Datura innoxia の葯から誘導した培養組織および再分化植物における
染色体構成ならびにアルカロイド組成の変異

田端 守,¹⁾ 林 京子,^{1a)} 木島正夫¹⁾

京都大学薬学部¹⁾

Variation in Chromosome Constitution and Alkaloid Composition in Anther-
derived Callus Cultures and Regenerated Plants of *Datura innoxia*

MAMORU TABATA, KYOKO HAYASHI and MASAO KONOSHIMA

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University¹⁾

(Received February 19, 1977)

Callus cultures derived from haploid embryoids formed in the cultured anthers of *Datura innoxia* and the plants regenerated from these callus tissues were examined for variations in the chromosome number and the alkaloid composition. Most of the plants regenerated from callus cultures were found to be diploid as a result of spontaneous chromosome doubling presumably occurred during subculturing. In addition to diploids, a small number of haploid as well as tetraploid plants were obtained.

Although the alkaloid contents of these callus tissues were generally low, two of the cultured strains maintained relatively high contents during successive subculturings over 3 years. The average alkaloid content of the regenerated plants was similar to that of normal plants. Although in one culture strain many regenerated plants showing a higher alkaloid content (ca. 1%) were obtained, this characteristic was not transmitted to the progeny plants. Some of these regenerated plants were abnormal because they produced no detectable amount of scopolamine or hyoscyamine. Among these abnormal plants, one group contained a considerable amount of scopines and scopines and another group contained aposcopolamine. Breeding tests showed that the abnormal traits were transmitted to some of the self-pollinated progeny plants (S_1), but the abnormal alkaloid patterns disappeared completely in the subsequent generation (S_2). These results suggest that variations in the alkaloid composition found in the plants regenerated from callus tissues are not due to genetic mutations but due to *Dauermodifikation*, considered as a temporary cytoplasmic inheritance induced in cultured cells by environmental conditions.

Keywords—*Datura innoxia*; anther callus; scopolamine; hyoscyamine; aposcopolamine; chromosome number; dauermodifikation

トロパンアルカロイド含有植物の培養組織におけるアルカロイド生成能力は植物体に比較して一般に低いことが知られている。²⁾ しかし、これらの培養組織から器官分化、特に根の形成を誘導するとアルカロイド生成能が高まり、その組成も植物に近似することが *Datura*,³⁾ *Scopolia*⁴⁾ および *Atropa*⁵⁾ で見い出されている。通常、再分化植物では正常なアルカロイド組成の回復が認められるが、*Datura innoxia* の胚カルスから再分化した植物体で

- 1) Location: Sakyo-ku, Kyoto; a) Present address: 13-1, Takaramachi, Kanazawa, 金沢大学医学部法医学教室
- 2) a) W. Chan, E.J. Staba, *Lloydia*, **28**, 55 (1965); b) M.A. Netien, J. Combet, *Compt. Rend.*, **262D**, 1084 (1966); c) 木島正夫, 田端 守, 平岡 昇, 三宅久子, 生薬, **21**, 108 (1967); d) E.J. Staba, A. Jindra, *J. Pharm. Sci.*, **57**, 701 (1968); e) S.J. Stohs, *J. Pharm. Sci.*, **58**, 703 (1969); f) A.D. Krikorian, F.C. Steward, "Plant Physiology," F.C. Steward, Vol. VB, Academic Press, New York, 1969, pp. 227—326; g) 木島正夫, 田端 守, 山本久子, 平岡 昇, 薬誌, **90**, 370 (1970); h) M. Tabata, H. Yamamoto, N. Hiraoka, "Les Cultures de Tissus de Plantes," C.N.R.S., Paris, 1972, pp. 389—402.
- 3) N. Hiraoka, M. Tabata, *Phytochemistry*, **13**, 1671 (1974).
- 4) M. Tabata, H. Yamamoto, N. Hiraoka, M. Konoshima, *Phytochemistry*, **11**, 949 (1972).
- 5) S.B.R. Bhandary, H.A. Collin, E. Thomas, H.E. Street, *Ann. Bot.*, **33**, 647 (1969).

はアルカロイド組成の異常が観察されている。³⁾ このような化学的変異の実態と遺伝性の追究は、培養細胞における変異の原因の解明とその薬物生産への応用の基礎として重要であると考えられる。

本報では *Datura innoxia* の花粉を起源とするカルスの培養諸系統およびこれらから再分化させた植物体において観察された諸形質、とくに染色体構成とアルカロイド組成の変異を調査した結果を報告し、その原因について考察を加える。

実 験 の 部

植物材料およびカルス誘導 植物材料には京都大学薬学部薬草園で栽培した *Datura innoxia* MILL. を用いた。開花前の花から取り出した花粉—核期の葯を 5% カルキ液で 15 分間浸漬、3 回滅菌水で洗浄した後、Nitsch の培地⁶⁾ 上に置床した。これらを 25°、螢光灯下 (連日 12 時間照明) で培養して胚状体の発生を得た。この胚状体を 10^{-6} M 2,4-D(2,4-dichlorophenoxyacetic acid) を含む Linsmaier-Skoog 寒天培地⁷⁾ に移植して、基部からカルスを誘導した。4 個の葯から発生した 13 個の胚状体のそれぞれから得たカルスを上述の培地 (50 ml/100 ml-フラスコ) 上で 5 週間ごとに継代培養 (25°, 暗黒下) して 13 の培養系統を育成した。

分化の誘導 6 カ月間継代培養したカルスを 2,4-D の代りに 10^{-5} M kinetin を含む寒天培地 (50 ml/100 ml-フラスコ) に移植し、光条件下 (12 時間/日) で培養して茎葉の分化を誘導した。これらの茎葉を kinetin を除いた培地に移植して、根発生を促し、完全な幼植物を復元した。十分に発育した幼植物をフラスコから取り出し、バーミキュライトを含む植木鉢に移植した。2—3 週間後に土壤に植えかえたが、この際に根端の一部を取り 8-hydroxyquinoline 飽和水溶液で 4 時間前処理した後 Carnoy 液で固定、Feulgen-squash 法で染色体の顕微鏡観察を行なった。

アルカロイドの分析 50° で 2 日間熱風乾燥したカルスあるいは植物の葉を CHCl_3 抽出し、Vitali-Morin 反応⁸⁾ 後吸光度を測定し、総アルカロイド含量をアトロピン量 (乾燥重量あたりの %) として求めた。

アルカロイド組成の検討は薄層クロマトグラフィー (TLC) (Silica gel G) で行なった。展開溶媒は CHCl_3 -EtOH-28% NH_4OH (85:14:1), MeOH-28% NH_4OH (99:1) および CHCl_3 -MeOH (1:1) を使い、Dragendorff 試薬またはヨードでスポットを検出した。TLC の試料にはアルカロイドの定量に用いた残液および植物の新鮮葉の MeOH 抽出液を用いた。

カルス中の aposcopolamine, apoatropine の同定には薄層板から標品と一致するアルカロイド部分をかき取り、MeOH で抽出、MeOH を留去した残渣に H_2O と CHCl_3 を加え、 CHCl_3 層を分取してその紫外吸収スペクトル (UV) を測定した。

アルカロイド標品のうち、hyoscyamine, scopolamine-HBr, tropine は市販品を用いた。Scopoline, scopine は scopolamine のアルカリ加水分解によって得た。Apoatropine の標品は山田俊一教授から分譲を受けた。Apo-scopolamine は Willstätter らの方法⁹⁾ に従い、scopolamine から合成し、融点、核磁気共鳴スペクトル (NMR)、元素分析によって確認した。

結 果

カルスにおけるアルカロイド組成の変動

カルス誘導後 3, 10, 26, 36 カ月目にカルスの生長とアルカロイド含量を調べた (Table I)。

カルスの生長に関しては、異なる培養系統間で顕著な差が認められたのみならず、同一の培養系統においても継代培養期間中にかなりの変動が観察された。アルカロイド含量は乾燥重量当り 0.005%。前後で全般的に低かったが、No. 2-1, No. 3-1 系統が継代培養期間を通して比較的高い値 (最高 0.044%) を示した。

カルスのアルカロイド組成を TLC で検討したところ、カルス誘導後 3—10 カ月間は、hyoscyamine に相当するスポットを認めたが、その後は検出できなかった。36 カ月目においても Dragendorff 陽性のスポットが 4—12 個存在するが、apoatropine, aposcopolamine, tropine に一致するスポットが検出される系統もあった。アルカロイド含量の高い No. 2-1 系統ではこれら 3 物質以外に未同定の 4 スポットが、また No. 3-1 系統では apoatropine, aposcopolamine 以外に 10 個ものスポットが検出され、そのうち 5 個は植物に見い出されるアルカロイドに相当するものであった。

6) J.P. Nitsch, "Les Cultures de Tissus de Pantes," C.N.R.S., Paris, 1972, pp. 281—294.

7) E.M. Linsmaier, F. Skoog, *Physiol. Plant.* **18**, 100 (1965).

8) F.M. Freeman, *Analyst*, **80**, 520 (1955).

9) R. Willstätter, E. Hug, *Z. Physiol. Chem.*, **79**, 146 (1912).

TABLE I. Variation in Growth and Alkaloid Content among *Datura innoxia* Anther Callus Cultures^{a)} During Successive Subculturings

Culture line	Fresh weight (g/flask) Age (months)				Alkaloid content (% of dry wt.) Age (months)			
	3	10	26	36	3	10	26	36
1-1	11	13	16	14	.006	.003	.004	.004
1-2	6	7	9	7	.005	.004	.004	.006
1-3	8	11	10	14	—	.006	.005	.008
1-4	7	6	14	18	.011	.009	.010	.007
1-6	11	10	13	19	—	.011	.016	.005
2-1	12	12	15	11	.038	.036	.028	.044
2-4	10	12	10	11	.010	.005	.008	.004
2-5	10	11	10	15	—	.006	.006	.010
2-6	11	12	12	9	.009	.008	.004	.004
3-1	12	12	15	16	.015	.012	.010	.023
3-2	10	9	10	13	—	.008	.010	.011
3-3	8	7	13	11	—	.007	.005	.006
4	6	5	8	5	.003	.004	.004	.003

a) Static cultures in the dark at 25° for 5 weeks on Linsmaier-Skoog medium + 10⁻⁶M 2,4-D.TABLE II. Variation in Shoot and Root Formation in Variant Culture Lines Grown on Linsmaier-Skoog Medium + 10⁻⁵M Kinetin at 25° in Light for 4—5 Weeks

Culture line	Age (months)						Leaf character		Root formation
	1	3	9	12	18	24	Color	Shape	
1-1	++	+++	++	++	+	—	Green	Normal	Good
1-2	—	—	+	+	—	—	Green	Thick	Poor
1-3	—	+	+	+	—	—	Green	Thick	Poor
1-4	+	+	+	++	++	+	Green	Normal	Good
1-6	—	—	+	+	+	—	Green	Normal	Poor
2-1	+	+++	++	++	+	+	Green	Linear	None
2-4	+	++	+++	++	++	+	Green	Normal	Good
2-5	+	+	++	++	++	+	Green	Normal	Good
2-6	+	+	+	+	—	—	Green	Normal	Fair
3-1	+	+	+	++	+++	++	Variegated	Normal	Good
3-2	+	+	++	++	+	+	Green	Normal	Good
3-3	—	—	+	+	++	++	Pale green	Twisted	Good
4	+	+	+	++	+	+	Green	Large	Good

+++, ++, +: degree of shoot formation, —: no shoot formation.

分化の誘導および再分化植物の形態的変異

カルス誘導後 2,4-D 培地で 6 カ月間継代培養した葯カルス 13 株を 2,4-D を除き 10⁻⁵M kinetin を添加した培地へ移植し、以後 4—6 週間ごとに同一培地に植え継ぎ、2 年間にわたって茎葉の形成能力に関する経時的変化を追究した (Table II).

Kinetin 培地に移して 9 カ月後にはすべての系統で茎葉形成が認められたが、その形成能力は 2 年後には全般的に低下する傾向を示した。形成された葉には各培養系統に特異的な形態的変異が発見された。すなわち、No. 3-1 系統では斑入葉が、No. 3-3 系統では黄緑葉が高頻度で出現し、その他にも葉肉の厚いもの (No. 1-2, No. 1-3 系統)、線形の葉 (No. 2-1 系統)、よじれた葉 (No. 3-3 系統)、大型葉 (No. 4 系統) などの奇形が観察された。とくに No. 2-1 系統では分化したすべての葉が線形を示した。2—3 cm の高さになった茎葉を kinetin を

TABLE III. Chromosome Numbers of Plants Regenerated from *Datura innoxia* Anther Callus Cultures during a Two-year Period

Culture line	No. of plants examined	Chromosome number			
		<i>n</i>	2 <i>n</i>	4 <i>n</i>	Aneuploid
1-1	10	0	9	1	0
1-4	9	0	8	0	1(2 <i>n</i> +2)
2-4	31	1	29	1	0
2-5	31	1	30	0	0
3-1	28	0	28	0	0
3-2	5	0	4	1	0
3-3	27	0	27	0	0
4	10	0	1	9	0
Total	151	2	136	12	1

TABLE IV. Content of Vitali-positive Alkaloids in Dried Leaves of Plants Regenerated from *Datura innoxia* Anther Callus

Culture line	No. of plants examined		Alkaloid content, % of dry weight			
			Stage I		Stage II	
	Stage I ^{a)}	Stage II ^{b)}	Average	(Range)	Average	(Range)
Control	30	30	0.33	(0.07—0.62)	0.23	(0.08—0.42)
1-1	10	8	0.81	(0.34—1.64)	0.34	(0.10—0.75)
1-4	9	9	0.49	(0.31—0.65)	0.34	(0.20—0.53)
2-4	31	31	0.37	(0.07—0.88)	0.26	(0.05—0.77)
2-5	31	31	0.43	(0.06—0.99)	0.24	(0.03—0.56)
3-1	28	28	0.30	(0.03—0.70)	0.27	(0.05—0.40)
3-2	5	5	0.31	(0.17—0.65)	0.21	(0.08—0.42)
3-3	27	9	0.35	(0.09—0.57)	0.90	(0.37—1.99)
4	10	10	0.42	(0.19—0.80)	0.20	(0.03—0.36)

a) A few days before the first flowering. b) Time of the first fruiting.

除いた培地へ移植して根の分化を試みた。Table II に示したように、多くの系統では 1—4 週間後に発根して完全な植物体となった。しかし、No. 2-1 系統では全く根が形成されず、No. 1-2, 1-3, 1-6, 2-6 系統でも 1 個の茎葉あたりの発根数はわずかに 1—4 本であり、これらの植物は植木鉢に移植するとほとんど枯死した。

再分化植物の染色体数

上述の再分化植物 151 個体について根端細胞の染色体数を決定した (Table III)。その結果 90% は 2 倍体であり、他に 4 倍体、半数体および異数体が存在することが判明した。半数体は kinetin 培地へ移植直後のカルスから得られたが、その後の継代培養期間中には出現しなかった。半数体は、その葉が細長く小さいことから 2 倍体とは容易に判別できた。No. 4 系統からは 4 倍性植物が高い頻度で得られた。大型葉をもつ植物はすべて 4 倍体であった。

再分化植物のアルカロイド含量と組成

再分化植物 151 個体ならびに正常な親植物 30 個体の乾燥葉中のアルカロイド含量を求め、平均値を Table IV に示した。葉の採取は開花 2—3 日前 (stage I) と開花結実期 (stage II) の 2 回行ない、それぞれについてアルカロイド含量を調べた。その結果、正常植物の平均含量は開花前で 0.33%、開花後で 0.23% であった。再分化植物も一般的にはほぼ正常植物と同程度の含量値を示した。しかし二つの系統 No. 1-1 および No. 3-3 はそれぞれ 0.81% (開花前)、0.90% (開花後) という非常に高いアルカロイド含量を示した。特に後者は他系統と異なり開花結実期に高い含量を示すことが特徴的である。この No. 3-3 系統の再分化植物 27 個体はすべて、開花前また

Fig. 1 Alkaloid Patterns Found in Regenerated Plants

Silica gel G, CHCl_3 -EtOH- NH_4OH (85:14:1), Dragendorff reagent.TABLE V. Changes in Alkaloid Patterns among Fresh and Dried Leaves of Regenerated Plants Analysed at Growth Stages I and II^{a)}

Culture line	Relative frequencies (%) of plants with abnormal alkaloid patterns (A,B) ^{b)}							
	Fresh leaves				Dried leaves			
	Stage I		Stage II		Stage I		Stage II	
	A	B	A	B	A	B	A	B
control	0%	0%	0%	0%	0%	13%	0%	7%
3-2	0	0	0	0	20	20	60	0
3-3	0	0	0	0	44	12	22	0
2-5	0	0	0	29	32	36	23	42
1-4	0	0	0	33	22	33	22	56
3-1	0	0	11	33	61	11	21	32
2-4	0	13	5	56	55	26	13	74
1-1	33	0	0	20	20	20	50	50
4	14	29	0	60	30	30	30	50

a) See Table IV. b) See Fig. 1.

は開花後に枯死したため、完熟種子は得られなかった。半数体のアルカロイド含量は開花前 0.65%, 開花後 0.30% であった。2 倍体 (0.39% と 0.31%) と 4 倍体 (0.48% と 0.24%) との間には顕著な差は認められなかった。

再分化植物の葉中のアルカロイド組成を TLC (展開溶媒: CHCl_3 -EtOH- NH_4OH =85:14:1, Dragendorff 試薬発色) により分析した結果, Fig. 1 に示す三つの型に区別することができた。すなわち, scopolamine, hyoscyamine を示す型 (N-型), これらを含まずに apoatropine, aposcopolamine と一致するアルカロイドを比較的多量に含む型 (A-型), および scopolamine, scopolamine が検出される型 (B-型) に分類できる。

新鮮葉と乾燥葉におけるこれら 3 型の分布を培養系統別にまとめ Table V に示した。正常な母植物においては, 新鮮葉はすべて N-型のアルカロイドパターンを示したが, 乾燥葉において B-型を示す個体が開花前後とも約 10% 見出された。これに対して再分化植物のうち, No. 3-2, 3-3 系統が新鮮葉ではすべて N-型を示したが, 乾燥葉では A, B-型が高い割合で見出された。また他の系統においては新鮮葉でも N-型以外に A, B-型が認められ, その割合は乾燥葉において一層高くなった。また圃場で栽培した場合と温室栽培を比較したところ, 両者の間に 3 型の分布頻度に関する顕著な差は認められず, A, B-型の出現が栽培条件に原因するとは考えにくい。

正常植物の葉でも乾燥すると scopolamine の分解がみられることから, 乾燥過程で scopolamine 分解酵素の

活性が高くなる傾向があるものと考えられる。しかし、再分化植物では scopolamine の分解頻度が正常植物の場合よりもはるかに高く、また A-型は再分化植物にのみ特徴的に見られる。B-型に分類した植物のなかには、scopolamine, scopolamine 以外に hyoscyamine の分解産物と考えられる tropine を示した個体も少数見いだされた。

カルスにおける Scopolamine, Hyoscyamine の代謝分解

再分化植物に見られるアルカロイドの代謝異常が形態形成以前の培養細胞の段階ですでに存在するものか否かを検討するため、2, 4-D 培地で継代培養 (30 カ月) した薬カルス (培養系統 No. 1-4, 2-4, 3-1 および 4) を振とう培養し、hyoscyamine または scopolamine-HBr 各 $10^{-3}M$ を投与した。培養細胞を 1, 3, 5, 7 週間後にそれぞれ収穫し、乾燥後アルカロイドを抽出して TLC 分析 (3 種類の溶媒系) を行なったところ、いずれの系統でも、scopolamine を投与した培養細胞 (3—7 週間培養) から scopolamine 以外に、無処理区の培養細胞には全く検出されない aposcopolamine に相当する *R_f* 値を示すアルカロイドが検出された。このアルカロイドの UV 吸収曲線および Vitali-Morin 反応による色調 (茶紫色) は aposcopolamine と一致した。これらの知見から scopolamine から aposcopolamine への脱水反応がカルス内で起こるものと考えられる。Hyoscyamine を培養細胞に投与した場合も apoatropine に一致するアルカロイドが検出されることから、scopolamine と同様に脱水反応を受けるものと考えられる。さらに、scopolamine または hyoscyamine を添加した培養細胞に scopolamine または tropine の生成が認められる場合もあった。しかしこの加水分解反応は脱水反応のように常に起こらず、量的にもわずかであった。

アルカロイド変異の遺伝性

再分化植物のうちに見出された高アルカロイド含量または異常組成を示す個体の変異形質がはたして子孫に遺伝されるか否かを検討した。Table VI はアルカロイド含量が高くかつその組成に異常のみられた再分化植物およびその自殖子孫第 1 代の乾燥葉中のアルカロイド含量と組成を示したものである。1-1 系統 No. 38 および No. 70 の 2 個体はアルカロイド含量がそれぞれ 1.58%, 1.64% ときわめて高く、A-型、B-型に属する異常組成を示す再分化植物である。これら 2 個体の自殖子孫 (それぞれ 17 個体と 13 個体) について開花前の葉を調べたところ、アルカロイド含量はいずれも親植物ほど高くはなく、正常値であった。しかし、アルカロイド組成には変異がみられ、No. 38 では A,B-型が、また No. 70 では A-型の子孫個体が高頻度で出現した。A,B-型のアルカロイド含量は N-型よりも低く、ほぼ 1/2 の値になっていた。

一方、新鮮葉中のアルカロイド組成を調べたところ、自殖子孫第 1 代 30 個体のうち 28 個体が N-型であり、2 個体のみが A-型であった。さらにこの A-型 2 個体の自殖子孫 (第 2 代) 各 7 個体について新鮮葉のアルカロイド組成を追究した結果、すべて N-型であり、変異の持続性は認められなかった。

TABLE VI. Progeny Test of the Regenerated Plants with High Alkaloid Content

Plant No.	Parental plant			Selfed progeny			
	Alkaloid content (%) I ^{a)}	Alkaloid pattern ^{b)}		Alkaloid pattern I	Number of plants	Alkaloid content	
		I	II			Range (%) I	Mean (%) I
1-1-38 (2n=24)	1.58	N	A	N	7	0.38—0.68	0.50
				A	6	0.09—0.43	0.22
				B	4	0.09—0.35	0.27
1-1-70 (2n=24)	1.64	A	B	N	9	0.07—0.55	0.30
				A	4	0.09—0.26	0.17
				B	0	—	—

a) I, II: See Table IV.

b) N: normal alkaloid pattern.

A: both scopolamine and hyoscyamine were undetectable.

B: scopolamine and/or scopolamine were detected instead of scopolamine.

考 察

Datura innoxia の薬カルスの増殖は全体的に良好であり、アルカロイド生成量との相関関係は認められなかった。培養組織のトロパナルカロイド生成能力が継代培養中に低下することは *Datura*, *Scopolia* 属植物などによ

く知られている。^{2e,g,h,10)} 葯カルス 13 株のうち 11 株のアルカロイド生成についてはこれらの報告とほぼ同様の結果を得たが、2 株 (No. 2-1, 3-1 系統) については少なくとも 3 年間にわたって比較的高いアルカロイド含量を維持した。これらのカルスが花粉起源であることを考慮すると、半数性細胞集団から高アルカロイド生産株を選抜できる可能性を示唆するものと思える。

葯カルスからの茎葉分化はどの系統でも可能であったが、種々の変異した葉が見られた。これらの奇形葉をもつ茎葉は正常な茎葉に比べて根の形成能力が劣っていた。特に No. 2-1 系統の茎葉はすべて奇形である上、根の形成能力を欠くことから、持続的な形質変化が培養細胞で起こったと考えられる。

再分化植物のうち半数体は培養初期にしか出現しなかったことは、継代培養中に半数性細胞の頻度が著しく低下したことが原因であろう。また、同じ *D. innoxia* のカルスでも胚起源の場合³⁾ に比べて、花粉起源のものでは異数体の出現率は少なかった。

カルスからの再分化植物ではアルカロイド生成能力が回復されることが知られている。³⁻⁵⁾ しかし再分化植物には培養条件の影響が現われる場合も考えられ、*D. innoxia* の胚カルスからの再分化植物にはアルカロイド組成の一時的変異のみられることがすでに報告されていて、³⁾ scopolamine を含まない個体や scopolamine の代りに scopine が検出される個体が観察されている。葯カルスからの再分化植物でもアルカロイド組成に異常が認められた。すなわち、主アルカロイドである scopolamine, hyoscyamine の分解 (脱水および加水分解) が起こっていると考えられる個体が高い頻度で出現した。培養細胞においてもこれらの分解反応が起こることがアルカロイドの投与実験の結果から推察できる。またアルカロイド含量の高い (1% 以上) 個体が多数出現した。アルカロイド含量の変異は伝達されなかったが、組成の変異は自殖子孫第 1 代の多数の個体で認められた。

アルカロイド組成の変異はどの系統でも高い割合で見られ、また子孫第 1 代には伝達されるがその分離比が不規則であり、子孫第 2 代では少なくとも新鮮葉での変異が起こらなくなるなどから判断して、核内遺伝子の突然変異とは考えにくい。再分化植物にみられるこの変異は、永続変異 (Dauermodifikation) によって最も適切に説明されるものと考えられる。永続変異は環境によって誘導される細胞質の一時的変化であり、誘導刺激がなくなれば後の世代で発現性が次第に減少するような変化と定義されていて、時には数世代にもわたって変異が継続する場合もあるといわれている。細胞質の変化として、核外の遺伝情報をもつある種の自己増殖体の変化と細胞質全体の化学的性質の変化が考えられる。アルカロイド組成の変異は scopolamine, hyoscyamine の代謝分解に関与する酵素系が異常に活性化された結果と推察できる。母植物の遊離組織片を培養してカルス誘導を行なう際に一部の細胞が人為的環境要因、例えば培地中の 2,4-D や高イオン濃度等によりアルカロイド代謝を含む生化学的活性の一部修飾を受けて、持続的に変化する可能性が推測される。もしもカルスが異なる細胞質状態または生化学的活性を持つ細胞から構成されている場合、これらから再分化する植物にもこのような変異細胞が持ち込まれる可能性が考えられる。実際に、葉中のアルカロイド組成が正常である再分化植物とともに、scopolamine を分解する変異個体が多数見出されている。しかし、正常な環境下におかれた再分化植物では、異常な細胞質の生理的状态、または遺伝子の発現の再調整あるいは細胞質中の正常な自己増殖体が優先的に増殖する過程を通じて次第に生理、生化学的に正常な状態に復帰して行くものと推察される。ことにこの種の変異は生殖過程を通じて急速に消失するものと思われる。このようにカルスから再分化した植物に見られるアルカロイド組成の変異は古くから知られている永続変異で説明することが可能であると思われる。永続変異は高等植物で観察されており、*Phaseolus vulgaris* の抱水クロラル処理によって得られた奇形葉は子孫第 6 代まで継続して出現し、¹¹⁾ またさやが小型となる変異は子孫第 5—7 代まで続いている。¹²⁾

一般に培養細胞は植物体とは異なり、異常な環境条件下に置かれており、種々の変異が起こりやすいものと考えられる。したがって、再分化植物に変異が認められる場合は、これが遺伝子の突然変異による永久変異であるのか、あるいは永続変異であるかは子孫の遺伝学的な検定試験によって確かめる必要がある。

10) M. Tabata, H. Yamamoto, N. Hiraoka, *Symposia Cell Biol.*, 22, 81 (1971).

11) F.W. Hofmann, *Genetics*, 12, 284 (1927).

12) M.J. Sirks, *Z. ind. Abstamm. Verer.*, 73, 367 (1937).