グラジオラス花蕾子房からのカルス形成と植物体再生

霞 正一・高津康正・友常秀彦・佐久間文雄

茨城県農業総合センター生物工学研究所 319-0292 茨城県西茨城郡岩間町安居

Callus Formation and Plant Regeneration from Developing Ovaries in *Gladiolus*

Masakazu Kasumi, Yasumasa Takatsu, Hidehiko Tomotsune and Fumio Sakuma

Plant-Biotechnology Institute, Ibaraki Agricultural Center, Ago, Iwama, Nishiibaraki, Ibaraki 319-0292

Summary

Callus formation and plant regeneration from flower bud organs in *Gladiolus* were studied. The results were as follows:

1. Callus was not inducible from upper parts of the perianth, but was obtained from their lower parts and from ovaries at frequencies of 56.0% and 94.0%, respectively; about 64.0% of these calli regenerated shoots.
2. Among ovaries at different developmental stages, those samples 2~3 days before anthesis were most efficient in callus formation and shoot regeneration.
3. Calli were induced from all explants of ovaries on MS medium containing 5 mg · liter⁻¹ NAA and 5 mg · liter⁻¹ BAP.
4. Shoots were regenerated most efficiently from the calli on MS medium containing 2 mg · liter⁻¹ BAP.
5. Callus formation from ovaries varied little among varieties, but shoot regeneration from the calli varied a great deal, e.g. regenerating frequency of cv. Traveler was much higher than that of cv. Hector.
6. When regenerated shoots were transferred to the MS medium, shoots and roots developed and subsequently corms formed at the base of the shoots. After corms were released from their dormancy by a low temperature treatment and transplanted into the field, they developed shoots and roots and then flowered. Flower shape and color of the regenerated plant had the same characteristics as the mother plant.

Key Words: *Gladiolus*, tissue culture, ovary, callus, regeneration.

緒 言

これまで、グラジオラス球茎への放射線照射により花色変異が花被にキメラ状に生じることが報告されている(射場ら, 1965; 霞ら, 1995)。しかし、従来の分球や木子を介した栄養繁殖では変異部位が小さい場合にはキメラのない、変異が個体全体におよぶ変異体を得るのは困難であった(射場ら, 1965)。この対策として、キク、ペゴニアでは放射線照射により生じたキメラ状の変異部位を組織培養することによってキメラを解消し、変異が個体全体におよぶ変異体を育成している(二階堂・小野沢, 1989; 重松・松原, 1972)。グラジオラスにおいてもこの手法が利用できれば、小さな変異を個体全体におよぶ大きさの変異にすることが可能と考えられる。そのためには、花被または花被に続いて変異が生じているとみられる子房などの花器部位からの培養系の確立が必要

である。

これまでにグラジオラスの花茎、木子、木子茎頂、葉基部などからの直接、またはカルス経由の茎葉再分化系が数多く報告されている(Bajaj ら, 1983; Hussey, 1975; Kamo ら, 1990; 霞ら, 1993; Kim ら, 1988; Kim · Kang, 1992; 大城ら, 1974; Remotti · Löffler, 1995; Stefaniak, 1994; 田中, 1977; Tomotsune ら, 1994; Ziv ら, 1970)。しかし、花器部位を用いての培養は次の3つの報告があるだけで、いずれもシュート形成および植物体の再生は認められていない。すなわち、Hussey (1975) は子房を培養した結果、カルスおよびシュート形成はともにみられなかった。また Bajaj ら (1983) は幼花穂、摘出した花器、花被、葯を培養した結果、カルス形成、葉状・花弁状の構造体、根の形成に至っただけであった。さらに Kamo ら (1990) は胚珠および花糸を培養した結果、カルス形成はほとんどなく、シュート形成もみられなかった。

そこで、著者らはグラジオラスへの放射線照射により生じた花色変異のキメラ解消を目的として、花被から連続して変異の生じていると考えられる子房からのカルス形成と植物体再生について検討した結果、植物体再生のための培養系が確立できたので報告する。

材料および方法

1. カルス形成ならびにシュート形成に及ぼす花器部位の影響

実験1. カルス形成

供試材料は茨城県農業総合センター生物工学研究所果樹花き育種研究室で保存している‘トラベラー’（花色：ピンク色）をパイプハウスで栽培し、用いた。出穂後、未開花期（開花2～3日前）の花器部位を花被の展開予定部（以下、花被上部と称する）、花被下部、子房に分け、外植体とした（第1図-A）。滅菌は外植体をポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート（0.1%）を添加した次亜塩素酸ナトリウム溶液（有効塩素0.5%）に20分間浸漬し、さらに滅菌水で5分間ずつ3回洗った。花被上部は5mm角程度に、花被下部および子房は5mm幅程度に輪切りに分割し、無菌的に培地にそれぞれ100, 100, 84個を置床した。培地はMurashige-Skoog (MS) 培地 (Murashige・Skoog, 1962) を基本として、 $5\text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ 1-ナフタレン酢酸 (NAA), $5\text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ 6-ベンジルアミノプリン (BAP), 3%ショ糖, $10\text{ g} \cdot \text{liter}^{-1}$ 寒天を添加し、pH 5.8 に調製し $\phi 24\text{ mm} \times 90\text{ mm}$ の試験管に5mlずつ分注した。アルミ箔で栓をした後、20分間オートクレーブし、斜面培地とした。培養条件は25℃、暗黒とした。置床60日後に、カルス形成率をカルス径が10mm以上のものと10mm未満に分けて調査した。

実験2. シュート形成

実験1で形成された花被下部、子房由来のカルスを3～5mm角の大きさに分割し、培地に100個ずつ置床した。培地は実験1に準じて作成し、植物生長調節物質として $2\text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ BAPを添加した。培養条件は25℃、白色蛍光灯で3000 lx、16時間日長とした。置床60日後にシュート形成カルス率、カルス当たりシュート数を調査した。

2. 子房からのカルス形成ならびにシュート形成に及ぼす小花ステージの影響

実験3. カルス形成

供試材料は当研究室で保存している‘トラベラー’を露地で栽培し、用いた。出穂後、小花をステージ別に未開花期（開花2～3日前）、開花中期（開花2～3日後）、開花終期（開花6～7日後）の3つに分けて、各時期の子房を供試した。滅菌は子房を70%エタノールに1分間浸漬し、以下、実験1に準じて行った。この子房を5

mm幅程度に輪切りに分割し、無菌的に培地にそれぞれ20, 39, 29個を置床した。培地は実験1に準じて作成した。培養条件は実験1に同様とした。置床60日後に雑菌汚染率、カルス形成率をカルス径が10mm以上のものと10mm未満に分けて調査した。

実験4. シュート形成

実験3で形成された未開花期、開花中期、開花終期の子房由来のカルスを3～5mm角の大きさに分割し、培地にそれぞれ50個ずつ置床した。培地は実験2に準じて作成した。培養条件および調査は実験2に同様とした。

3. 花蕾子房からのカルス形成ならびにシュート形成に及ぼす植物生長調節物質の影響

実験5. カルス形成

供試材料は当研究室で保存している‘トラベラー’をパイプハウスで栽培し、用いた。出穂後、未開花期（開花2～3日前）の子房（以下、花蕾子房と称する）を供試した。滅菌は実験1に準じて行った。この花蕾子房を5mm幅程度に1/2～1/3に輪切りに分割し、20～58個を無菌的に培地に置床した。培地は実験1に準じて作成し、植物生長調節物質を無添加、 $1\text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ 2, 4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2, 4-D), $1\text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ 2, 4-D+ $1\text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ BAP, $1\text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ NAA+ $1\text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ BAP, $5\text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ NAA, $5\text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ NAA+ $5\text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ BAP, $10\text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ NAA+ $5\text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ BAPの7区を設定した。培養条件および調査は実験1に同様とした。

実験6. シュート形成

実験5の $5\text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ NAA+ $5\text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ BAP区で形成されたカルスを3～5mm角の大きさに分割し、培地にそれぞれ50個ずつ置床した。培地は実験2に準じて作成し、植物生長調節物質としてBAPを0, 0.1, 0.5, 2, $10\text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ 添加した。培養条件および調査は実験2に同様とした。

4. 花蕾子房からのカルス形成ならびにシュート形成の品種間差異

実験7. カルス形成

供試材料には当研究室で保存している‘トラベラー’、‘ヘクター’（同：赤色）、‘トパーズ’（同：黄色）、‘バイオレット’（同：紫色）の花色の異なる4品種を用いた。これらの品種をパイプハウスで栽培し、出穂後小花から花蕾子房を切り取り、供試した。滅菌は実験1に準じて行った。この花蕾子房を5mm幅程度に1/2～1/3に輪切りに分割し、無菌的に培地へそれぞれ42, 49, 27, 29個を置床した。培地は実験1に準じて作成した。培養条件および調査は実験1に同様とした。

実験8. シュート形成

実験7で形成されたカルスを3～5mm角に分割し、

培地へ24~40個を置床した。培地は実験2に準じて作成した。培養条件および調査は実験2に同様とした。

5. 植物体再生, 順化

実験2で形成されたシュートをMS培地を20mlずつ分注した100mlコニカルビーカーで継代培養し、発根、球茎の形成を図った。培養条件は25℃, 白色蛍光灯で3000lx, 16時間日長とした。茎葉が枯れた時点で、形成された球茎を取出し、風乾した。休眠打破を促すため、球茎を2~5℃で3ヶ月以上低温処理後、球茎をポットに定植、栽培、開花させ、花色、花型の変異発生の有無を観察した。

結 果

1. カルス形成ならびにシュート形成に及ぼす花器部位の影響

カルス形成に及ぼす花器部位の影響を第1表に示した。カルス形成率は花被上部が0%, 花被下部が56.0%, 子房が94.0%となり、子房が最も高かった。また、カルス径が10mm以上になった割合は花被下部が23.0%, 子房が75.0%であり、子房を培養した場合に大きなカルスの比率が高まった(第1図-B)。さらに、観察結果から花被下部の中でカルス形成率が高かったのは子房に近い部分であった。カルスからのシュート形成に及ぼす花器部位の影響を第2表に示した。カルスからのシュート形成率は花被下部が64.0%, 子房が63.0%となり両者に差は認められなかった。またカルス当たりのシュート数も3~10本で、両者に差は認められなかった(第1図-C)。

以上の結果より、培養に用いる花器部位はカルス形成率の高い子房が最も適していた。

なお、カルスからのシュート形成を実体顕微鏡で観察したところ、不定芽の形成が認められた(第1図-D)。また、一部には胚様体もみられた。

2. 子房からのカルス形成ならびにシュート形成に及ぼす小花ステージの影響

子房からのカルス形成に及ぼす小花ステージの影響を第3表に示した。雑菌汚染率は未開花期が5.0%, 開花中期が10.3%, 開花終期が62.1%となり、開花終期では非常に高かったが、他の時期では低く、特に未開花期が低い傾向にあった。カルス形成率は未開花期、開花中期がともに100.0%, 開花終期が90.9%になり、いずれも高かった。カルス径が10mm以上になった割合は未開花期が78.9%, 開花中期が85.7%であり、両者に差は認められなかった。

カルスからのシュート形成に及ぼす小花ステージの影響を第4表に示した。カルスからのシュート形成率は未開花期が66.0%, 開花中期、開花終期がともに60.0%となり、小花のステージによる差は認められなかった。

カルス当たりのシュート数は小花のステージによる差がなく、3~10本であった。

以上の結果より、子房からのカルス形成に用いる小花ステージは未開花期が最も適していると考えられた。

3. 花蕾子房からのカルス形成ならびにシュート形成に及ぼす植物生長調節物質の影響

花蕾子房からのカルス形成に及ぼす植物生長調節物質の影響を第5表に示した。カルスは植物生長調節物質無添加, 1mg・liter⁻¹ 2, 4-D, 1mg・liter⁻¹ 2, 4-D+1mg・liter⁻¹ BAP, 5mg・liter⁻¹ NAAでは全く形成されなかったが、NAA, BAPの共存下で効率的に形成された。特に、5mg・liter⁻¹ NAA+5mg・liter⁻¹ BAPでカルス形成率は100%となった。

花蕾子房由来カルスからのシュート形成に及ぼすBAP濃度の影響を第6表に示した。シュート形成率はBAP無添加が20.0%, 0.1mg・liter⁻¹ が28.0%, 0.5mg・liter⁻¹ が58.0%, 2mg・liter⁻¹ が66.0%, 10mg・liter⁻¹ が64.0%になり、2mg・liter⁻¹ 添加が適していた。カルス当たりのシュート数はBAP無添加, 0.1mg・liter⁻¹, 0.5mg・liter⁻¹ が1~2本であったのに対し、2mg・liter⁻¹ および10mg・liter⁻¹ が3~10本となり、多かった。しかし観察の結果から、シュートの伸長は2mg・liter⁻¹ がすぐれていた。

以上の結果より、花蕾子房からのカルス形成にはNAA, BAPともに5mg・liter⁻¹ を添加することが、またカルスからのシュート形成には2mg・liter⁻¹ BAPを添加することが適していると考えられた。

4. 花蕾子房からのカルス形成ならびにシュート形成の品種間差異

花蕾子房からのカルス形成と品種の関係を第7表に示した。カルスは4品種ともすべて形成された。カルスの大きさは‘トパーズ’に10mm未満が2.5%であった以外はすべて10mm以上で大きかった。カルス形成において4品種に差はなかった。

花蕾子房由来カルスからのシュート形成と品種の関係を第8表に示した。カルスからのシュート形成率は‘トラベラー’が47.6%, ‘トパーズ’が25.9%, ‘バイオレッ

Table 1. Flower parts and their callus formation potential in *Gladiolus* cv. Traveler.

Flower part	No. of explants	Explants producing callus (%)		
		< 10 mm	≥ 10 mm	Total
Perianth upper part	100	0	0	0
Perianth lower part	100	33 (33.0)	23 (23.0)	56 (56.0)
Ovary	84	16 (19.0)	63 (75.0)	79 (94.0)

Flower buds 2~3 day before anthesis were used. The explants were cultured on MS medium containing 5 mg・liter⁻¹ NAA and 5 mg・liter⁻¹ BAP and in dark at 25℃ for 60 days.

Fig. 1. Callus formation and plant regeneration from ovaries in *Gladiolus*.

A: The perianth and ovary, UP; upper part of perianth, LO; lower part of perianth, OV; ovary.

B: Callus formation from ovary. Bar is 5 mm.

C: Shoots regeneration from callus. Bar is 5 mm.

D: Adventitious buds formation (arrows) on a callus. Bar is 0.2 mm.

E: Plants regeneration and corm formation. Bar is 2 cm.

F: Flower from an acclimated plant.

Table 2. Flower parts and shoot regeneration from their calli in *Gladiolus* cv. Traveler.

Explant source of calli	No. of explants	Calli regenerating shoots (%)	No. of shoots per callus
Perianth lower part	100	64 (64.0)	3 ~ 10
Ovary	100	63 (63.0)	3 ~ 10

The calli were cultured on MS medium containing $2 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ BAP in 16h/photoperiod at 25°C for 60 days. The calli which had been formed from floret buds, 2~3 day before anthesis, on MS medium containing $5 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ NAA and $5 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ BAP were used for the experiment.

Table 3. Effects of developmental stage of flower on the callus formation from ovaries in *Gladiolus* cv. Traveler.

Developmental stage of flower	No. of explants	Contamination (%)	Explants producing callus (%)		
			< 10 mm	$\geq 10 \text{ mm}$	Total
² Before	20	1 (5.0)	4 (21.1)	15 (78.9)	19 (100)
Middle	39	4 (10.3)	5 (14.3)	30 (85.7)	35 (100)
End	29	18 (62.1)	6 (54.5)	4 (36.4)	10 (90.9)

² Before : 2~3 day before anthesis, middle : 2~3 day after anthesis, end : 6~7 day after anthesis. Plants were cultured in the open field. The explants were cultured on MS medium containing $5 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ NAA and $5 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ BAP and in dark at 25°C for 60 days.

Table 4. Effects of developmental stage of flower on the shoot regeneration from calli in *Gladiolus* cv. Traveler.

Developmental stage of flower	No. of calli	Calli regenerating shoots (%)	No. of shoots per callus
² Before	50	33 (66.0)	3 ~ 10
Middle	50	30 (60.0)	3 ~ 10
End	50	30 (60.0)	3 ~ 10

² Before : 2~3 day before anthesis, middle : 2~3 day after anthesis, end : 6~7 day after anthesis. The calli were cultured on MS medium containing $2 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ BAP and in 16h/photoperiod at 25°C for 60 days. The calli which had been formed from ovaries on MS medium containing $5 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ NAA and $5 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ BAP were used for the experiment.

Table 5. Effects of plant growth regulators on the callus formation from ovaries in *Gladiolus* cv. Traveler.

NAA ($\text{mg} \cdot \text{liter}^{-1}$)	2,4-D ($\text{mg} \cdot \text{liter}^{-1}$)	BAP ($\text{mg} \cdot \text{liter}^{-1}$)	No. of explants	Explants producing callus (%)		
				< 10 mm	$\geq 10 \text{ mm}$	Total
0	0	0	20	0	0	0
0	1	0	20	0	0	0
0	1	1	20	0	0	0
1	0	1	20	6 (30.0)	3 (15.0)	9 (45.0)
5	0	0	20	0	0	0
5	0	5	57	6 (10.5)	51 (89.5)	57 (100)
10	0	5	58	2 (3.4)	50 (86.2)	52 (89.7)

The explants were cultured on MS medium containing plant growth regulators and in dark at 25°C for 60 days.

タ'が10.3%, 'ヘクター'が2.0%となり, 'トラベラー'が高く, 'ヘクター'が特に低かった. また, カルス当たりのシュート数は'トラベラー', 'トパーズ'が3~10本, 'ヘクター', 'バイオレッタ'が1~2本となり, 前の2品

Table 6. Effects of BAP concentrations on the shoot regeneration from calli in *Gladiolus* cv. Traveler.

BAP ($\text{mg} \cdot \text{liter}^{-1}$)	No. of calli	Calli regenerating shoots (%)	No. of shoots per callus
0	50	10 (20.0)	1 ~ 2
0.1	50	14 (28.0)	1 ~ 2
0.5	50	29 (58.0)	3 ~ 10
2	50	33 (66.0)	3 ~ 10
10	50	32 (64.0)	3 ~ 10

The calli were cultured on MS medium containing BAP in 16h/photoperiod at 25°C for 60 days. The calli which had been formed from flower bud ovaries, 2~3 day before anthesis, on MS medium containing $5 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ NAA and $5 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ BAP were used for the experiment.

Table 7. Varietal differences in the callus formation from ovaries in *Gladiolus*.

Cultivar used (flower color)	No. of explants	Explants producing callus (%)		
		< 10 mm	$\geq 10 \text{ mm}$	Total
Traveler (pink)	24	0	24 (100)	24 (100)
Hector (red)	36	0	36 (100)	36 (100)
Topaz (yellow)	40	1 (2.5)	39 (97.5)	40 (100)
Violet (violet)	35	0	35 (100)	35 (100)

The explants were cultured on MS medium containing $5 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ NAA and $5 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ BAP in dark at 25°C for 60 days.

Table 8. Varietal differences in the shoot regeneration from calli of ovaries in *Gladiolus*.

Cultivar used (flower color)	No. of calli	Calli regenerating shoots (%)	No. of shoots per callus
Traveler (pink)	42	20 (47.6)	3 ~ 10
Hector (red)	49	1 (2.0)	1 ~ 2
Topaz (yellow)	27	7 (25.9)	3 ~ 10
Violet (violet)	29	3 (10.3)	1 ~ 2

The calli were cultured on MS medium containing $2 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ BAP in 16h/photoperiod at 25°C for 60 days. The calli which had been formed from flower bud ovaries, 2~3 day before anthesis, on MS medium containing $5 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ NAA and $5 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ BAP were used for the experiment.

種が多く, 後の2品種が少なかった.

以上の結果より, カルス形成には品種間差異は少なかったが, カルスからのシュート形成には品種間差異が認められた.

5. 植物体再生, 順化

形成されたシュートは継代培養後, 発根し, 球茎を形成した (第1図-E). この球茎を定植, 栽培したところ植物体は順調に生育し, 出穂, 開花した. 開花した個体は花色が原品種の'トラベラー'と同一のピンク色で, 花型についても大きな変化は認められなかった (第1図-F).

考 察

1. 培養部位

二階堂・小野沢 (1989) はキクを用いて, ガンマ線照

射によってキメラ状に生じた花色変異を、管状花培養によってキメラを解消し、変異体を得たと報告している。グラジオラスにおいても花色変異は花被に生じ、特に花被上部には明瞭に現れる(霞ら, 1995)。そこで、本研究では開花2~3日前の蕾の花被の展開予定部からのカルス形成および直接のシュート形成を検討したが、カルス、シュートともに形成されなかった。一方、花被下部および子房からはカルス経由のシュート形成が認められた。花被下部および子房由来カルスからのシュート形成率はほぼ同じで高い傾向を示したが、カルス形成が優れていたのは子房であったので、培養部位としては子房が最適と判断した。これまでに、子房だけを培養してキメラが解消した報告はないが、観察の結果、グラジオラスでは子房の上部に続いて、花被が発達している(第1図-A)。従って、花被に生じた花色変異が花被に続く子房にも同様に生じていると推定されるので、子房の培養がキメラの解消に利用できると考えられる。

これまで、球根花きではユリ類(古川ら, 1978)、サクユリ(和田ら, 1984)、シベリア・アイリス(浅尾ら, 1993)、アマリリス(三位, 1975)、ヒヤシンス(Hussey, 1975)、オーニソガラム(Hussey, 1975, 1976)、スイセン(Sea brook ら, 1976)、ムスカリ(Hussey, 1975)、シラー(Hussey, 1975)、ハナニラ(Hussey, 1975)で子房からの直接、またはカルス経由のシュート形成が報告されている。一方グラジオラスにおいて、花器部位を用いた培養は3例が報告されているが、いずれもシュート形成には至らなかった。本研究はグラジオラスの花器部位として子房、花被下部からのシュート形成をはじめて報告するものである。

2. 子房を培養する場合の小花ステージ

本研究の最終の目的は優良な原品種の特性を変えずに、花色だけを変えた品種を育成することにある。そのためには放射線照射した球根を大量に用いて栽培し、その中から花色変異したキメラ状の変異部位を培養する手法の利用が考えられる。培養に用いる材料は露地栽培のものを多く使用する可能性が高くなるので、外植体には雑菌汚染の少ないものが望ましい。

本研究で開花終期の子房からのカルス形成は、これより以前のステージの子房とほぼ同じであったものの、雑菌汚染が多く、開花終期の子房の利用は不適当と判断した。開花中期の子房からのカルス形成率は、未開花期の子房と同じく100%であったが、開花中に受精した胚からの個体再生の可能性も考えられ、利用には不適当と判断された。これらのことから、子房培養に用いる小花の生育ステージは、雑菌による汚染率が最も低かった開花2~3日前の未開花期が最適と判断した(第3表)。なお、この生育ステージにおける花被は、花色が明瞭になっていて、キメラの判断に支障がないと考えられる。

3. 花蕾子房からのカルス形成ならびにシュート形成

Hussey (1975) はグラジオラスの子房を外植体にして、MS培地にIAA, NAA, 2, 4-Dを単独で添加した培地で培養したが、カルス、シュート形成はなかったとしている。本研究においても、花蕾子房からのカルス形成は2, 4-DやNAA単独添加では全く認められず、Hussey (1975) の報告と一致した。一方、NAAとBAPの共存下ではじめてカルス形成が認められ、特にNAA, BAPともに高濃度の $5 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ NAA+ $5 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ BAPでカルス形成率がきわめて高かった。また、カルスからのシュート形成は植物生長調節物質無添加においても20%認められたが、 $2 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ BAPで最も高かった(第6表)。

グラジオラスの花茎を外植体として、カルス、シュート形成が報告されている(Ziv ら, 1970)。このときのカルス形成培地の植物生長調節物質組成は $5 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ NAA, $0.5 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ 6-フルフリルアミノプリン(KIN)で高濃度のオーキシシンと低濃度のサイトカイニンの組み合わせであった。一方シュート形成培地の植物生長調節物質組成は $0.5 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ NAA, $0.5 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ KINであった。品種や培養部位等条件が異なるので直接比較はできないが、本研究結果とやや異なる点がみられるので、グラジオラスの培養部位、カルス、シュート形成培地の植物生長調節物質条件等をさらに検討する必要がある。

4. 花蕾子房からのカルス形成ならびにシュート形成の品種間差異

著者らは‘トラベラー’、‘ヘクター’、‘トパーズ’の花色の異なる3品種を用いて、木子茎頂を無菌的に1mm程度に摘出し、MS培地に $5 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ NAAを添加した培地で培養した場合の品種間差異を検討した。その結果、カルス形成率はいずれの品種でも98%以上で高かったが、カルスからのシュート形成率は‘トパーズ’が90%、‘トラベラー’が74%となり高かったのに対し、‘ヘクター’は18.0%で低く、品種間差異が認められた(霞ら, 1993)。この結果は、花蕾子房からのカルス形成には品種間差異が小さかったが、カルスからのシュート形成率には品種間差異があって、‘トラベラー’が比較的高く、‘ヘクター’が低かった本研究の結果とほぼ同様の傾向を示した。

以上の結果より、グラジオラスにおいて開花前の子房からの茎葉再分化系が確立できた。今後、この培養系を利用して、放射線照射によって生じたキメラ状の変異部位のキメラの解消を検討する。

摘 要

グラジオラス‘トラベラー’を主に用いて、花蕾子房か

らのカルス形成, 植物体再生条件を検討し, 以下の結果を得た.

1. カルス形成は花被下部および子房を外植体とした場合に認められ, 形成率は花被下部が 56.0%, 子房が 94.0% で子房の方が高かった. カルスからのシュート形成率は花被下部が 64.0%, 子房が 63.0% で差が認められなかった.

2. 子房からのカルス形成に用いる小花ステージは, 開花 2~3 日前の未開花期 (花蕾) が雑菌汚染率が低く, カルス, シュート形成率が高く, 適していた.

3. 花蕾子房からのカルス形成は MS 培地に NAA, BAP とともに $5 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ を添加した場合, すべての外植体からカルスが形成された.

4. カルスからのシュート形成は MS 培地に $2 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ BAP を添加した場合に最も高く, 形成率は 66.0% であった.

5. 花蕾子房からのカルス形成には品種間差異が少なかったが, カルスからのシュート形成率には品種間差異があつて, 'トラベラー' が高く, 'ヘクター' が低かった.

6. 'トラベラー' から形成されたシュートは MS 培地に継代培養後, 発根し, 球茎を形成した. この球茎を休眠打破後, 定植, 栽培した結果, 植物体は生育, 開花し, 原品種 'トラベラー' と同一のピンク色の花色で, 花型についても大きな変化は認められなかった.

謝 辞 本論文を作成するに当り, 校閲していただいた茨城県農業総合センター生物工学研究所長西村繁夫博士に深く感謝の意を表します.

引用文献

- 浅尾俊樹・河瀬晃四郎・吉岡麻理. 1993. 組織培養におけるシベリア・アイリスの花被基部組織および子房からの苗条形成. 植物組織培養, 10 : 188-190.
- Bajaj, Y. P. S., M. M. S. Sidhu and A. P. S. Gill. 1983. Some factors affecting the *in vitro* propagation of *gladiolus*. Sci. Hort. 18 : 269-275.
- 古川仁朗・佐々木弘泰・坂本立弥. 1978. ユリの花器培養に関する研究 (第 1 報) 花器各部の培養と植物体の再生について. 園学要旨, 昭 53 春 : 338-339.
- Hussey, G. 1975. Totipotency in tissue explants and callus of some members of the *Liliaceae*, *Iridaceae* and *Amaryllidaceae*. J. Exp. Bot. 26 : 253-262.
- Hussey, G. 1976. Plantlet regeneration from callus and parent tissue in *Ornithogalum thyrsoides*. J. Exp. Bot. 27 : 375-380.
- 射場章三・松原尚生・岡 充・飯塚義助・松本 孝・工藤 忠. 1965. グラジオラスに対する γ 線照射の影響 (第 3 報). 東京都立アイソトープ総合研究所年報, 4 : 85-88.
- Kamo, K., J. Chen and R. Lawson. 1990. The establishment of cell suspension cultures of *Gladiolus* that regenerate plants. In vitro Cell Dev. Biol. 26 : 425-430.
- 霞 正一・高津康正・友常秀彦・江面 浩. 1993. グラジオラス木子茎頂からの不定胚形成と植物体の再生. 育雑, 43. (別 1) : 54.
- 霞 正一・高津康正・友常秀彦・佐久間文雄・飯田修一. 1995. グラジオラス木子へのガンマ線照射によって生じた花色変異. 園学雑, 64. (別 1) : 414-415.
- Kim, K. W., J. B. Choi and K. Y. Kwon. 1988. Rapid multiplication of *Gladiolus* plants through callus culture. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 29 : 312-318 (In Korean).
- Kim, K. W. and M. S. Kang. 1992. Somatic embryogenesis and plant regeneration from *Gladiolus* callus *in vitro*. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 33 : 87-94 (In Korean).
- 三位正洋. 1975. アマリリスの組織培養に関する研究. (第 2 報) リン片組織からの器官形成の季節的変動および花梗, 子房部位からの器官形成. 園学要旨, 昭 50 春 : 314-315.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15 : 473-497.
- 二階堂孝子・小野沢芳郎. 1989. 器官培養によるキクの花枝変わりのキメラ解消とその花色解析. 茨大農学術報告, 37 : 63-69.
- 大城 閑・奥本裕昭・塚本洋太郎. 1974. グラジオラス花茎の無菌培養による器官分化. 園学要旨, 昭 49 春 : 364-365.
- Remotti, P. C. and H. J. M. Löffler. 1995. Callus induction and plant regeneration from *gladiolus*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 42 : 171-178.
- Seabrook, J. E. A., B. J. Cumming and L. O. Dionne. 1976. The *in vitro* induction of adventitious shoots and root apices on *Narcissus* (Dafodil and narcissus) cultivar tissue. Can. J. Bot. 54 : 814-819.
- 重松康司・松原尚生. 1972. 放射線照射したベゴニア・レックスに誘発したキメラ状変異部分からの変異個体の分離と育成. 園学雑, 41 : 196-200.
- Stefaniak, B. 1994. Somatic embryogenesis and plant regeneration of *Gladiolus* (*Gladiolus hort.*). Plant Cell Rep. 13 : 386-389.
- 田中政信. 1977. グラジオラスのウイルスフリー化ならびに花梗培養による増殖. 園学要旨, 昭 52 秋 : 380-381.
- Tomotsune, H., M. Kasumi and Y. Takatsu. 1994. Propagation of *Gladiolus* by somatic embryogenesis. Proc. Intl. Plant Prop. Soc. 44 : 239-244.
- 和田 薫・古川仁朗・坂本立弥. 1984. 野生ユリの繁殖に関する研究. 園学要旨, 昭 59 春 : 316-317.
- Ziv, M., A. H. Halevy and R. Shilo. 1970. Organs and plantlets regeneration of *gladiolus* through tissue culture. Ann. Bot. 34 : 671-676.