 3 倍未満,

+++: 3 倍以上,



図13. ウィルス罹病株の莖のカルス移植による茎葉分化

左: 'タナ-B' 右: '宝文早生'

培地は 左・右とも BA 10^{-5} M 单独添加培地
培養後 10 週間

M 単独添加培地ではカルスの増殖のみが認められ、ともに茎葉分化は全く認められなかった。両品種とも、茎葉の分化には $BA\ 10^{-5}M$ 単独添加培地が最適で、それぞれ 14, 21% の分化率を示した。 $NAA\ 10^{-7} \sim 10^{-6} M + BA\ 10^{-5} M$ の共存培地では 4~7% であり、 $IAA\ 10^{-5} M + BA\ 10^{-5} M$ の共存培地では 0.1% であり、茎葉分化率はオーキシンの存在によって低下した。 $NAA\ 10^{-5} M + BA\ 10^{-5} M$ の共存培地では、本試験においても全く茎葉の分化が認められなかった。

‘幸玉’については、葯からのカルス形成率が低かったため、移植カルス数が少なく、本試験においても茎葉の分化は認められなかった。また‘はるのか’では、 $BA\ 10^{-5} M$ 単独添加培地で 1 本、 $NAA\ 10^{-7} M + BA\ 10^{-5} M$ 共存培地で 1 本の試験管に茎葉の分化が認められたが、カルスを移植しない場合と同様、‘宝交早生’や‘ダナー’に比べ、茎葉の誘導しにくい品種であると考えられた。

F. vesca では葯からのカルス形成率が低かったために、供試カルス数は十分でなかったが、移植したカルスからは、ほとんど茎葉の分化が認められ、 $BA\ 10^{-5} M$ 単独、 $NAA\ 10^{-6} M + BA\ 10^{-5} M$ 共存、 $NAA\ 10^{-5} M + BA\ 10^{-5} M$ 共存の培地で、それぞれ 63, 100, 88 % の茎葉分化率となった。この数値は、他の品種に比べて極めて高率であること及び、 $NAA\ 10^{-5} M + BA\ 10^{-5} M$ の共存培地でも茎葉の分化が認められたことのみで例外的な試験結果となった。

以上の結果を一般化すると、イチゴの葯からのカルス形成には、オーキシンとサイトカイニン（本試験の場合は BA ）の双方が適当な濃度で存在することが必要であり、これらカルスから茎葉を誘導させる場合には、 BA のレベルを維持しつつオーキシンを一定のレベル以下（本試験の場合は $NAA\ 10^{-6} M$ ）に下げるか、あるいはオーキシンを取り除く必要があるものと考えられた。

第3節 ウイルスの罹病程度と葯からの カルス形成並びにカルスからの 植物体の大量育成

一般の栽培品種を葯培養しようとする場合、親となる株は数種のウイルスに単独あるいは重複して罹病している可能性がある。そこで本節においては、ウイルス罹病の程度、すなわち、罹病しているウイルスの種類、数及び外観的病徴の軽重等を異にする7種類の親株を供試して、ウイルスの罹病程度とカルス形成並びに植物体の誘導（茎葉の分化）との関係を明らかにしようとした。

供試した7種の親株とも、L₈の培地を基礎培地に $NA A \ 10^{-6} M + BA \ 10^{-5} M$ の共存培地で培養した3か月後の培養結果を表13に示した。ウイルスの罹病程度は、葯採取時株の親株の罹病ウイルスの種類及び草勢の強弱、ランナーの発生量などから判定したが、保毒ウイルスの種類が不明であった‘はるの

表13. 罹病ウイルスの種類・感染程度と薬からのカルス形成・茎葉分化^a

供試品種	罹病 ウイルス の種類 ^b	感染 程度 ^c	供試 管数 (A)	供試 薬数 (B)	カルス 形成 薬数 (C)	(C/B) %	茎葉 分化 管数 (D)	(D/A) %
ダナーA (系統1+2)	M(+MY)	+~++	12	52	25	48	1	8
ダナーB (系統3+4+5)	M+MY+C	++	149	592	339	57	12	8
宝交早生	未検定	+	61	256	146	57	9	15
はるのか	未検定	+	95	381	263	69	1	1
幸玉	M+C	++	20	72	20	28	0	0
<i>F.vesca</i> EMC	LA	+	38	150	17	11	10	27
<i>F.vesca</i> UC-1	virus free	-	27	102	12	12	7	26

a. 供試培地は各品種・系統とも $NAA 10^{-6}M + BA 10^{-5}M$ 添加培地
培養後12週間目の調査結果

b. イ4ゴウイルスの種類 M: Mottle virus, MY: Mild Yellow edge virus,
C: Crinkle virus, LA: Latent A virus

c. 供試材料に認められたウイルス病徴の程度を示す。(表9参照)

-: ウイルス病徴なし, +: ごく軽微, ++: 軽微, +++: 明らかな病徴

か' と '宝交早生' については, 親株の生育程度及びランナーの発生量のみから判断して示したものである。

まず, 'ダナー' についてみると, 系統 A は園芸試験場の品種保存株で, Mottle virus の単独感染株及び Mottle virus と Mild yellow edge virus の重複感染株の両者を含むもので, 外観的にはほとんどウイルス症状を呈していない株であり, 系統 B は栃木農試佐野分場から送付された Mottle virus と Mild yellow edge virus と Crinkle virus の三重感染判明済みの株で, 外観的にも葉縁が黄化し, 新葉が萎縮し, ランナー発生も少ない草勢の衰えた株であった。カルス形成率は系統 A で 48 %, 系統 B で 57 % であり, 茎葉の分化率は系統 A 及び B とともに 8 % と差が認められなかった。カルス形成に関しては, ごくわずかであるがウイルス症状の激しかった系統 B の方が優れていた。

F. vesca では Latent A virus を有する

EMC系と、これを有しないウィルスフリー個体であるUC-1系との比較を行った。蒔からのカルス形成はそれぞれ11%、12%であり、カルスからの茎葉分化は27%、26%であって、両者の間には全く差が認められなかった。

また‘幸玉’、‘宝交早生’、‘はるのか’についてみると、‘幸玉’は Mottle virus と Crinkle virus の重複感染株で、草勢の衰えた、ランナーのほとんど発生しない株であり、‘宝交早生’と‘はるのか’は、ともに品種保存中の株で、草勢の低下などが顕著には認められていない株を用いたものである。‘宝交早生’からは茎葉分化が多数認められたが、‘はるのか’と‘幸玉’からはほとんど認められず、これら品種間で、カルスの形成や茎葉の分化の難易に関して、ウィルスの罹病程度の軽重や草勢の強弱による一定の傾向は認められなかった。

以上のように、本実験の結果からは、ウィ

ルスの罹病がカルス形成能や茎葉分化能を低下させているとは考え難く、培養結果に生じている差は、品種の違いによると考えるのが妥当であると思われた。

第4節 培養育成個体のウイルス検定

すでに述べてきたように、本章では罹病しているウイルスの種類及び病徴を異にする親株を材料に薬培養を行い、各系統ごとに多くの培養株を得ることができた。これらの薬培養育成株の外観は親株に比べ、はるかに生育旺盛で、形状も伸び伸びとしており、‘ダナー’の三重感染の親株に認められていた葉縁の黄化や萎縮などのウイルス症状も消失していた(図14)。

検定用指標植物の株数の関係で、育成したすべての品種・系統についてウイルスの検定を行うことができなかったのも、罹病しているウイルスの種類が明らかであった‘ダナー’



図14. 薬培養に用いた親株（左：品種‘タナー3’）と
その親株から育成した薬培養株（右）
（葉縁の黄化や萎縮などのウイルス症状が消失している）

の5系統について、葯培養育成株を各系統3株ずつを用いて小葉接ぎ法による検定を行い、同時に、それぞれの親株についても再度検定を行った。その結果は表14、図15に示すとおりである。検定方法は試験方法の項で述べたとおりであり、葯培養によって育成した個体で、検定したすべての株が、各指標植物上に何らの病徴も示さず、ウイルスフリー化していることが明らかになった。

三重感染株であった、系統番号3、4、5の葯培養育成個体については、栃木農試佐野分場においても再度ウイルス検定を実施し、同様の結果を得ている(104)。

同時に行った親株の検定では、葯採取前の検定と同様に、激しい病徴が指標植物上に認められており、葯培養によって育成されたイ4ゴ幼植物は、親株の羅病ウイルスの種類及び病徴の軽重にかかわらず、ウイルスの除去されていることが明らかとなった。

表14. 薬培養に用いた「タナ」5系統の親株と培養株のウイルス検定

供試系統	検定個体	検定したウイルスの種類 ^a		
		Mottle	Mild yellow edge	Crinkle
タナ-1	親株	+	—	—
	薬培養株 1	—	—	—
	〃 2	—	—	—
	〃 3	—	—	—
タナ-2	親株	+	+	—
	薬培養株 1	—	—	—
	〃 2	—	—	—
	〃 3	—	—	—
タナ-3	親株	+	+	+
	薬培養株 1	—	—	—
	〃 2	—	—	—
	〃 3	—	—	—
タナ-4	親株	+	+	+
	薬培養株 1	—	—	—
	〃 2	—	—	—
	〃 3	—	—	—
タナ-5	親株	+	+	+
	薬培養株 1	—	—	—
	〃 2	—	—	—
	〃 3	—	—	—

a. ウイルスの種類は、検定用指標植物 F. vesca EMC, UC-1 および F. virginiana の3種類を用い、表10の判定法に従った。
 +: 指標植物への病斑の認められたもの, —: 認められないもの



図 15. ウイルス検定用指標植物 *Fragaria vesca* UC-1
 における「ダナ-3」の小葉接ぎ後2ヵ月後の様子
 左：培養に用いた親株（三重感染の症状有）
 右：薬培養育成株（ウイルス症状無）

Ⅲ. 論 議

イチゴに限らず、植物のウイルスフリー株の育成は、WHITE (1943)⁽¹¹³⁾ がトマトの根端とタバコの芽先を用いた実験で、植物の生長点近傍組織はウイルス濃度が極端に薄い、あるいはウイルスが存在しないという可能性を示唆し、植物体中のウイルスの分布の均一さについて言及したことによって、その端緒が開かれたものである。その後 MOREL ら (1952) は、無ウイルスの部分を取り出して、人工培地上で無菌的に育てることによってウイルスフリー個体が育成できるのではないかと考え、*Dahlia mosaic virus* に罹病していたダリアの茎頂部分を培養して、期待どおりのウイルスフリー株を育成することに成功した⁽³⁹⁾。この研究以来、世界中で多くの研究者が茎頂培養法によって各種植物のウイルスフリー個体を育成している^{(22), (40), (45), (67), (103), (121)}。

イ4ゴのウィルスフリー株育成についてみると、MILLERら(1963)⁽³⁶⁾が茎頂培養によって Mild yellow edge virus と Crinkle virus 及び Veinbanding virus などを除去したことを報告したのが最初で、次いで BOLTON (1966)⁽⁴⁾ は熱処理による Veinbanding virus と Latent C virus の不活性化を報告している。また下村ら(1964)⁽⁹⁴⁾ は茎頂培養によりフリー株を育成したが、高温処理併用の効果の高いこと、0.3 mm 以下に切り出せば全株がウィルスフリーになる可能性の高いことなどを示した。しかしこのような茎頂培養法は、切り出した茎頂組織を、いかにして正常な形態形成の方向に発育させ、成体にまで育成するかという点に眼が向けられていたため、培養中にカルス形成を招く培地は不適当として処理されてきた。そのため、従来の培養法による成体は、解剖顕微鏡下で、相当に高度な技術を駆使して切り出した一つの生長点から、一つ

の成体を得られるにすぎず、能率的なウイルスフリー株の獲得法とはならなかったのである。

薬培養によって育成した個体が、ウイルスフリーになるという考えは、当初かなり疑問視された。特に植物ウイルス病の専門家は、薬や花粉の組織は、一般的には植物体中でも特にウイルス濃度が高いと思われる部分であって、それらを培養したからといって、ウイルスフリー株が得られるとは考えにくいとの意見であった。しかし筆者ら（ノタフオ）⁽⁶³⁾ はイチゴ薬培養による植物体育成を報じた時、既にこれらの幼植物が、親株に比較して生育旺盛であり、ウイルスフリー化している可能性のあることを指摘したが、続いて、ABO. EL-NILら（ノタフノ）⁽¹⁾ はゼラニウムの薬培養によって植物体を誘導し、それらの植物体には親株のウイルス症状が消失していたと報告した。また、坂本（坂田種苗）もペチエニアの薬培養により育成した植物体に、

ウイルス症状の消失した株のあることを伝えて
いる(私信による)。これらの薬培養育成株は、
3者とも花粉粒起源のものでなく、薬組織起
源の全数体植物であったが、これによって薬
培養の重要な応用場面としてウイルスフリー
個体の育成が、注目されるに至った。特に果
樹類などウイルス病の被害が重要視されてい
る永年生木本類では、従来の茎頂培養法によ
っては、ウイルスフリー個体の育成が困難な
状態にあったので、フリー個体育成の新技術
として、この方法が期待されるにいたったの
である。

薬培養によってウイルスフリー個体が育成
された理由については、次の二つの可能性が
考えられよう。

① 少なくとも供試植物の薬組織にもとも
とウイルスが存在しなかった。

② 薬にはウイルスが存在していたが、薬
培養のカルス形成から、茎葉分化に至る過程
のどこかで、ウイルスが除去された。

まず①について既往の報告をみると、森ら(1970) (41) (42) はTMV感染のペチニアを材料にして、この生長点が花芽分化し、胚珠に胚が形成される過程でのウイルスの分布消長を、蛍光抗体法及び超薄切片法を用いて検討したところ、器官の発育とともに特異蛍光は器官全体に広がり、やがて雄ずいでも花糸から葯にかけて特異蛍光が見られるようになるのに対し、雌ずいでは分化後かなりの期間特異蛍光は認められず、胚のう内及び胚にはウイルス粒子が検出できなかったと報告している。したがって一般的には、葯組織はかなり発育の早期に、ウイルスを保毒するものと考えられるわけで、イチゴ・セラニウムの葯組織のみが例外的なものとも考え難いので、ウイルスの存在を否定する考えは一応不適当と思われる。

次に、②の考え方について検討すると次のとおりである。植物組織のカルスと、そのカルス中のウイルスの消長に関する研

究は、以前から数多く行われているが、そのほとんどは植物病理学者が、生体中でしか維持・増殖のできないウイルスの、新しい増殖系としてカルス組織の利用を図ったものであつて、TMVを使った試験が進められている。しかしウイルス増殖系として、カルス組織を利用することは、なかなか困難であり、近藤(1968)(25)によると、ウイルスに罹病したカーネーションの茎切片を培養して、形成されたカルスを継代培養すると、3~4回で病原性の認められないカルスが生じ、5~6回の継代培養でほとんどのカルスに病原性が認められなくなるとしている。また、森ら(1971, 2)(43)はTMVに感染したタバコの黄色葉から、MURASIGE & SKOOGの培地(50)でカルスを形成させると、培養3週間後には、そのカルス中のウイルス濃度が黄色葉のそれの $\frac{1}{30}$ の濃度までに急速に低下することを観察している。このように、通常の場合には、カルス中でウイルス濃度は継代培養3~

4回で極端に低下し、いずれは消失してしま
うものと考えられている。そこで特殊な添加
物を加えてウイルス濃度を高める試みが行わ
れ、森ら(1971. b)⁽⁴²⁾はDNA合成阻
害剤のhydroxy urea (100 p.p.m.)とRNA
合成阻害剤acridine orange (250 p.p.m.)
にその効果があり、それらを培地に添加した
場合カルスの発育が約 $\frac{1}{10}$ に低下し、ウイル
ス濃度は5~10倍に増加したことを報告し
ている。しかしこのような特殊な例を除き、
植物の組織培養に広く用いられるNAA・
IAA・2, 4-D・カイネチン・BAなどの
添加物は、逆に植物ウイルスの増殖を阻害
する物質として知られているので(下村ら、
1967)⁽⁹⁵⁾、本実験に用いた培地及び広
く一般に用いられる組織培養の培地では、カ
ルスを経由することもないで、ウイルスの増
殖は阻害される傾向にあるものと考えられる。

ウイルス罹病カルス組織から誘導した植物
体の、ウイルス保毒の有無については、既に

SVOBODOVA (1966) (99) が X, Y, S VIRUS に三重感染しているジャガイモを用いて、その塊茎組織からカルスを誘導し、それらカルスから出芽した幼植物を分離・育成したところ、ウイルスフリー植物の得られたことを報告している。また都丸 (1970) (105) もタバコ巻葉病ウイルスに感染しているカルスを継代培養し、LS培地に IAA 2 mg/l , カイネチン 3 mg/l を加えた培地上で、それらカルスから育成した15株の植物体はいずれもウイルス症状を示さず、カルスによる巻葉病ウイルスの継代維持は困難であったと記している。また森 (1973) (44) は PVY 罹病ジャガイモの芽先 (1~3 mm) を培養した実験で、寒天培地に置床後間もなく発芽して順調に育った植物体では、依然としてウイルスを保毒しているものが多かったが、置床後カルス的状态を経て発芽してできた植物体は、PVYの除かれている率が高いことを観察している。更に森ら (1970) (41),

ノ 9 7 / a ⁽⁴³⁾, ノ 9 7 / b ⁽⁴⁷⁾) はカルス
中におけるウイルスの消長を蛍光抗体法で調
べ、TMV罹病のタバコ髓組織から誘導した、
保毒カルス内のウイルス濃度は、一般植物体
内のそれと比べてかなり低く、4回継代培養
したカルスでは、特異蛍光を発する細胞集団
が部分的には存在するが、それ以外の部位に
はほとんど特異蛍光が認められず、カルス内
でウイルス感染細胞の、極めて偏在している
ことが示されていること、更に、これらのカ
ルスから発生した芽や根について調べてみる
と、その部分には全く特異蛍光がみられず、
無ウイルス状態にあるらしいことを報告して
いる。

以上のようにカルス形成から茎葉分化に至
る過程のどこかで、ウイルスの除去が行われ
ている可能性が極めて高いものと思われるが、
これらの研究のほとんどすべてが前述のごと
く、病理学者による、新しいウイルス増殖系
としてのカルス組織開発のために試みられた

ものであって、これらの知見を活用して、ウイルスフリー株育成に利用しようとした試みは行われず、報文にみる限りでは、筆者ら (ノタク) (62) (85) のイチゴの約及び生長点組織のカルス経路による、ウイルスフリー株大量育成の試験が最初であると考えられる。

しかし、近藤 (ノタノ) (27) によると、緑化した芽を形成しやすいカルスは、白色カルスに比べてウイルスの増殖率が高く、またカイネチンの添加はウイルスの増殖を促進したとの報告もある。このような差がいかなる理由によるものかは明らかにされていないが、筆者らは、ウイルス保毒カルスから分化した茎葉を、カルスから切り離す時期が、その植物体の無毒化に関与する一つの要因ではないかと考えている。森ら (43) の研究で感染カルスから形成された不定芽に、カルス中に偏在しているウイルスが伝わってゆくとしても、一定の期間が必要であると思われるし、KASSANIS (22) によれば、ジャガイモを材料にした実験

で、カルス組織内のウイルスの移動は、1週間に約1mm程度のごく遅いものであることが報告されている。したがってウイルスの偏在するカルスでは、茎葉分化後にカルスからそれを切り離す時期をできるだけ早くすることにより、ほぼ確実にウイルスフリー植物の育成が可能になるのではないかと考えられよう。森ら(1970) (41) (42) は、TMVはカルス細胞中で新たに合成もされるが、ウイルスの増殖速度より、カルス細胞の分裂速度がはるかに速いため、カルス細胞中のウイルス濃度が低下してゆくのであろうと結論している。ウイルスの種類にもよろうが、今後、カルス組織を利用して、ウイルスフリー株を大量に育成するという試みは、イチゴに限らず、他の多くの作物でも可能性が高いものと考えられる。

親株のウイルス罹病程度と葯からのカルス形成及び茎葉分化との関係をみると、本実験では罹病程度による差は認められず、品種に

よる反応差のみが認められた。本実験で用いた‘小葉接ぎ法’が、現在における植物体全体の保毒ウイルスの種類を検定方法として最善であるとしても、その結果がその子葉‘薬組織’のウイルスの罹病程度を表わすものではないかもしれない。一般のカルス培養中における、ウイルスの増殖実験においては、健全カルスと感染カルスとの間で、カルスの増殖に差を認めなかったとの報告(三沢, 1969)(37)や、反対に両者の間で明確な差が認められたとの報告(近藤, 1970)(26)もあるので、作物あるいは品種の違いなどによって、そのような反応差が見られるのかもしれない。イチゴのウイルスフリー株育成に、品種による差のあることは、森ら(1969)(46)の生長点培養でも観察されており、培養する生長点切片が小さいほど品種による差が顕著になり、‘グナー’が容易で‘福羽’や‘幸玉’は困難な品種であったと報告されている。本試験でみると、薬からのカルス形成について、

‘グナー’・‘宝交早生’・‘はるのか’の間には差がなく、容易にカルスが形成されるが、‘幸玉’・F. vesca はカルスを形成しにくい品種であった。またカルスからの茎葉分化は、F. vesca が最も容易で、培地が適当であれば、移植したカルスのほとんどから茎葉が分化し、‘宝交早生’・‘グナー’も比較的容易で、14～21%の茎葉分化率を示したのに対し、‘はるのか’・‘幸玉’は茎葉の分化しにくい品種であった。しかしこれらの品種間差は、本試験に供試した培地における反応の差であり、本来このような差は内生のオーキシンやサイトカイニンレベルの違いによって生じていると思われるので、他の培地を用いることによって、これら品種による差は、当然変動することもあると考えられる。したがって品種による差を、特別に強調することは、控えないけれども、現実の問題としては、‘幸玉’や‘はるのか’などで、ほとんど薬培養による育成個体が得られてい

ない状態にあるので、培地条件その他の検討を加えて、すべての品種で容易に培養が可能になるようにすることが、この技術のより広範な利用のために必要であろう。

本研究では、‘ダナー・宝交早生’を中心にして、ウイルスフリー株の大量育成技術を開発した。この技術はここ数年来のイチゴの急速な栽培面積増加を背景とした、一般農家のウイルスフリー株供給への要望に対応する技術であると考えられる。なお筆者らは薬培養で開発した技術を応用して、生長点組織のカルス形成による、ウイルスフリー株の大量育成についても報告しているが(85)、このいずれの方法を用いても、一つの药あるいは生長点に起源するカルスから、50株以上のウイルスフリー株を容易に育成し得るのである。

本研究におけるウイルスの検定で、薬培養によるカルス起源の培養株が、親株の保毒ウイルスの種類、及び病徴の軽重に関

係なく、検定したすべての株がウイルスフリーであったことは、森ら^{(41), (42), (43), (44), (47)}や OMURA ら^{(71), (72)}が明らかにしたカルス中におけるウイルスの偏在性、及びカルス中に生ずる不定芽や不定根には、ウイルスの特異蛍光が見られないとの研究成果などと、関連を持つものと考えられ、今後、これらに関する研究の一層の進展が期待されるところである。

第5章 イチゴの薬培養によって育成した 系統の生産力

I. 材料及び方法

1) 実験1：親株と薬培養育成系統の生産力 の比較

a. 供試材料

薬の採取に用いた親株と、1971年度中に薬培養によって育成した‘ダナー’、‘宝交早生’、‘福羽’の3品種を用いた。本実験の親株・培養株ともウィルス病の検定は行われていないものであった。

b. ランナーの増殖

旧園芸試験場蔬菜部圃場（神奈川県平塚市）において、1972年7～10月にランナーの増殖を行った。親株・培養株とも慣行による管理を行い、ランナーによる株の増殖中は寒冷紗を被覆してアブラムシを防除した。

C. 生産力の比較

ビニールハウス栽培における比較試験は、
‘ダナー’、‘宝交早生’、‘福羽’の3品種を用い、1972年11月1日に定植した。
1区8株で、親株は2反復、培養株は3反復として実施した。

露地栽培には‘ダナー’と‘宝交早生’の2品種を用い、1972年11月2日に定植した。
1区10株、親株は2反復、培養株は5反復として実施した。

2) 実験2：市販ウイルスフリー株と薬培養育成系統の生産力の比較

a. 供試材料

1974年までに薬培養で育成した‘宝交早生’品種、約3,000株の中から、培養に供した試験管別に系統名を付して30系統を選び、1975年に野菜試験場（三重県津市）の一身田圃場で育苗し増殖を図り、同時に市販の‘宝交早生’のウイルスフリー株を導入

し増殖を図った。1976年8～10月に一身田圃場で育苗し、各系統の苗の状態を揃えてから、同年10月に安濃圃場（三重県安芸郡安濃町）に定植した。それら30系統について、1977年5月10日～6月3日の間に収量調査を実施し、対照に用いた市販ウィルスフリー一株区（以下対照区）と比較して15系統を送り、以後の年次変動を調べた。すなわち、対照区に比べて5割以上の多収を示した5系統（A, B, C, D, E）、2～4割の増収を示した4系統（F, G, H, I）、ほとんど差の認められなかった18系統の中の3系統（J, K, L）、3割以上の減収を示した3系統（M, N, O）の計15系統である。年次変動の有無の調査用に選ばれたこれら15系統は、以後毎年、安濃圃場で育苗・定植を続けて、その後の生産力比較試験に用いられた。

6. 耕種概要

本試験は安濃圃場の黒ぼく土壌畑において

露地栽培で実施した。前作は、1976年定植（1977年収量調査分、以下同じ）及び1977年定植の場合ともハクランで、1978年はカボチャとサトイモ、1979年はレタスであった。各年次とも同一圃場での連作を避け、圃場整地後、乾燥牛糞 $180 \text{ kg}/10a$ 、炭酸苦土石灰 $100 \text{ kg}/10a$ 、 N 、 P_2O_5 、 K_2O をそれぞれ $12 \text{ kg}/10a$ 施肥した。うね幅は1mの2条植えとし、株間50cmに定植した。毎年3～4月に黒のポリマルチを施し、ヒョドリの被害を避けるため防鳥テープを利用した。

C. 試験区

各年次とも、各系統1区8株2反復とし、収量は果実の大きさ別に、特大（1果重15g以上）、大（10g以上15g未満）、中（6g以上10g未満）、小（6g未満）に分けて調査した。収穫始期や終期は年次により異なったが、ほぼ5月上旬から6月上旬までの1か月間が収穫期間であった。

II. 結果及び考察

第1節 親株と葯培養育成系統の生産力の比較

a) ランナー増殖の比較

親株と葯培養株とでランナーの増殖程度に大きな差が認められ、特に「ダナー」の葯培養株では親株の3倍以上のランナー発生量が認められた。また、「宝交早生」と「福羽」でも約2倍程度の発生量があり、供試した3品種を通じて、葯培養株の生育が旺盛で、ランナーの発生量の多いことが認められた(図16)。

b) 生産力の比較

ハウス栽培における収量調査は表15に、露地栽培における収量調査は表16に示した。

供試した3品種とも、葯培養育成系統が親株に比べて収量増となっていたが、特に「ダナー」ではその効果が顕著で、ハウス栽培では総重量で215、良果重量で266という



図 16. 葯培養育成株(左)と親株(右)の
ランナー増殖の比較
品種: '宝交早生'(手前)と 'ダナー'(奥)

表15. ハウス栽培における親株と葯培養株の収量調査^a

試験区 品種	‘タナト’				‘宝交早生’				‘福羽’			
	総 個数	総 重量	良果 個数	良果 重量	総 個数	総 重量	良果 個数	良果 重量	総 個数	総 重量	良果 個数	良果 重量
親株 1 区	120	1.02	35	0.49	142	0.96	35	0.46	221	1.55	45	0.68
“ 2 区	154	1.30	45	0.64	194	1.35	51	0.58	—	—	—	—
“ 平均	137	1.16	40	0.56	168	1.16	43	0.52	221	1.55	45	0.68
培養株 1 区	201	1.89	75	1.22	201	1.67	48	0.66	195	1.50	50	0.79
“ 2 区	240	2.61	98	1.71	235	2.11	62	0.96	231	1.80	74	1.19
“ 3 区	267	2.98	106	1.73	248	2.10	55	0.77	—	—	—	—
“ 平均	236	2.49	93	1.49	228	1.96	55	0.80	213	1.65	62	0.99
(比数) ^b	(172)	(215)	(232)	(266)	(136)	(169)	(128)	(154)	(96)	(106)	(138)	(146)

- a. ビニールハウス栽培, 1973年3月下旬～5月下旬収穫 各区8株合計
良果とは1果重が10g以上のものを示す.
- b. ()内は親株を100とした比数

表16. 露地栽培における親株と葯培養株の収量調査^a

品種 試験区	‘ダナー’				‘宝交早生’ ^b			
	総 個数	総 重量	良果 個数	良果 重量	総 個数	総 重量	良果 個数	良果 重量
	個	kg	個	kg	個	kg	個	kg
親株 1区	153	1.21	62	0.77	113	0.99	36	0.48
“ 2区	137	1.09	45	0.53	125	0.99	25	0.50
“ 平均	145	1.15	54	0.67	119	0.99	36	0.49
培養株 1区	228	2.04	71	1.00	188	1.39	40	0.54
“ 2区	214	1.87	66	0.87	144	1.40	61	0.85
“ 3区	257	2.20	68	0.90	173	1.46	51	0.76
“ 4区	173	1.83	88	1.15	280*	2.13*	75*	0.94*
“ 5区	235	2.41	96	1.33	365*	2.91*	103*	1.30*
“ 平均 ^c	221	2.07	78	1.05	230	1.86	66	0.88
(比数)	(152)	(180)	(145)	(157)	(193)	(188)	(183)	(180)

- a. 1972年11月2日定植，1973年5月上旬～6月上旬収穫
各区10株合計．良果とは1果重が10g以上のものを示す．
- b. ‘宝交早生’の項の*印は特に収量の高い系統であった．
- c. 収量比数を親株を100として()に示した．

極めて高い収量比数（親株を 100 とした場合の比数）を示し、露地栽培でもそれぞれ 180、157 の収量比数を示した。また‘宝交早生’でも、総重量、良果重量とも、ハウス栽培で 169、154、露地栽培で 188、180 の比数を示し、薬培養育成系統の生産力は親株に比べて優れていることが認められた。‘福羽’については苗数の関係でハウス栽培のみしか試験できなかったが、良果重量に関しては 146 の収量比数を示しているものの、総重量では 106 で、ほとんど差が認められなかった。

本試験に用いた親株は、数年間にわたって平塚（園芸試験場蔬菜部）で維持・増殖を続けていた品種であり、ウイルスに感染している株であることはほぼ確実である。したがって現時点で考察すれば、本試験で認められた親株と薬培養育成系統の生産力の差は、薬培養によってウイルスフリー化したことによつて生じたものと考えられる。

この場合、‘福羽’で認められた総重量の

生産力の差の少なさを、‘ダナー’と‘宝交早生’での顕著な差等は、それぞれの品種の持つウイルス抵抗性の違いを示唆しているものとも考えられる。

なお、‘宝交早生’では、薬培養育成系統の中に、収量性の極めて高い系統（表16中の培養株4と5）が認められた。これは単年度の結果だけなので明らかではないが、薬培養による高収性変異系統育成の可能性を示唆するものと考えられた。

第2節 市販ウイルスフリー株と薬培養育成系統の生産力の比較

前節の試験実施以降、薬培養によって育成したイチゴがウイルスフリー株になることが明らかにされ、その試験中に認められた親株と薬培養育成系統の生産力の差は、ウイルス罹病程度が異なっていたことに起因するものと考えられるに至った。また、イチゴの薬培

養による変異個体の発生も知られるようになり（植松, 1980⁽¹⁰⁷⁾, OOSAWA, 1982⁽⁷⁸⁾, NIIZEKI ら, 1983⁽⁵⁸⁾), イチゴの新しい育種技術として蒔培養の利用が考えられるようになった。

本試験は蒔培養育成系統を用い, 4年間にわたる生産力の変動を調査して, 初年度(1977年)における選抜の影響が, 年次ごとにどのように変って行くかを明らかにしようとしたものである。ウイルス病に対する条件を同一にするため, 府県ですでに実用化している市販のウイルスフリー株を導入して対照区とした。

対照に用いた市販ウイルスフリー株区(対照区)の各年次の収量は図17に示すとおりである。露地栽培での収量は気象変動その他の影響を直接受けるため, 年次による差が極めて大きかった。区間差は比較的小さかったため, 各年次とも2回反復の平均値で考察することが可能であった。

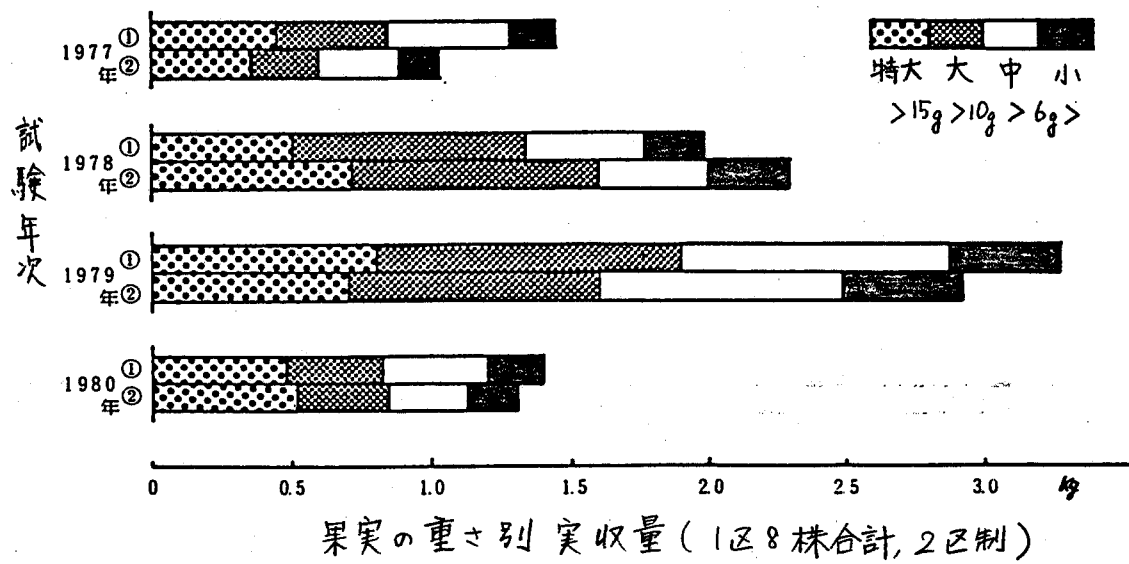


図17. 基準として用いた対照区の収量の年次変動
 (①, ② は区間の実数)

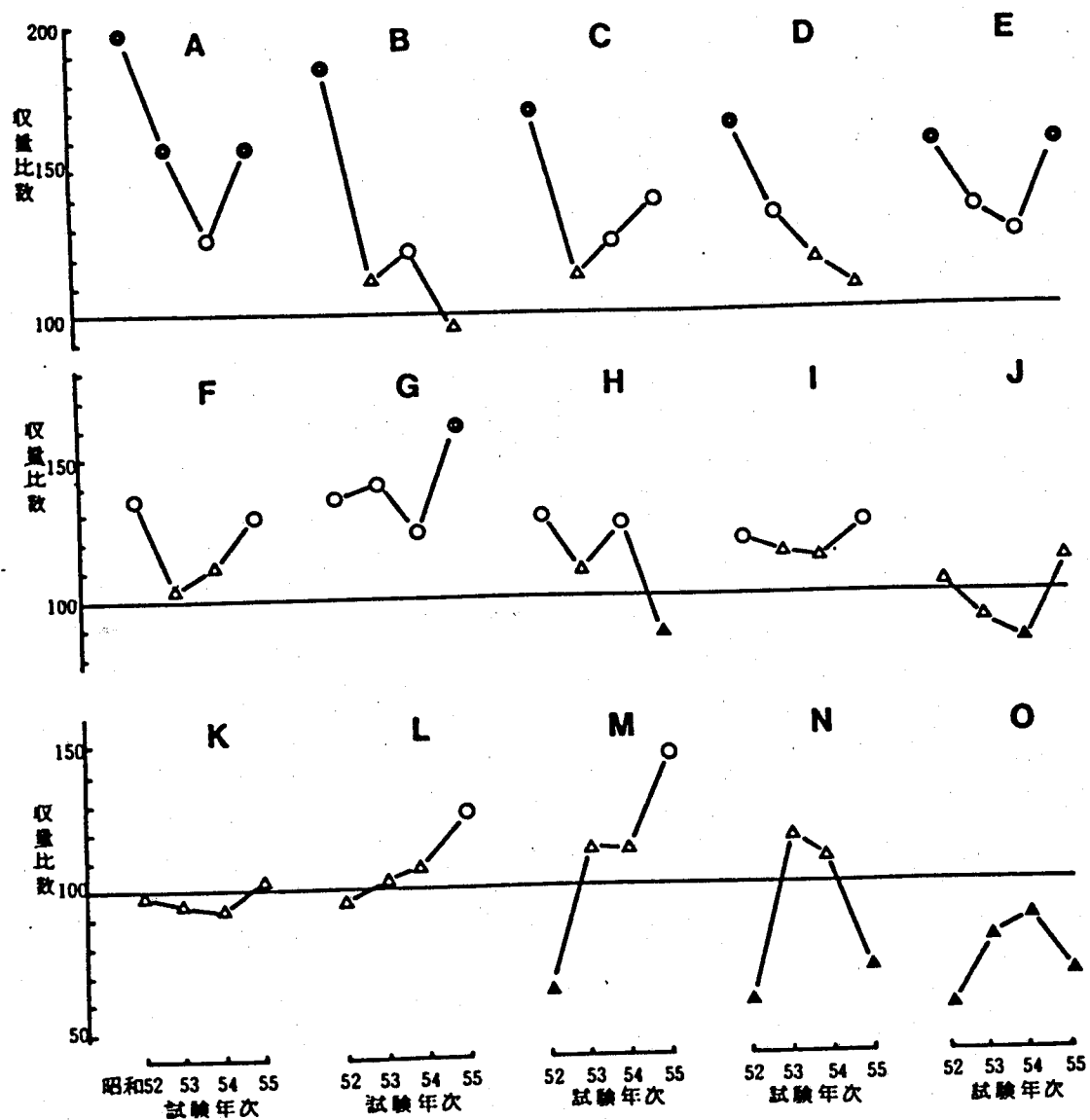
それによると、1977年と1980年は低収量の年であり、1978年と1979年は高収量の年であった。その原因として、1977年は一身田圃場で育苗した苗を安濃圃場に定植したため、苗堀り取りから定植までに時間を要し、苗の活着や根張りに影響が出たと考えられた。また1979年は前作がカボチャとサトイモで、その基肥に多量の堆肥を施していたため、通常の場合より多肥条件になっていたこと、天候に恵まれ、2日に1度の収穫調査がほとんど完全に実施されたこと、などの好条件が重なって高収量になったものと考えられる。1980年に一転して低収量になっているのは、天候予順によって、3~4日に1度の間引き調査になって腐敗果が多くなったことなどの理由が考えられた。

以上のように、収量は年次間で大幅に変動しているが、各年次ごとに对照区の収量を基準に、その収量比数を示すことによって、各系統ごとの収量性を明らかにすることができ

ると考えた。つまり、初年度に優秀な系統として選抜された A, B, C, D, E の 5 系統が、その優秀性を毎年発揮するとすれば、その収量比数は対照区の 100 を大幅に越え、もし 4 年間にわたって、その収量比数が安定して高ければ、その系統は薬培養で育成した優良変異系統として選抜効果が認められてよいのではないかと考えたのである。

その考えに従って、薬培養で育成して選抜した 15 系統の収量のうち、実用的な収量と考えられる中（1 果重 6g 以上 10g 未満）以上の果実の収量を、各年次ごとに、対照区の収量を 100 とし、相対的収量比数で示すと図 18 のとおりとなった。

各系統とも収量比数の年次変動が大きく、容易には選抜効果の発揮されていないことがわかった。初年度に対照区に比べて差の大きかった系統（特に高収量及び低収量であった系統）ほど、その後の変動の幅が大きく、差の小さかった系統（対照区とさほど差の認め



注1) 記号 ●: 対照区に対し 150 以上, ○: 120~149

△: 90~119, ▲: 90 未満

注2) A~O は '宝交早生' 葯培養育成系統名

注3) 各年次とも対照区を 100 とした場合の比数で示した

図 18. 葯培養イ4ゴ15系統の生産力の相対的年次変動

られなかった系統)は変動の幅が小さい傾向が認められた。15系統のうち、収量比数の年次変動の最も大きかったのはBとMであり、Bは初年度184であった比数か、最終年次には96となり、Mは初年度の65が最終年次には145となり、いずれも初年度の選抜効果が全くなかったことを示した。また反対に、年次変動の最も小さかったのはIとKで、Iは4年間を通じて115~128の間で、Kは93~102の間に安定しており、両者とも収量において対照区に近似した系統であった。

また、供試した15系統のうち、A、E、Gの3系統は、各年次間にかなりの変動が認められるものの、4年間を通じて、常に収量比数が120以上を示した系統であった。したがって、この3系統(図19, 図20, 図21)は薬培養で育成したイキゴの優良変異系統として利用しうるのではないかと考えられた。



図19. 葯培養で育成した優良系統A.
の圃場における着果の様子



図 20. 蒔培養で育成した優良系統 E
 の収穫果実の様子
 左：優良系統 E，右：対照区



図21. 葯培養で育成した優良系統G
の圃場における着果の様子

この3系統A, E, Gの年次別の収量を対照区に対比して示したのが図22である。ほとんどの場合、特大果及び大果の収量の増加がその中味であることがわかる。これらの3系統の収量性以外の形質については、果形、果色、糖度等について、収穫初期と中期に調査したが、対照区の「宝交早生」と何ら変わることはなかった。

以上の結果、年次による変動はあるものの、苗培養育成系統は、他の市販のウイルスフリー株と同程度の収量性を示すことはもちろんのこと、収量性に優れた変異系統の誘起の可能性も高いことを示すものと考えられた。

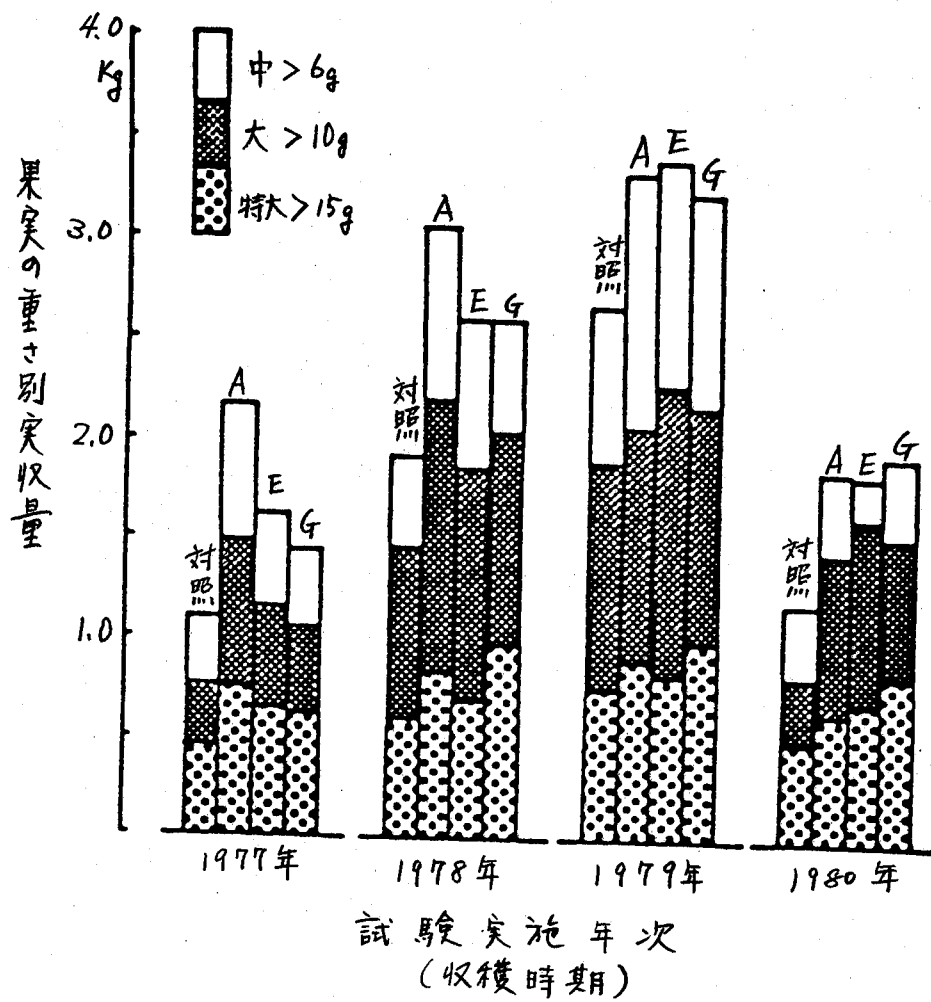


図 22. 蒔培養で育成した優良系統A, E, G
の収量の年次変動

Ⅲ. 論 議

薬培養によって育成したイチゴの生産力について、その親株やウイルスフリー株との比較を試みたところ、明らかに優秀な系統が見出されたわけであるが、実際のイチゴ産地でも幾つかの比較試験が行なわれている。

岡山市の吉備農協では、1974年以来野菜試験場から持参した薬培養育成株を増殖し、1977年1～3月にかけて実際栽培における生産力を調べた。品種は‘宝交早生’で薬培養育成苗と、笠岡市茂平地区で栽培されている優良苗（笠岡苗）、吉備農協で従来栽培していた苗（在来苗）の3系統が用いられた。薬培養苗はランナーの発生本数も多く、苗定植後のクラウンの肥大、根群形成、新葉の展開、葉面積のそれぞれが他の2系統よりすぐれていたことが報告されている（26）。一例としてビニルハウス栽培による1977年1月

4日から3月24日までの収量調査の結果を
図21に示した。中物果・下物果については
ほとんど差が認められなかったが、上物果に
ついては薬培養苗は在来苗の45%の増収と
なり、笠岡苗との比較でも20%強の増収と
なったという。

その他、静岡農試東部園芸実証圃、千葉県
原種農場などで薬培養育成株の実用化のため
の試験が行なわれており（静岡農試東部園芸
実証圃 1979⁽⁹⁶⁾、千葉県原種農場、
1981⁽⁸⁾、1982⁽⁹⁾）、さらに、高知
県、神奈川県、福井県、長野県など各地でイ
チゴの薬培養が試みられるようになった。薬
培養が各地で試みられるようになると、培養
中の変異個体の発生が問題になってきた。こ
の技術はイチゴの薬のカルス組織を利用した
茎葉の誘導であるので、変異個体の発生は本
試験結果が示すように当然考えられる問題で
ある。

このことに関して植松（1980）⁽¹⁰⁷⁾は、

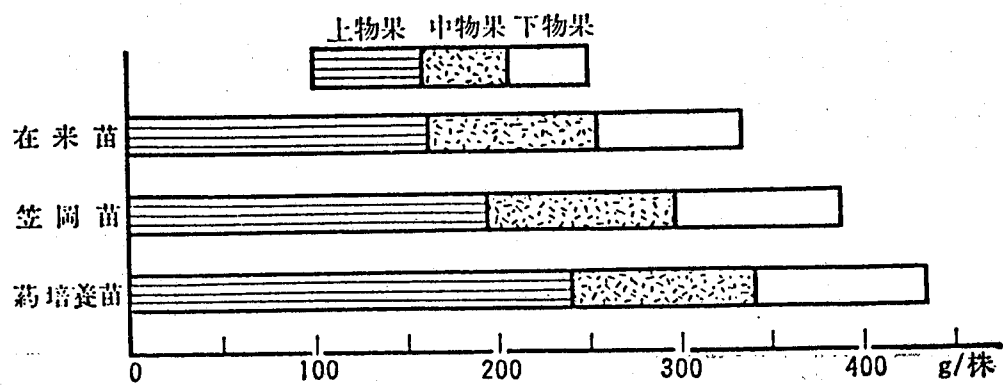


図23. 薬培養苗の生産力(岡山市吉備農協)
上物 $\geq 15\text{g}$ >中物 $\geq 10\text{g}$ >下物 $\geq 6\text{g}$

薬培養によって育成した‘宝文早生’のカルスとこれから分化した茎葉を、 10 ヵ月間に 10 代にわたって継代培養し、合計 $1,796$ 個体を作出し、カルスの系統別に、外観的に識別できる形質の変異を露地栽培で調べた。それによると、葉の斑入り 1 個体、葉柄やラシナーのわん曲 11 個体の計 12 個体(0.7%)に変異が認められたものの、予想外に変異出現率が低かったと述べている。筆者の発表したイチゴ薬培養法を用いて多数の幼植物を育成し、全株圃場に植えつけてカルスの系統別にその変異の有無の調査を続けた努力に敬意を表する。

筆者もイチゴに限らず、薬培養やカルス培養によって育成した植物体の中に幾つかの変異個体を見出しており(表17)(28)、本論文の高収性系統の育成もそのうちの1つの例であると考えている。したがって薬培養法によって変異個体の生ずる可能性は常にあると考えねばならないが、現在までの実験結果を総合

表17. 筆者が育成したカルス經由植物の変異株発生の様相⁽⁷⁸⁾

作物名	培養部位	変異株発生 の有無	変異株発生 の確率 (概略)	変異株の性質	生存および枯死
キャベツ	葎	有	1%	アルビノ	枯死
ブロッコリー	葎	有	1/5	アルビノ ワックスレス	枯死 生存
ハクサイ	葎	無	0	—	—
ハクラン	葎	無	0	—	—
ナス	葎	無	0	—	—
トマト	葎, 子房	無	0	—	—
ピーマン	茎頂, 頂葉	無	0	—	—
イチゴ	葎, 花弁, 茎頂	有	2	小葉	生存
イチゴ	葎	有	2	高収量	生存
ショウガ	茎頂, 葉	無	0	—	—
ヤマモ	葉, 茎頂	無	0	—	—
サトモ	葉, 茎頂	有	1	つる性	枯死
ニンニク	葉, 茎頂	無	0	—	—
ラッキョウ	葉, 茎頂	無	0	—	—
ネギ	葉, 茎頂	無	0	—	—

(1982.12現在)

すると、その出現頻度は多く見積もっても、せいぜい2~5%程度であると考えられる。

本試験の薬培養による変異系統の作出の事例を含めて、最近の植物組織培養では、カルス組織や単細胞を利用した変異個体作出とその利用が注目を集めている。

カルス組織とそれに由来する植物体については、その遺伝的安定性と変異性に関して多くの議論のあるところであるが、その結果は扱う植物の種類や培養部位、培地条件等によって大きく異なっている^{(61), (118)}。また、大量増殖と変異系統の作出とは互いに矛盾した面であり、それはカルス組織の有する二面性を示すものでもある。筆者らはすでに「組織培養による栄養繁殖性野菜の大量増殖と利用に関する研究」⁽⁸¹⁾の折に、その点について詳しく考察した。これらのことをふまえて、組織培養を利用した優良変異系統の作出については、次章の総合論議で触れる。

第6章 総合論議

筆者がイチゴの薬培養に取り組んだのは、一つでも多くの野菜で半数体を育成することにあつた。すでに述べたように、この一連の実験では、多くの薬培養由来のイチゴ植物体中に半数体は確認されず、その当初の目的は達成できなかった。しかし、薬培養によって育成したイチゴの培養植物は草勢が強く、外觀的に健全であることに着目して検討を続け、実験当初には予想もしなかった「薬培養によるイチゴのウイルスフリー個体の育成」という新知見を得ることになったのである。

1. イチゴの薬培養による植物体の育成

本実験期間の1969年～1980年の12年間に多くの作物で薬培養による半数体の育成が報じられた^{(33), (54), (57), (69), (122), (123)}。しかし、イチゴに関しては、FOWLERら(1971)

(10) が葯からのカルス形成を報じ、解剖学的な観察からそれらカルスは花粉起源ではなく、葯壁起源であったと述べており、筆者ら (1974) ⁽⁶⁵⁾, ROSATI ら (1975) ⁽⁹¹⁾, MAEDA ら (1978) ⁽³²⁾, LANERI ら (1980) ⁽²⁸⁾ が葯カルスから植物体を誘導したが、いずれも親株と同様に $2n = 56$ の染色体を持つ8倍体植物であったと報告している。したがってイチゴの葯培養では、本実験でも触れのように、花粉粒からのカルス形成も起るが、同時に葯壁や葯隔組織からも活発なカルスの形成が認められ、それらのカルスから植物体を得られやすいことを示すものと考えられる。

最近, NIEMIROWICZ-S. K. ら (1982) ⁽⁵⁶⁾ が葯培養によるイチゴ半数体の育成を報じた。彼らの実験手法は特に変わったところはなく, ROSATI ら (1975) ⁽⁹¹⁾ の手法に準じて行ったものであるが、供試品種に 'Redgauntlet' を用い、培地には Linsmaier

& Skoog⁽²⁰⁾ の無機養分に BA 0.1 mg/l + IAA 2 mg/l + 2,4-D 0.4 mg/l を添加した培地が用いられた。育成した 42 個体のうち、25 個体について染色体数を調べたところ、15 個体が $2n = 28$ (4x)、1 個体は $2n = 42$ (6x)、9 個体が $2n = 56$ (8x) であったと述べている。

このように最近になってようやく、イチゴの薬培養による半数体化が可能になってきたので、本試験で明らかにした植物体の大量育成法とを組み合わせることによって、半数体植物の大量育成も可能になると考えられる。

筆者らの開発したイチゴ薬培養法の応用という点に関しては、NIEZKIら(1983)⁽⁵⁸⁾ が薬培養によって誘導したカルスに PFP (para-fluoro-phenylalanine) を処理して染色体の減数化を回り、それらカルスから植物の誘導にも成功しており、今後多方面での利用が期待されている。

2. イチゴの薬培養によるウイルス

フリー個体の育成

イチゴの薬培養によってウイルスフリー個体が育成できるとした筆者らの最初の公表の折は、反響も大きく、疑問視する声も強かった。しかし、その後 Abo-EL-NIL ら (1971) (1) がゼラニウムで、森ら (1973) (44) がタバコで、大澤ら (1976) (80), 1977 (76) がニンクヤラッキョウで、OMURA ら (1978) (72), 1980 (71) がジャガイモやトマトで、山田ら (1979) (120) がフキで、ウイルスに罹病した組織を出发点にしてカルス組織を誘導し、そのカルス組織を利用してウイルスを除去するという研究が相次いで報告され、ようやくにして広く認知される事実となった。

植物病理学の分野における研究者達は、ウイルスを増殖・維持する“場”としてカルス組織に着目していたので、1970年以前にも幾つかのカルス組織から育成した植物体と

ウイルス症状消失に関する研究が見られる。
たとえば、SVOBODOVA (1966)⁽⁹⁹⁾ はジャガイモとタバコを用い、HANSENら
(1966)⁽¹⁶⁾ はタバコの髓部を用い、
PILLAIら (1969)⁽⁸⁹⁾ はセラニウムの節間や髓部を用い、WALKEYら (1968)⁽¹¹¹⁾ は *Nicotiana rustica* の 6 mm の茎頂組織 (100% ウイルスが検出されている) を用いて、それぞれにウイルスが除去された植物体を作成している。しかし彼らはカルス組織中でウイルスが維持できなかったマイトスのデータとして把握しており、これらの実験結果をウイルスフリー個体育成法の一つとして積極的に利用しようとする姿勢に欠けていたといえる。

本試験においても既に触れたように、本来半数体を育成する目的で開始したものであるが、誘導した植物体を観察する中で、予期しなかった“ウイルスフリー個体の育成法”に結びついたわけであり、このことが契機とな

って、過去の病理学的な面でのマイナスのデータが生かされるという事実は意義深いものと考ええる。

筆者らはその後、茎頂培養とカルス培養を併用したウイルスフリー個体の大量育成法をニンニクやラッキョウ、サトイモなどで明らかにしたが(70),(77),(80),(81),(98)、今後ともこれら野菜類の組織培養法を改良することによって、より一層効果的なウイルスフリー個体の作出技術が生まれるものと考ええる。

3. イチゴの薬培養によって育成した 個体の生産力

薬培養で育成したイチゴの中に生産力の優れた数系統の存在していたことについては、1982年の国際植物組織培養会議で発表し(DOSAWAら、1982)(82)、大きな反響を呼んだ。

筆者らの事例を含めて、最近組織培養を利用した変異個体の作出と利用がクローズアッ

アされ、カルス組織やカルス細胞の性質や機能が注目されている (74), (78)。

MURASHIGE (ノタフ4) (51) がその総説で、クローン繁殖 (clonal multiplication) の可能な植物として示したノメ5種 (カンキツ類の珠心胚繁殖とラン科植物のプロトコーム繁殖を除く) のうち、その繁殖の手段としてカルス組織が利用されている植物は、約半数の57種にも及んでいる。その後もアンスリウム (87), グロキシニア (90), ニンニフ (80), フキ (120) などカルス組織を利用した大量増殖の方法が報告されている。

しかし、最近に変異拡大技術として、カルス経路の植物体の利用の報告が相次いで、注目を集めている (大野ら (75), LIU ら (31), GENGENBACH ら (12), 大澤ら (82), MARTERN ら (34), WAKASA ら (110))。特に大野ら (ノタフ7) (75) がイネの種子起源カルスから誘導した植物 1, 121 個体 (D_1 世代) について、その後代 (D_2 , D_3 世代) の変異性を

調べた結果は、従来の常識を越えるものであった。同氏は438の穂別 D_2 系統のうち、34系統で種々の葉緑体突然変異が出現したと、また762の D_3 系統について、種子稔性・草丈・出穂日・形態・葉緑体変異を調査した結果、5形質ともに親と同一の個体は28.1%にすぎず、他は何らかの変異性を有し、28.0%のものでは二つ以上の変異を重複して発現したと報告している。この事実から大野は‘試験管育種’ (Test-tube breeding) なる用語を提唱し、培養中の放射線照射や変異誘起物質添加などの利用も組み入れて、変異個体の大量誘起の場として、カルス細胞を利用することを提唱している (大野, 1979) (24)。

本論文のイチゴ約培養によるウィルスフリー個体の作出と高収性系統の育成は、その意味では正に‘試験管育種’そのものとも考えられ、組織培養技術が実際の育種の現場に利用され始めた一つの例になるものと考ええる。

また、SHEPHARD (1980) はジャガイモのプロトプラスト由来のカルスから多数の植物体を復元し、それらを‘プロトクローン’ (protoclone) と呼び、プロトクローンに認められる変異は従来の交雑に認められるものよりも幅広いものであったと述べている⁽⁹³⁾。彼は栄養繁殖をくりかえしたジャガイモの体細胞はそもそも極めて変異性に富んでいたのではないかと述べているが、カルス細胞経路によって変異が増大されている可能性も十分に考えられる。イチゴも栄養繁殖性作物であり、約培養による高収性変異系統の育成の原因としては、体細胞組織である約隔組織の細胞が本来変異性に富んでいたことによるのか、カルス組織を経由したことによる培養中の変異であるのかのいずれかであろう。栄養繁殖性作物はいったん変異を誘起すれば、あとは栄養体 (イチゴの場合はランナー) で増殖・維持し得るので‘試験管育種’の材料として極めて有利であるといえよう。

以上、半数体を育成するために取り組んだ
薬培養によって、イチゴのウイルスフリー個
体を大量に誘導する方法を開発することにな
った。このことは、カルス形成とカル
スからの植物体再分化の過程で、カルス組織
中にあったウイルスの増殖スピードの低下や
不活化などにより、ウイルスフリー個体が獲
得されたものと考えられる。

このイチゴの薬培養の実験結果をもとに、
筆者はウイルス粒子がカルス中でどのように
消長し、消失していくかについて、ニンニクの
葉身を培養して、ニンニクモザイクウイルス
のウイルス粒子と電顕と接種検定を併用して
詳細に調査した。そしてニンニクのウイルス
もカルス組織中で急速に消失の方向に進むこ
とを明らかにした⁽⁹⁸⁾。このようにイチゴだけで
なく、他の栄養繁殖性野菜のウイルスフリー
個体作出の場としてカルス組織が利用し得る
ことを示した。

また、薬培養によって育成した植物体の系

統の中で生産力の優れた数系統を見出したが、このことは大野の提唱している‘試験管育種’の一例と考えられる。現在、バイオテクノロジー（生命工学）を用いた植物の改良や物質生産などが脚光を集めているが、その発展のためには従来からの地道な植物組織培養技術の向上が不可欠である。その意味で、植物組織培養の根幹をなすカルス組織とカルス細胞の持つ性質と有効性の一端を明らかにした本研究の意義は極めて大きいと考えられる。

第7章 摘 要

イチゴの薬培養によって植物体を大量に誘導する方法を明らかにした。またそれらの植物体がウィルスフリー株になること及びそれら個体の中には場における生産力の優れている系統の存在が認められたので報告する。

1. イチゴの薬培養による植物体の大量誘導

- 1) 供試品種は6年間にわたり, '宝交早生', 'ダナー', '福羽', '堀田ワニダー', '紅鶴', 'はるのか', '幸玉'を用いた。
- 2) 基礎培地には Linsmaier & Skoog を用い, 通常の場合, 寒天 $7g/l$, 1% 糖 $30g/l$ を加え, pH は $5.8 \sim 6.0$ に調整し, $25^{\circ}C$, 12 時間照明 (照度は $3,000 lx$)・12 時間暗黒の条件下で培養した。
- 3) イチゴの薬の発育段階とカルス形成の関

係をみると，成熟花粉を含む葯や花粉細胞の葯など，すべての発育段階の葯からカルスの形成が認められた。しかし最も高いカルス形成率を示したのは一核期の花粉を含む葯であり，四分子期がそれに次いだ。

4) イチゴの葯からのカルス形成はオーキシン単独添加培地，サイトカイニン単独添加培地ではほとんど認められず，両者の共存することがカルス形成に必要な条件であった。カルス形成の品種間差も明らかに認められ，‘堀田ワインター’，‘宝交早生’，‘福羽’が比較的容易であったのに対し，‘ダナー’，‘紅鶴’，‘はるのか’は比較的困難であった。

5) カルス形成の解剖学的観察によると，花粉粒のカルス形成も確認されたが，葯壁や葯隔組織のカルスも形成され，後者のカルスは増殖するのに対し，前者の花粉粒起源のカルスは増殖しにくかった。

6) 葯のカルスを移植して茎葉を誘導するには $BA\ 10^{-5} M$ ($2.25\ mg/l$) 単独添加培地

が優れており, IAA , NAA , $2.4-D$ などのオーキシンの存在しない方が適当であると考えられた。

7) イチゴの薬を置床してカルスを誘導し, そのままカルスを移植することなく茎葉を分化させる培地を検討したところ, LS の基礎培地に $NAA\ 10^{-6} M$ ($0.2\ mg/l$) + $BA\ 10^{-5} M$ ($2.25\ mg/l$) の共存培地が優れていることが明らかとなった。このことにより, カルス移植に伴う繁雑な操作は不要となり, 植物体の誘導が著しく能率化された。

8) イチゴの薬培養による植物体の大量増殖法を検討したところ, $NAA\ 10^{-6} M$ + $BA\ 10^{-5} M$ の共存培地でカルスと茎葉を誘導させた後, カルス部分を含むその茎葉を LS の基礎培地に植えかえることにより, 幼植物体が次々に再分化した。この方法を多数の三角フラスコを用いて反復し, 同一薬カルス起源の幼植物を, 必要に応じて $50 \sim 100$ 個体以上誘導しうることを明らかにした。

9) 以上のようにして育成した個体の染色体数を調べた。イチゴの染色体は極めて小さく、かつ染色体数が多いので、明確な像を得る例はまれであったが、確認しえた染色体数は56本であり、通常の栽培種と同様の8倍体で、染色体数は半減していなかった。

10) イチゴの薬組織を出発点にして幼植物を大量に誘導する方法を体系化して図11に示した。この手法は従来多大の面積と労力を必要としていたイチゴのランナーによる増殖に比べて効率が良く、優れたイチゴの大量増殖法として利用しうるものと考えられた。

2. イチゴの薬培養によるウイルス

フリー個体の大量育成

1) 薬培養によるイチゴのウイルスフリー個体の育成方法を確立するため、罹病ウイルスの種類及び病徴を異にする‘グナー’系統、及び‘宝交早生’、‘はるのか’、‘辛玉’、‘Fragaria vesca’の各品種を用いた。

2) 葯からのカルス形成について、罹病ウイルスの種類による差はほとんど認められなかったが、品種による差は顕著で、‘宝交早生’が最も容易にカルスを形成し、‘幸玉’と‘F. vesca’は困難であった。

3) カルスからの茎葉分化についても、カルス形成の場合と同様、罹病ウイルスによる差は認められず、品種による差の方が顕著であり、‘F. vesca’が最も容易で、移植したカルスのほとんどすべてから茎葉を分化した。次いで‘宝交早生’‘グナー’が良く、‘はるのか’と‘幸玉’ではほとんど茎葉分化が見られなかった。

4) すべての品種を通じ、葯のカルスを移植して茎葉を分化させる培地としては、ウイルスの罹病程度に関係なく、 $BA\ 10^{-5}M$ を添加した培地が最も優れていた。またカルスを移植せずに茎葉の分化を図る培地としては $NA\ A\ 10^{-6}M + BA\ 10^{-5}M$ の共存培地が最も優れていた。

5) 罹病ウイルスの種類を異にする‘グナー’の5系統からの育成個体について保毒ウイルスの検定を行った。指標植物に F. vesca の EMC 系, UC-1 系及び F. virginiana を用い、各系統3株ずつについて小葉接ぎ法で検定したところ、親株において罹病していたウイルスの種類に関係なく、検定したすべての約培養育成株がウイルスフリーになっていた。

6) 以上のようにして、イチゴの約培養によってウイルスフリー個体が多数育成しうることが明らかになったが、この方法は従来の茎頂培養法に比べて簡便、容易であり、一挙に大量のウイルスフリー個体が得られるという利点を有していると考えられた。

3. イチゴの約培養によって育成した系統の生産力

1) 1971年から1973年にかけて約培養に用いた親株と約培養育成系統を用い、ビニール

ハウス栽培，露地栽培における生産力比較試験を行った。供試品種は‘ダナー’，‘宝交早生’，‘福羽’の3品種である。

2) ランナーの発生量は供試した3品種とも薬培養育成系統は親株に比べて2～3倍であった。

3) 収穫量でみると‘ダナー’や‘宝交早生’では，ビニールハウス栽培，露地栽培ともに薬培養育成系統が大幅な増収を示した。しかし‘福羽’のビニールハウス栽培ではほとんど差が認められなかった。

4) ‘宝交早生’の薬培養育成系統の中に特に収量の高い系統が認められた。

5) そこで1977年から1980年の4年間にわたり，薬培養で育成した‘宝交早生’の30系統を用い，露地栽培における収量を調査し，対照区として用いた市販ウイルスフリー株と比較した各系統の年次変動を調べた。

6) 初年度選抜した15系統のうち3系統は4年間の試験期間を通じて常に対照区に対し

120~150以上の収量比数を示し、薬培養で育成したイチゴ‘宝交早生’の優良変異系統として利用しうると考えられた。

7) 以上の結果、年次による変動はあるものの、薬培養育成系統は他の市販ウイルスフリー株と同程度に収量をあげうることに、及び収量性に優れた変異系統の生ずる可能性のあることを示すものと考えられた。

引用文献

- 1) ABO-EL-NIL, M.M. and A.C. HILDEBRANDT (1971):
Differentiation of virus-symptomless Geranium plants from anther callus. *Plant. Dis. Rept.* 55, 1017~1020.
- 2) 浅平端・加納共卓 (1977): イチゴの果実組織の培養における葉条形成. *園学雑*, 46, 317~324.
- 3) ANDERSON, H.M., A.J. ABBOTT and S. WILTSHIRE (1982): *Micro-propagation of strawberry plants in vitro - effect of growth regulators on incidence of multi-apex abnormality.* *Scientia Horticulturae* 16, 331~341.
- 4) BOLTON, A. T. (1966): *The inactivation of veinbanding and latent-C viruses in strawberry by heat treatment.* *Can. J. Plant Sci.* 47, 375~380.
- 5) Boxus, P. (1974): *The production of strawberry plants by in vitro micropropagation.* *J. Hort. Sci.* 49, 209~210
- 6) Boxus, P., M. QUOIRIN and J.M. LAINE (1977): *Large scale propagation of strawberry plants from tissue culture.* p. 130~143. In J. REINERT

and Y. P. S. BAJAJ (eds.) Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue, and organ culture. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

7) BRINGHURST, R. S. and V. VOTH (1956):

Strawberry virus transmission by grafting excised leaves. Plant Dis. Rept. 40, 596~600.

8) 千葉県原種農場 (1981): イチゴの葯培養による変異体の特性検定試験. 千葉原種農場研究資料 9, 72~78.

9) 千葉県原種農場 (1982): イチゴの葯培養による変異体の特性検定試験. 千葉原種農場研究資料 10, 69~75.

10) FOWLER, C. W., G. H. HARRISON and J. JANICK (1971): Callus formation from strawberry anthers. Hort. Res. 11, 116~117.

11) 福井希一 (1981): 中国における半数体育種の進展. 農業及園芸 56, 380~384.

12) GENGENBACH, B. G., C. E. GREEN and C. M. DONOVAN (1977): Inheritance of selected pathotoxin resistance in maize plants regenerated from cell culture. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 74, 5113~5117.

- 13) GRESSHOFF, P.M. and H.D. COLIN (1972):
Development and differentiation of haploid
Lycopersicon esculentum. Planta 107, 161~170.
- 14) GUHA, S. and S.C. MAHESHWARI (1964): In vitro
production of embryos anthers of Datura.
Nature 204, 497.
- 15) GUHA, S. and S.C. MAHESHWARI (1966): Cell
division and differentiation of embryos in the
pollen grains of Datura in vitro. Nature
212, 97~98.
- 16) HANSEN, A.J. and A.C. HILDEBRANDT (1966):
The distribution of Tobacco Mosaic Virus in plant
callus cultures. Virology 28, 15~21.
- 17) HIRABAYASHI, T., I. KOZAKI and T. AKIHAMA (1976):
In vitro differentiation of shoots from anther
callus in Vitis. Hort. Sci. 11, 511~512.
- 18) JACQUES, H., D. FRANCOISE and B. JEAN-LOUIS (1982):
Cold storage of plant tissue cultures. Proc.
5th Intl. Cong. Plant Tissue & Cell Culture, 801~802.
- 19) KAMEYA, T. and K. HINATA (1970): Induction

of haploid plants from pollen grains of Brassica.

Jap. J. Breed. 20, 82~87.

- 20) KARTHA, K. K., N. L. LEUNG and K. PAHL (1980):
Cryopreservation of strawberry meristems and mass
propagation of plantlets. J. Amer. Soc. Hort. Sci.
105, 481~484.
- 21) KARTHA, K. K. (1982): Cryopreservation of plant
meristems: a novel approach for the preservation
of germplasm in a disease-free condition. Proc.
5th Intl. Cong. Plant Tissue & Cell Culture, 795~796.
- 22) KASSANIS, B. (1957): The use of tissue
culture to produce virus free clones from infected
potato varieties. Ann. Appl. Biol. 45, 422~427.
- 23) KELLER, W. A. and K. C. ARMSTRONG (1978): High
frequency production of microspore-derived plants
from Brassica napus anther cultures.
Z. Pflanzenzücht 80, 100~108.
- 24) 小林仁・四方俊一 (1972): かんしょのやく培養について
(2). 育学雑, 22, 別冊1, 37~38.
- 25) 近藤 章 (1968): 組織培養によるウイルスの維持.

日植病報, 34, 196

- 26) 近藤 章 (1970): 培養カルスにおけるウイルスの増殖と培養条件. 文部省総合研究 研究報告集録 (農学編 I). 昭和 45 年, 15~16.
- 27) 近藤 章 (1971): カルスにおけるウイルスの増殖. 日植病報, 37, 396.
- 28) LANERI, U. and C. DAMIANO (1980): Strawberry anther culture. *Annali dell' Istituto Sperimentale per la Frutticoltura*, 11, 43~48.
- 29) 李 永馥・金 暎来 (1979): イチゴの葉柄および葉切片の組織培養における葉条分化. 京都大学園学研究集録, 9, 78~82.
- 30) LINSMAIER, E.M. and F. SKOOG (1965): Organic growth factor requirements of tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 18, 100~127.
- 31) LIU, M. and W. CHEN (1976): Tissue and cell culture as aid to sugarcane breeding I. Creation of genetic variation through callus culture. *Euphytica*, 25, 393~403.
- 32) MAEDA, E., V.M. VILLALOBOS and T. SUGIURA (1978):

Fine structure of the regenerating cells in
Fragaria anther cultures. Japan J. Breed.
28, 143~146.

- 33) MAHESHWARI, S. C., A. RASHID and A. K. TYAGI
(1982): Haploid from pollen grains - retrospect
and prospect. Amer. J. Bot. 69, 865~879.
- 34) MARTEN, U., G. STROVEL and J. SHEPARD (1978):
Reaction to phytotoxin in a potato population
derived from mesophyll protoplasts. Proc. Natl.
Acad. Sci. U.S.A. 75, 4935~4939
- 35) 三位正洋 (1973): 花粉からの半数体育成に関する研究
I. タバコの幼植物形成と花粉のステージとの関係ならびに
胚状体形成過程. 育学雑 23, 27~34.
- 36) MILLER, P. W. and R. Q. BELKENGSEN (1963):
Elimination of yellow edge, crinkle, and vein-
banding viruses and certain other virus complexes
from strawberries by excision and culturing of
apical meristems. Plant Dis. Repr. 47, 298~300.
- 37) 三沢正生 (1969): 培養細胞におけるウイルスの増殖機構.
文部省総合研究 研究報告集録 (農学編 I) 昭和44, 41~42.

- 38) MOKRA, A. and V. MALIARCIKOVA (1981):
Anther cultures of strawberry I. Effect of
medium composition of plant regeneration.
Vedecké Práce Vyskumného Ústavu Ovočných a
Okrasných Drevín v Bojniciach, 3, 91~98.
- 39) MOREL, G. and C. MARTIN (1952): Guérison
de dahlia atteints d'une maladie a virus.
C. R. Acad. Sci. Paris. 235, 1324~1325.
- 40) MOREL, G. and C. MARTIN (1955): Guérison de
pomme terre atteints d'une maladie a virus.
C. R. Acad. Agric. Fr. 41, 472~475.
- 41) 森 寛一 (1970): 培養カルスにおけるウイルスの消長.
文部省総合研究 研究報告集録 (農学編I) 昭和45年, 11~12.
- 42) 森 寛一・細川大二郎 (1970): 生長点近傍組織におけるウイルス
の分布について (第1報) 蛍光抗体法によるTMVの検出. 日植病報 36, 178
- 43) 森 寛一・細川大二郎 (1971a): 生長点近傍組織におけるウイルス
の分布について (第4報) TMV感染葉からの分化器官における
ウイルス抗原の分布. 日植病報, 37, 204
- 44) 森 寛一・細川大二郎 (1973): 培養カルスから無ウイルス
植物作出の試み

関東東山病虫研年報 20, 76

- 45) 森 寛一・池上雍春・山田信義' (1963): サツマイモ縮葉モザイク病の組織培養による無毒化. 日植病報 28, 86.
- 46) 森 寛一・浜屋悦次・下村徹・池上雍春 (1969): 組織培養によるウイルスリ病植物の無毒化. 農事試報, 13, 45~110.
- 47) 森 寛一・渡辺実・細川太一郎・柴山和華子・天野美代子 (1971 6): 培養カルスにおけるウイルスの消長 (第4報) 起源を異にするカルス中のウイルス濃度と各種化学薬剤のウイルス増殖に及ぼす影響. 日植病報. 37, 203.
- 48) MULLIN, R. H. and D. E. SCHLEGEL (1976): Cold storage maintenance of strawberry meristem plantlets. Hort Science 11, 100~101.
- 49) 村上道夫・高橋信夫・原田賢之 (1972): 葯培養によるトウモロコシ半数体植物の育成 I. カルスの形成と根の分化について. 京都府大学術報, 27, 1~10.
- 50) MURASHIGE, T. and F. SKOOG (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15, 473~497.
- 51) MURASHIGE, T. (1974): Plant propagation through

- tissue cultures. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 25, 135~166.
- 52) 中村明夫・板垣隆三・小林 清 (1974): 葯培養によるタバコの半数体育種法に関する研究(第4報) H2号 および COKER 139 とそれらの半数体倍加系統との特性比較. 磐田たばこ試験場報告 6, 29~34.
- 53) 中村明夫 (1975): 葯培養によるタバコの半数体育種法に関する研究(第5報) 半数体育種法による緩和性黄色品種 F211 の育成. 磐田たばこ試験場報告 7, 29~71.
- 54) 中田和男 (1984): 葯培養・花粉培養. 遺伝, 38(3), 44~49.
- 55) 中田和男・田中正雄 (1968): 葯の組織培養による花粉からのタバコ幼植物の分化. 遺雜 43, 65~71
- 56) NIEMIROWICZ - S. K. and Z. ZAKRZEWSKA (1982): Fragaria × ananassa anther culture. *Bulletin de l'Academie Polonaise des Sciences*. 28, 341~347.
- 57) 新関宏夫 (1979): 葯・花粉培養. 原田・駒峯編「植物細胞組織培養」, 217~272.
- 58) NIIZEKI, H. and K. FUKUI (1983): Elimination of somatic chromosomes in strawberry plants by treatment with para-Fluorophenylalanine. *Japan J. Breed.* 33, 55~61.

- 59) NIIZEKI, H. and K. Oono (1968): Induction of haploid rice plant from anther culture. Proc. Japan Acad. 44, 554~557.
- 60) 新関宏夫・大野清春 (1970): 蒴培養技術の確立に関する研究. 農研遺伝科遺伝1研業績 1, 1~17.
- 61) NIIZEKI, M. (1974): Studies on plant cell and tissue culture. Effect of different kinds of media on the variation of chromosome number in tobacco callus and regenerated plant. J. Fac. Agric. Hokkaido Univ. 57, 357~367.
- 62) NISHI, S. and K. Oosawa (1973): Mass production method of virus-free strawberry plants through meristem callus. Jap. Agric. Res. Q. 7, 189~194.
- 63) 西貞夫・大澤勝次・豊田努 (1970): やく培養の利用に関する研究 (第4報) 各種そ菜やくカルスからの幼植物の分化について. 育学雑. 20, 別冊2, 58~59.
- 64) 西貞夫・大澤勝次・豊田努 (1972): イ4ゴの組織培養に関する研究 (第1報) 数種組織の脱分化および再分化について. 才3回植物組織培養シンポジウム講演要旨. 28.
- 65) 西貞夫・大澤勝次・豊田努 (1974): やく培養の

利用に関する研究 I. 数種野菜やくからのカルス形成と植物体誘導, 野菜試報. 1, 1~40.

- 66) NISHI, T., Y. YAMADA and E. TAKAHASHI (1968): Organ redifferentiation and plant restoration in rice callus. *Nature* 219, 508~509.
- 67) 西沢正洋・西泰道 (1966): 組織培養法によるウイルスリ病ユリの無毒化に関する研究. 九州農試報, 12, 139~157.
- 68) NITSCH, C. and J. P. NITSCH (1967): The induction of flowering *in vitro* in stem segments of Plumbago indica L. I. The production of vegetative buds. *Planta* 72, 355~370.
- 69) NITSCH, J. P. and C. NITSCH (1969): Haploid plants from pollen grains. *Science*, 163, 85~87.
- 70) 岡山健夫・大澤勝次 (1984): 組織培養によるイチゴサトイモの大量増殖. 奈良農試報告 15, 1~9.
- 71) 大村敏博 (1982): カルス培養による無ウイルス植物の育成ならびにイネ・ゴールドフーウイルスに関する研究. 日植病報 48, 259.
- 72) OMURA, T. and S. WAKIMOTO (1978): Elimination of viruses from plant tissue culture. *Ann. phytopath. Soc. Japan* 44, 277~281.

- 73) 大野清春 (1975): イネの薬培養による半数体の作出とその育種的利用. 農技研報, D. 26, 139~222.
- 74) 大野清春 (1979): 試験管育種—植物組織培養による選抜. 組織培養, 5, 325~334.
- 75) 大野清春・坂口進 (1977): 組織培養による突然変異の誘発と育種的利用 I. イネにおける遺伝子突然変異. 育学雑, 27 (別2), 12~13.
- 76) 大澤勝次 (1977): 野菜の組織培養—研究の歩みと実用化をめけて. 化学と生物, 15, 559~570.
- 77) 大澤勝次 (1980): 栄養繁殖性作物における無病苗の作出技術. 農業及園芸 55, 199~206.
- 78) Oosawa, K. (1982): Calliclones of vegetable crops—clonal multiplication and variant induction through tissue culture. Seminar of FFTC/ORD (in Korea), 192~190.
- 79) 大澤勝次 (1983): 野菜の薬培養. 「種苗産業と育種新技術」(CMC出版). 153~170.
- 80) 大澤勝次・銭孫子和雄・栗山尚志・西貞夫・湯浅三男・森憲昭 (1976): カルス組織の利用によるニンニクのウイルスフリー株育成. 昭和51年秋季園芸学会発表要旨, 98~99.

- 81) 大澤勝次・栗山尚志・菅原祐幸 (1981): 組織培養による栄養繁殖性野菜の大量増殖と利用に関する研究. I. 植物体の大量誘導に及ぼす培養部位及び培地組成の影響.
野菜試報 A 9, 1~46.
- 82) 大澤勝次・高柳謙治 (1981): イチゴの葯培養育成系統の生産力に関する試験. 野菜試育種部研究年報 8, 30~33.
- 83) OOSAWA, K. and K. TAKAYANAGI (1982): High yielding variants in strawberry derived from anther culture. Proc. 5th Intl. Cong. Plant Tissue Cell Culture, 765~766.
- 84) 大澤勝次・戸田幹彦・西貞夫 (1974): やく培養の利用に関する研究. II. イチゴやく培養によるウイルスフリー株の大量育成.
野菜試報 A 1, 41~57.
- 85) 大澤勝次・西貞夫・山川邦夫 (1973): イチゴの組織培養に関する研究 (第2報) 生長点組織の脱分化・再分化によるウイルスフリー株大量増殖技術について. 昭和48年春園芸学会発表要旨 200~201.
- 86) OUYANG, T., H. HU, C. CHUANG and C. TSENG (1973): Induction of pollen plants from anthers of Triticum aestivum L. cultured in vitro. Sci. Sin. 16, 79~95.
- 87) PIERIK, R. L. M. (1976): Anthurium andraeanum plantlets produced from callus tissues cultivated in

vitro. *Physiol. plant.*, 37, 80~82.

- 88) PILET, P. E. (1961): Culture in vitro de tissu de carrote et organogenese. *Bull. Soc. Bot. Suisse*. 1, 189~207.
- 89) PILLAI, S. K. and A. C. HILDEBRANDT (1969): Induced differentiation of Geranium plants from undifferentiated callus in vitro. *Amer. J. Bot.* 56, 52~58.
- 90) RAMANN, K. (1977): Rapid multiplication of Streptocarpus and Gloxinia from in vitro cultured pedicel segments. *Z. Pflanzenphysiol.* 83, 411~418.
- 91) ROSATI, P., M. DEVREUX, and U. LANERI (1975): Anther culture of strawberry. *Hort. Sci.* 10, 119~120.
- 92) SAKAI, A., M. YAMAKAWA, D. SAKATA, T. HARADA and T. YAKUWA (1978): Development of a whole plant from an excised strawberry runner apex frozen to -196°C . *Low Temp. Sci. Ser. Bul.* 36, 31~38.
- 93) SHEPHARD, J. F., D. BIDNEY, and E. SHAHIN (1980): Potato protoplasts in crop improvement. *Science*, 208, 17~24.
- 94) 下村 徹・森 寛一 (1964): 植物組織培養法によるイチゴウイルス病の無毒化. *日植病報*, 29, 81.

- 95) 下村 徹・平井 篤造 (1967): 植物ウイルス病治療の現況.
ウイルス, 17, 1~14.
- 96) 静岡農試東部実証圃 (1979): 宝交早生の栽培安定に関する
試験—イチゴやく培養株の果実等の調査. 静岡農試研究の
成果, 8, 126~127.
- 97) SKOOG, F. and C. O. MILLER (1957): Chemical
regulation of growth and organ formation in plant
tissue culture in vitro. Symp. Soc. Exp. Biol.,
11, 118~130.
- 98) 菅原祐幸・大澤勝次・我孫子和雄・野場和徳 (1979): ニンニクの組織培養
におけるカルの継代とカルス中のウイルスの消長に関する試験.
野菜試育種部研究年報 6, 39~45.
- 99) SVOBODOVA, J. (1966): Elimination of virus by
means of callus tissue culture. Viruses of Plants.
—North Holland Publishing Co. 48~53.
- 100) 高井隆次 (1966): わが国のイチゴウイルス感染について. 園試報 C4,
109~115.
- 101) 高井隆次 (1973): わが国におけるイチゴウイルス病に関する
研究. 園試報 C8, 59~104.
- 102) 高井隆次・下村 徹 (1970): 生長臭組織培養によるウイルス
フリー株の獲得. 昭和45年春季 園芸学会講演要旨, 164~165.

- 103) THOMSON, A. D. (1956): Heat treatment and tissue culture as a means of freeing potatoes from virus Y. *Nature* 177, 709.
- 104) 栃木農試佐野分場 (1973): ウイルスフリー株の増殖様式に関する試験(2) 組織培養によるフリー株の作出に関する試験.
昭和47年度 野菜試験成績書, 17~18.
- 105) 都丸敬一 (1970): 培養細胞に対するウイルスの接種と増殖. 文部省総合研究, 研究報告集録(農学編I)⁵45, 18~19.
- 106) 内宮博文・亀谷寿昭 (1971): トウモロコシヒナスの薬培養. 第4回薬培養シンポジウム講演要旨, 10~13.
- 107) 植松徳雄 (1980): やく培養においてイチゴのウイルスフリー株を大量育成したときの変異個体の出現頻度. 静岡農試研究報告, 25, 7~10.
- 108) WAITHAKA, K., A. C. HILDEBRANDT and M. N. DANA (1980): Hormonal control of strawberry axillary bud development in vitro. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 105, 428~430.
- 109) 若原 暁 (1982): 植物組織培養の育種への利用 — 培養法の改良と変異体作出 — 農技研報 D33, 121~200.
- 110) WAKASA, K., Y. KOGA, and M. KUDO (1978):

Differentiation from in vitro culture of Ananas comosus. Jap. J. Breed. 28, 113~121.

111) WALKEY, D. G. A. and M. J. W. WEBB (1968):

Virus in plant apical meristems. J. gen. Virol.

3, 311~313.

112) 王淑英・邓立平・郭亚华・徐华・李菊木 (1978): 花药培养

育成茄子‘童单一号’。花药培养学术讨论会文集, 300~301.

113) WHITE, P. R. (1943): A handbook of plant

tissue culture. Ronard Press. New York.

114) WILSON, J. K. (1915): Calcium hypochlorite

as a seed sterilizer. Amer. J. Bot. 2, 420~427.

115) 药培养研究会 (1971): 第4回药培养シンポジウム講演

要旨集 (昭和46年10月), 1~82.

116) ハ金秋利郎・原田隆・稲垣昇・志賀義彦 (1972):

园艺作物のやく培养に関する研究 (第1報) アスパラガスのやく

培养におけるカルスの誘導と器官分化. 国学雑誌, 41, 272~280.

117) YAKUWA, T., T. HARADA and H. TSUJI (1982):

Studies on the morphogenesis of Asparagus. IV. The

effect of transplanting on callus and organ formation

of stem segment cultured in vitro. J. Fac. Agri. HOKKAIDO

univ. 61, 151~159.

- 118) YAMADA, T., H. NAKAGAWA and Y. SINOTO (1967):
Studies on the differentiation in cultured cells. I.
Embryogenesis in three strains of Solanum callus.
Bot. Mag. Tokyo 80, 68~74.
- 119) 山田康之 (1971): 培養細胞・組織による脱分化・再分化
の解析. 植物の化学調節 6, 138~149.
- 120) 山田貴義 (1979): ウイルスフリー株が育成できるフキの組織
培養. 農耕と園芸 34(5), 48~49.
- 121) 与良清・土崎常男 (1962): ジャガイモ男爵の組織培養
による無ウイルス化. 日植病報, 27, 219~221.
- 122) ZENKTELLER, M. A. (1971): In vitro culture
— A usefull method for obtaining haploid plants.
Genetica Polonica 12, 267~273.
- 123) ZENKTELLER, M. A. (1973): In vitro development
of embryos and seedlings from pollen grains of
Solanum dulcamara. Z. Pflanzenphysiol. 69, 189~192.

イチゴの薬培養による
ウイルスフリー個体の
大量増殖とその生産力
に関する研究

大澤勝次
(野菜試験場)

北海道大学農学部
学位論文

昭和 59 年 10 月