

植物の組織培養

農林省野菜試験場育種部 西 貞夫・大沢勝次

はじめに

植物の組織培養とは、広範な内容を含んでいるものであって、根・葉・茎・子房・胚珠・胚・蒴・花粉などの器官を、培養して発(生)育させようとする器官培養、形成層・根や茎の柔細胞組織・胚乳組織・茎頂組織・腫瘍組織などを培養の対象とする組織培養、さらに単一の細胞やプロトプラスト(細胞壁のない遊離細胞)を扱う細胞培養などに分けることができる。

1. 植物組織培養略史

組織培養の技術とは、目的とする植物体の組織を、無菌状態で取り出して養分を含む(無菌)培地上に置き、これを分化あるいは発達させる技術のことである。植物体の一部を取り出して、長期間生育・維持させようという考えは、20世紀初頭の「植物細胞には細胞1個で分裂し、増殖する能力が潜在している」(Goebel, 1902)という主張がよりどころとなっている。この考え方によって、ドイツのHarberlandt(1902)が、ヒメオドリコソウの葉肉、表皮、おしべなどの細胞を、ガラス器内で培養したのが、植物組織培養のはじまりであるが、この実験は材料の成熟度が進みすぎていたことや、置床した組織片が小さすぎたこと、さらにもともとヒメオドリコソウが、細胞培養の困難性の高い単子葉植物であったことなどによって、成功しなかつ

た。しかし彼は、材料の切断面に傷をつけることによってできる物質のあることを認め、この物質を癒傷ホルモン(traumatin)と呼び、その切口にできる不定形の細胞集団をカルス(callus)と呼んだ。現在この「カルス」という言葉は、組織培養にとって欠くことの出来ない言葉となっている。Harberlandtのこのような試みは、動物についても行われ、1910年前後にHarrisonやCarrelらは、培地に血清や胚汁などを添加することによって、動物細胞を長期間維持・培養することに成功し、培養法の基礎が着々と確立されて行った。

植物の場合における、真の意味での組織培養の第一歩は、アメリカのWhite(1934)とフランスのGautheret(1934)の両者によって、全く独自に行われた。Whiteはトマトの根端を用い、無機塩類、糖、さらに酵母抽出物を含む培地上で、根の性質、形態を失わずにこれを増殖生長させようことを認め、Gautheretはカエデやヤナギなど木本植物の形成層の断片が、グルコースを添加したKnop液中で増殖・維持することを認めたのである。このようにして、1930年代の終りまでには、タバコ、ニンジン、トマトなどの組織を、培養基上で無限に培養しうることが明らかにされ、組織培養の基礎が一応確立されたのであるが、1940年に入るとアメリカのVan Overbeek(1941, 42)は、それまでの技術では培養の不可能であったチョウセンアサガ

オの幼胚を、ココヤシの胚乳(コナツミルク)を加えることで容易に培養しうることを見出し、コナツミルクには胚を生長させる作用やカルスを作る作用、細胞分裂を促す作用などのあることを明らかにした。その後コナツミルクは、広く組織培養一般に用いられるようになったが、その中の有効物質の検討が、カイネチンやサイトカイニン類の見出される端緒ともなり、また液体培養にコナツミルクを用いることによって、単細胞培養の成功へとつながっていった。単細胞培養を行うにあたっての問題は、単細胞をいかにして組織から傷をつけずに分離するか、ということであったが、Stewardら(1958)は組織を液体培地で回転または振盪培養することによって、培養液中に多数の単細胞が浮遊して来ることを見出した。さらに仕事を進めて1961年に、ニンジンを用いて、単細胞が遊離・浮遊している状態で回転培養を続けることによって、単細胞に細胞分裂を行わせ、細胞塊(カルス)の形成を経て、最終的にそれらから、芽や根を分化・発育させ、完全なニンジンの植物体を誘導することに成功した。このことによって、1902年にGoebelが予言しHarberlandtが実験した植物細胞の個体再生能力(totipotency)が60年後に実証されたわけである。この実験の成功は、その後の組織培養の技術と進歩に測り知れぬ影響を与え、近年におけるあらゆる分野での組織培養の、発展の基礎となったものであるといえよう。

2. 組織培養と生長調節物質

このような歴史を持つ植物組織培養は、近年になって一層めざましい発展を見せ、当初の植物生理学の領域にとどまらず、分子生物学、生化学、薬学、遺伝学、育種学などの分野にその

有効性を発揮している。その有効性の発揮は、何といても、組織培養によって、植物の一部組織片を脱分化(カルス形成)させたり、再分化(植物体誘導)させたりすることが可能であるというところであり、その限りにおいて植物ホルモンとしてのオーキシンやサイトカイニン、ジベレリンなどの働きに、最も大きな関連があるとされてきたのは当然である。

(1) 分化と形態形成

分化した組織が植物体から切りはなされて、ある特定の培養条件下におかれると、その分化の方向性を失い、組織としての特性がなくなって脱分化(カルス化)する。またいったん脱分化したカルス細胞は、特定の条件を与えられると、再び分化をはじめて、根や芽を作るのであるが、この間の物質的な要求に対して、組織培養はかなり詳細な答を出すことができる。

Skoogらは、1957年に、タバコの髓部の培養によって、根あるいは芽の分化は、カイネチン(またはアデニン)とIAA(インドール酢酸)の均衡によって支配されていることを明らかにした。すなわち、IAA濃度を 2 mg/l (約 10^{-5} M)に一定にした培地で、共存するカイネチンの濃度を0, 0.02, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 10.0 mg/l とすると、カイネチンの0.02 mg/l では根が、0.2 mg/l ではカルスが、また0.5 mg/l と1.0 mg/l では茎葉が、さらにそれ以上ではカルスの形成されることを認めた。このようにタバコの髓部が、オーキシンとカイネチンの特定濃度下で、特定の器官形成を示したわけである。この根と茎葉の分化に対するカイネチン濃度の不連続性は、分化を考えるうえで極めて興味深い事例を提示し、その後の多くの組織培養の実験例をみても、幾つかの例外を含みながらも、カルスの誘導はオーキシンまた

はその類縁物質によって引き起こされ、根や芽の分化はサイトカイニン類の添加が特定の濃度で与えられた場合に、引き起こされることを示している。

筆者らの研究室でも、多くの野菜類を用いて、各種器官組織の培養を行ってきたが、2,4-DやNAAを 10^{-5} M程度含む培地で、大半の野菜の各種器官からカルスの形成されることを認めている（例外はニンニクの貯蔵葉組織、ラッキョウとニンジンの蒴組織、イチゴの花托組織、ヤマイモの塊根内部組織などである。また芽や根の分化については、Skoogのタバコの例と異なり、多くの野菜でオーキシシンレベルよりもサイトカイニンレベルの高い培地で（例えばNAA 10^{-6} M + ベンジルアデニン 10^{-5} Mの共存する培地で）最も良く茎葉の分化することを認めている。用いた植物の種類や器官が異なり、切り取る組織片の大きさや状態が異なることによって、内生するオーキシシンやサイトカイニンのレベルの違うのが当然であり、したがって培養する植物の種類や部位が異なれば、培地中の最適オーキシシンやサイトカイニンのレベルが異なるのはむしろ当然であるが、各器官からの脱分化、再分化を支配しているものは、培地の組成、とくにオーキシシン類とサイトカイニン類の相互作用であると思われる。

植物ホルモンとして有名なジベレリンは、後述の胚珠培養などで完熟種子を得るために、良く用いられているが、カルスの形成・増殖や、器官分化などに、重要な働きをしてはいないようである。しかし作物によっては、オーキシシンとの共存効果や抑制効果などが認められることもあり、薬品として容易に手に入りやすいこともあって、組織培養培地に添加されることがある。

(2) 植物組織培養で使用される生長調節物質

以上のように、培養組織のカルス形成や茎葉分化を誘導する生長調節物質として、図1にオーキシシン類を、図2にサイトカイニン類を示した。これらオーキシシン類のうち、IAAは植物体内にあるIAA酸化酵素や光によって分解されやすく、その効果が不安定なためにカルスを形成させるオーキシシンとして適当ではない。また2,4-Dを用いると、たしかにカルスは大量に得られ、増殖も早いのが、得られたカルスは再分化（茎葉の分化）しにくくなる様に思われる

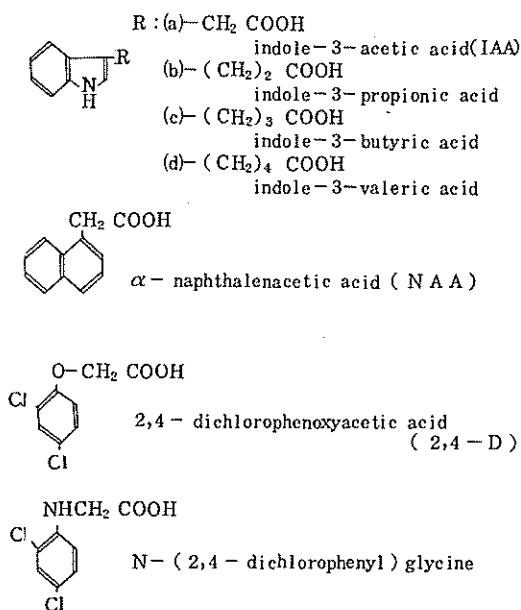


図1 オーキシシン類

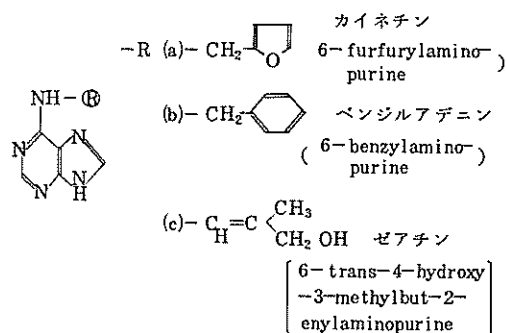


図2 サイトカイニン類

で、現在、筆者らの研究室では、効果が安定しており、茎葉の分化も良く認められるNAAをオーキシンとして使用している。またサイトカイン類としては、BA（ベンジルアデニン＝6ベンジルアミノプリン）がカイネチンよりも安価で、しかも効果が高い（ $BA 10^{-5} M$ とカイネチン $5 \times 10^{-5} M$ がほぼ同等の効果を示すようである）ので、筆者らの研究室ではBAを用いている。

3. 植物組織培養の応用場面 — とくにその育種利用 —

組織培養は、形態形成に関する研究や栄養生

表1 胚培養の育種への利用

培養の対象	属名	研究者	培養の対象	属名	研究者
同種ではあるが倍性性の異なるものの間の雑種胚	アヤメ	Werckmeister, 1934	種間雑種胚	シナガワハギ	Webster, 1955
	トウモロコシ	Uttaman, 1949		キク	金子, 1957
種間雑種胚	ア	Laibach, 1925	属間雑種胚	イ	中島ら, 1958;
	マ	Jørgensen, 1928		ネ	Bouharmont, 1961
	ス	Müntzing, 1930		アブラナ	西, 1959
	Galeopsis	Skovsted, 1935;		ドクムギ	Grant et al., 1962
	ワ	Beasley, 1940;		オオムギ	Brink et al., 1944
	タ	Weaver, 1957		×ライムギ	Blakeslee et al., 1944
	サクラ	Skirum, 1942;		チョウセンアサガオ	Iwanowskaya, 1946
	ユ	Emsweller et al., 1962		×Brugmansia	Farquharson, 1957
	リ	Skirum, 1942;		コムギ	Hall, 1954, 1956;
	チョウセンアサガオ	Emsweller et al., 1962		×トウモロコシ	渡辺ら, 1959
	トマト	Blakeslee et al., 1944;	休眠胚 (育種年限短縮)	バラ科の果樹	Von Veh, 1936;
	マツ	McLean, 1946			Tukey, 1933, 1938, 1944;
	オオムギ	Smith, 1944			Skirm, 1942;
	アカツメクサ	Stone et al., 1950			Nickell, 1951;
	アヤメ	Konzak et al., 1951;			Zdmikovskaja, 1954
	カボチャ	Davies, 1960			Randolph et al., 1943
	インゲン	Keim, 1953; Evans, 1962			Lammerts, 1946;
		Lenz, 1954			Asen, 1948
		Wall, 1954		アヤメ	
		Honma, 1955		バラ	

* 雨宮 (1964) および Sanders ら (1963) 参照。

るが、発展性に富む課題でもあり、世界中で研究が進められている。

理学、植物病理学などの分野の発展に、大きな貢献をして来たが、近年になって蒔培養による半数体の育成や試験管内受精による不和合性の除去など、育種学の分野で、幾つかの注目すべき成果をあげている。さらに最近になって、培養した植物細胞の細胞壁を酵素で除去し、異種類の細胞同士を融合させ、今まで世の中に存在しなかった、全く新しい植物を育成しようとする試みが発表されたことにより、組織培養の育種利用が大きな関心の的となっている。

もちろんこの分野の研究は、緒についたばかりであって、実際の育種に生かされるまでには、解決しなければならない多くの問題も残ってい

以下に組織培養技術の育種利用について述べてみよう。

(1) 胚 培 養

種間・属間など、遠縁植物の交配をすると、たとえ受精がなされても、雑種胚が発育を停止したり、退化・致死してしまうことが多い。その原因としては、受精後に起こる胚と周辺組織間の生育不均衡や胚乳細胞の分裂異常による退化現象などが知られている。したがってこれから雑種胚を得るためには、退化前に胚を摘出し、無菌状態で培養して、正常な胚に発育させることが必要なのである。

筆者らの研究室では、1955年以来、ハクサイとキャベツの雑種胚の培養を行っているが、ハクサイが母株の場合の雑種胚は交配後20日、キャベツが母株の場合の雑種胚は交配後30日で、それぞれ退化現象の起こることを認めている。この胚を、退化・崩壊する前に摘出して培養し、植物体を育成することに成功したが、その植物体は染色体数 $2n=19$ 本で不稔であるから、コルヒチンで倍化して複二倍体植物を育成し、種子による繁殖を可能にした。この植物は、ハクサイとキャベツの中間の形質を示す新しい野菜「ハクラン」として世に出ている。

表1には胚培養が育種に利用された例を示したが、このように極めて多くの植物を材料として種間・属間雑種胚が得られている。また休眠種子から胚を摘出して培養することによって休眠を打破し、育種年限を短縮しえたという報告もあり、育種利用はなおいろいろな面で考えられる。

(2) 胚 珠 培 養

胚培養に比べると胚珠培養の歴史は新しく、N. Maheshwari (1958) がケンを用いて、受精後の胚珠を子房から取り出し、発芽能を持つ種子にまで発育させたのが最初である。当初胚珠培養は、種子形成の機構を明らかにするため

に試みられたのであるが、今では雑種植物獲得の手段ともなっており、将来は未受精胚珠の培養による半数体育成も試みられることであろう。胚珠培養では、培養する胚珠の受粉後の日数と胎座(図3参照)がついているかが、培地上での胚珠の発育を左右しているようである。表2

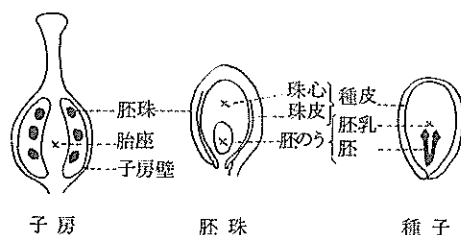


図3 種子形成模式図

に胚珠培養の例を示したが、表から明らかなように、培養に成功し完熟種子の得られた例は、球状胚程度に発育した胚を持つ胚珠が、胎座をつけた状態で培養された場合に多くみられ、反対に受精直後の胚珠を培養して、完熟種子を得た例は少ない。

胚珠中のオーキシン(IAA)の消長に関するデータも知られている。図4にモモの種子の例をあげたが、オーキシンは胚乳の発育に伴って急速に増加し、やがて最高値に達した後、胚乳の退化・消失に伴って、ふたたび急速な減少を示しているように見られる。このことから胚珠中のオーキシンが胚乳によって生産されると仮定すると、受精直後の胚珠は胚乳が未形成であるから、胚珠自身ではオーキシンを生産することができないことになる。この時期の胚珠の培養に胎座組織が必要なのは、胎座を通してオーキシンが胚珠に供給されていることを示唆するものと思われる。

(3) 試 験 管 内 受 精

柱頭上での花粉の発芽抑制や、花柱内での花粉管の伸長抑制など、遺伝的な因子に支配され

表2 種々な植物の胚珠培養

植 物 名	置床時の胚珠の stage		培 地	研 究 者
	受粉後日数	胚の stage		
タマネギ	13 日	心臓型期	N	Guha et al., 1966
アブラナ的一种	1 ~ 2	接合子期	NV	Kameya et al., 1970
Citrus microcarpa	50	球状胚期	W+CH	Rangaswamy et al., 1959
Citrus reticulata	55	球状胚期	W+CH	Sabharwal, 1963
ワタ	6	12 細胞期	W+CH+KまたはW+Ovule extract	Joshi, 1962
フウチョウソウ	4	球状胚期	N	Chopra et al., 1963
ホウセンカ	6	球状胚期	N	"
タバコ	4 ~ 5	2 細胞期	NV	Duliew, 1966
ケン	6	接合子期	NV	N. Maheshwari et al., 1961
ペチュニア	4	4 細胞期	NV+NAA	中尾ら, 1969
シロツメクサ	1*	接合子期	N+CJ	Nakajima et al., 1969
タマスダレ	5	球状胚期	NV	Sachar et al., 1959
	2	接合子期	N+CMまたはCH	Kapoor, 1959

* 開花後日数

N: Nitschの培地, NV: Nitschの培地+ビタミン, W: Whiteの培地, CH: カゼイン加水分解物, CJ: キュウリ果汁, CM: ココナツミルク, K: カイネチン, NAA: ナフタレン酢酸

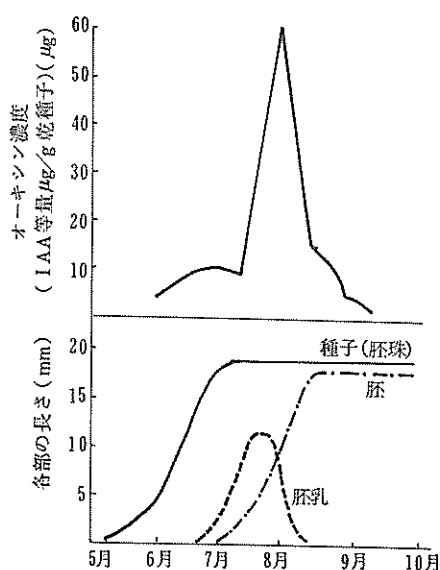


図4 胚珠の発育と胚珠中のオーキシン(モモ)
(Lloyd et al., 1966より)

ている不和合性や不親和性を示す植物では、受粉しても受精が行われず、古くから育種上の大きな問題となってきた。この古くて新しい問題に解決の糸口を与えたのはKantaら(1963)である。彼らは柱頭や花柱に存在する物質(換言すると柱頭や花柱の存在)が不和合性をもた

らす要因であることから、胚珠と花粉を試験管中で共存させることによって不和性を解消できるのではないかと考えた。そこでケンやタバコを用い、未受精の胚珠のついた胎座を切り取り、その上に無菌的に花粉を散布した。花粉は培地上や胎座・胚珠上で発芽し、胚珠内に侵入して受精し、さらに培養を続けると、完熟種子にまで発育させることができた。この研究に刺激されて、その後多くの研究者が試験管内受精の実験を続け、表3に示す植物で成功している。これらのうち、Kameyaら(1970)がユキナの胚珠にマナの花粉を受粉して、雑種植物を得ていることと、Zenkler(1967)が交雑不親和性のあるナデシコ科の数種植物で、種間・属間交配を試み、試験管内受精を利用して、発芽能力のある雑種種子を得ていることは特筆に値しよう。試験管内受精は、花粉の試験管内での発芽・受精と受精した胚珠の発育という二つの質的に異なった場面の組合せで成り立っているものであるから、①発芽能力のある無菌花粉を得る方法の検討と、②受精した胚珠を発育させる

表3 試験管内受精の成功例

植 物 名	研 究 者
ケ シ アザミゲシ ハナビシソウ Nicotiana rustica タバコ	Kanta et al., 1963
Petunia violacea*	Shivanna, 1965
カーネーション	Zenktele, 1965
タバコ*	Dulieu, 1966
キャベツ**	Kameya et al., 1966
Petunia axillaris	Rangaswamy et al., 1967
Melandrium album×M. rubrum***	Zenktele, 1967
Melandrium album×Silene schafta***	
ユキナ×マナ**,*	Kameya et al., 1970

* 子房置床

** 胚珠のみ置床、他は胎座についた胚珠を置床。

*** 種間または属間交配。

培地の検討などが、今後解明されなければならない課題であろう。

(4) 薬 培 養

1966年にデリー大学の Guha らが、チョウセンアサガオの薬を培養して embryoid (胚状体) を育成し、それらから半数体の得られたこ

とを報告して以来、薬培養の研究は世界的に注目を集めることとなった。もともと Guha らは、花粉母細胞の減数分裂を研究する目的で、種々の発育段階の薬を培養していたのであるが、培養中に半数体が得られたことにより、これが画期的な育種技術ともなったのである。薬培養によって半数体が容易に得られるならば、その倍加によって、容易に固定した純系が得られることになり、他殖性の植物はもちろんのこと、自殖性作物についても、従来の育種概念を

根本から変えるほどの育種年限短縮が可能になるはずであり、さらに半数性細胞や半数体植物は、各種形質の遺伝研究に極めてすぐれた素材を提供することになるはずである。

図5は、両親の形質が花色・葉数・葉色および草たけについて異なっており、それぞれの形

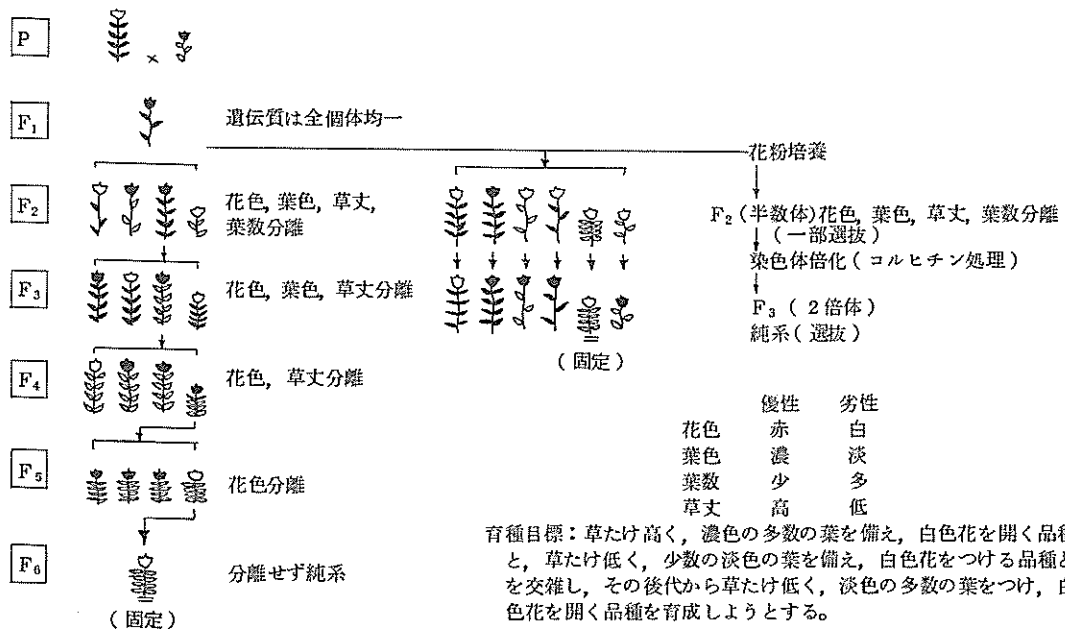


図5 交雑育種法と半数体利用育種法の比較 (中田ら, 1968)

質が、独立遺伝をする1個の遺伝子によって支配されている場合を例にとり、半数体利用の育種法と、交雑育種法との育種過程を、模式的に比較したものである(中田ら, 1968)。交雑育種法では F_2 世代において、目的とする遺伝子の組合わされた個体が、256株中1株の割合で出現するにすぎないが、この図では F_6 で固定系統が得られたとして示されている。半数体利用育種法では、半数体の形質がさまざまに分離しているが、交雑育種法に比べると遺伝子の組合せ数が少なく交雑育種法の場合の平方根分の1、すなわち16分の1の割合で出現することになるので、選抜がきわめて容易になるわけである。

収量・品質など多数の遺伝子が関与している育種では、最初は交雑育種法で出発し、 F_2 において若干の個体を選抜したのち、その花粉を培養して半数体を育成すると、効果的であると思われる。

現在までに半数体の育成に成功した代表的な

例を表4に示し、園芸作物における薬培養研究の状況(1974年現在)を表5に示した。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。その一つはチョウセンアサガオやタバコで認められるような、花粉が細胞分裂を繰り返してembryoidに発育し、これが胚に分化して幼植物となる例(図6参照)であり、他の一つはイネやコムギなどのように、花粉からカルスを形成させ、それらのカルスから器官を再分化させて幼植物をうる方法である。前者の例は今のところチョウセンアサガオとタバコ以外での利用はかなり困難と考えられるため、後者のいったんカルスを形成させる方法が、多くの作物で試みられている。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く、大半の植物ではカルスの形成には成功しても、カルスからの植物体誘導には成功できず、足踏みの状態に止まっていると

いってよい(チャ、クワ、モモ・ナシなどの果

表4 薬培養による半数体の育成

植 物 名	培 地 組 成		花粉の発育程度	研 究 者
	基本培地	主 な 添 加 物		
チョウセンアサガオ	Nitsch	CM 15 %	1核期から2核期	Guha et al., 1964, 1966, 1967
シロバナヨウシュチョウセンアサガオ	Nitsch	CM 15 %	1核期から2核期	Guha et al., 1967
タバコ	改良RM-1964	IAA 4mg/l, K 2mg/l	4分子期	中田ら(1968)
タバコ Nicotiana glauca N. glutinosa N. rustica N. sylvestris	Nitsch	IAA 0.05~0.1mg/l	1核期の終期 (体細胞分裂期の直前)	Nitsch, 1969
イネ	Miller または RM-1964	IAA 2mg/l, K 2~4mg/l または NAA 1mg/l	1核期	Niizeki et al., 1968
Brassica oleracea × B. alboglabra F_1 (キャベツ)	Nitsch	NAA 0.5~1mg/l, K 1mg/l または CM 10 %	開花前5~6日以内 の花粉粒	Kameya et al., 1970
コムギ	RM-1962	IAA 2mg/l, K 2mg/l	1核期	欧阻ら, 1972
トマト	Gresshoff	NAA 0.1mg/l, K 2mg/l	減数分裂期	Gresshoff ら, 1972
トウガラシ	RM-1962	NAA 1mg/l, K 1mg/l	1核期	王ら, 1972

CM: ココナツミルク, IAA: インドール酢酸, K: カイネチン, NAA: ナフタレン酢酸.

RM-1962: ムランゲ・スクグの培地, RM-1964: リンズマイヤー・スクグの培地.

表5 園芸作物の薬培養の現況

植 物 名	得られた成果 ^a			備 考 ^b	植 物 名	得られた成果			備 考
	カルス	根分化	植物体			カルス	根分化	植物体	
カンラン (1)	○	○	○	野菜試	イチゴ (2)	○	×	×	(b)
〃 (2)	◎	×	×	東北大	サツマイモ	○	○	○	中国農試
カンラン ×					バ	○	○	×	三重大
アルボグラブラ ^E	◎	◎	◎	東北大	キ	○	○	×	坂田種苗
ハクサイ	○	○	○	野菜試	マツバギク	○	○	×	三重大
ハクラン	○	○	○	野菜試	マツバボタン	○	○	○	三重大
ブロッコリー	○	○	○	野菜試	ヤマユリ	○	○	○	(f)
ダイコン	◎	○	×	野菜試	キカノコユリ	○	○	○	京大
ニンジン	×	×	×	野菜試	シクラメン	×	×	×	坂田種苗
トマト (1)	○	○	×	野菜試	ベチュニア	○	○	○	坂田種苗
〃 (2)	○	×	×	大阪府大	デ	○	○	○	坂田種苗
〃 (3)	◎	○	×	(i)	ヒナゲシ	○	×	×	三重大
〃 (4)	◎	◎	◎	(j)	ゼラニウム	○	○	○	(g)
ナス	○	○	○	野菜試	ナデシコ	○	×	×	三重大
ピーマン	○	○	×	野菜試	オシロイバナ	○	○	×	宮崎大
トウガラシ (1)	○	×	×	野菜試	アジサイ	○	○	×	三重大
〃 (2)	◎	◎	◎	(k)	サザンカ	○	×	×	三重大
イヌホウズキ	◎	◎	◎	(n)	ツバキ	○	×	×	三重大
オオカミナスビ	—	—	◎ ^E	(h)	モモ	○	○	×	果樹試
チョウセンアサガオ	—	—	◎ ^E	(k)	ウメ	○	×	×	果樹試
キュウリ	○	○	△	野菜試	ナシ	○	○	×	果樹試
カボチャ	○	○	×	野菜試	リンゴ	○	×	×	弘前大
マクワウリ	○	○	×	三重大	ビワ	○	×	×	果樹試
タマネギ	○	○	×	野菜試	ク	○	×	×	果樹試
アスパラガス	○	○	○	北大	ミカン	○	×	×	佐賀大
イチゴ (1)	◎	○	○	野菜試					

- a. ◎: 半数性組織の確認されたもの ○: 誘導されたもの ×: まだ誘導されていないもの E: Embryoidの形成されたもの △: 葉状体の形成されたもの
- b. (i) W.R.Sharpら(1972), (ii) P.M.Gresshoffら(1972), (iii) 中国科学院王ら(1972), (iv) 韓国 Harnら(1971), (v) M.Zenklerら(1971), (vi) S.Guhaら(1966), (vii) C.W.Fowlerら(1971), (viii) 大船フラワーセンター, (ix) Abo, El. Nilら(1971)

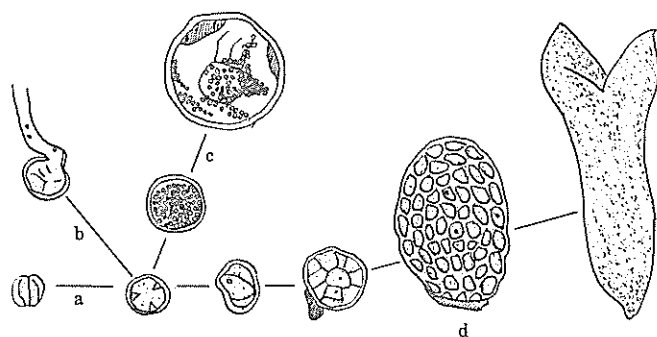


図6 培養中における花粉の形態形成

- a: 萎縮花粉 多少萎縮し中央に縦溝のある楕円体として観察されるもの。
- b: 発芽花粉
- c: 肥大花粉 内部に無数のでんぷん粒が出現するもの。
- d: 胚形成花粉 花粉は上記の変化を示さず細胞分裂をくり返して多細胞塊からなる堅い細胞集塊を形成し、やがて白色の胚に分化するもの。

樹類, トウモロコシ, エンバク, アルファルファ, シロクロバなどのマメ科牧草類, ダイコン・カボチャ・ピーマンなどの野菜類, キク・ツバキほかの花木類, スギ・マツ・サクラなど

の林木類など)。またカルスから植物体の誘導ができて、二倍体や四倍体のみが生じ、半数体の得られなかったもの(自然倍加の可能性もあるので、花粉起源でないとは断定されていないが、アスパラガス、ヤマユリ、イチゴなど)、あるいは解剖学的観察及び染色体判定などから、蒴隔あるいは蒴柔細胞起源であるとされているもの(ゼラニウム、ペチュニア、デージー、カノコユリ、サツマイモ、クワ、ナス、キャベツ、ハクサイ、ハクラン、ブロッコリー、タガランなど)、また蒴からのカルス形成も今のところ不可能なもの(ラッキョウ、ニンジン、野生イネの数種、オーチャードグラスなどイネ科牧草類の大半、数種の林木類など)などの例も報告されている。

実際に蒴培養する場合に注意すべきことは、①どのような発育段階の花粉粒を含む蒴を用いるか、②どのような成分をもつ培地を用いるか、③どの作物のどの品種を用いるか、の3点である。花粉の発育段階については、四分子期から成熟花粉まで、いろいろな発育段階のものを用いると報告されているが、減数分裂期や花粉粒にデンプンが蓄積され始めた蒴は不可で、最も反応の多い蒴は、1核期から第1分裂直後までの花粉を含むものである、という報告が多い。培地についてみると、花粉粒から直接embryoidを作る場合は、オーキシンを加えないか、加えたとしても少量であるが、カルスを形成させる場合は、比較的多量のオーキシンを用いる。こうして出来たカルスから、植物体を再生させるためには、オーキシンを含まないか、またはその濃度の低い培地に植えかえると、良い結果が得られるようである。供試作物の種類や品種については、最も蒴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、

Nicotiana tabacum, *N. alata*, *N. rustica* 及び *N. glutinosa* 4 x 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. glauca* や *N. acuminata* など14種では成功しなかったという。またイネでも、限られた品種からしか、植物体が得られていないので、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るのではなく、この点がこの技術の実際の場合での大きな問題点になっている。また Gresshoff ら(1972)は、トマト43品種(系統も含む)を供試して蒴培養し、3品種から半数性カルスを誘導し、その内半数体植物を得たのは1品種のみであったという。筆者らの研究室においても、多くの野菜類を用いた蒴培養において、作物や品種のちがいによって、顕著な反応の差が認められ、供試品種、あるいは系統の選定が、極めて重要であることが示されている。

以上述べたような、幾つかの問題点を含みながら、蒴培養は大きな前進を見せ、すでにこの技術が実際の育種事業の中にくみ込まれ、活用されて、幾つかの成果を上げている。例えば、中国ではイネやコムギで「収量が多く、茎が丈夫で倒伏しにくい」新品種が育成されたと報告されているし、我が国でもタバコ試験場で、ニコチンやタールの少ない系統の育種に蒴培養が利用されている。筆者らの研究室では、前述のようにまだ半数体の獲得には成功していないが、多くの研究者によって実験が積み重ねられているので、野菜類の半数体利用育種法の確立されるのも、それほど遠い未来ではないと期待している。

(5) カルス培養

すでに、2の(1)分化と形態形成の項でのべたように、植物の組織培養は、植物体の一部分を

脱分化（カルス形成）させたり、再分化（植物体誘導）させたりするところにその本質があり、その限りにおいて「カルス培養」であるとも言えるものである。ここで言うカルスとは、植物体の各種器官および組織など、分化の進んだ部分が、分化の方向性を失って（脱分化して）不定形の細胞塊となったものを指すが、図7にカルス培養の経過を模式図に示した。薬培養も、カルスを経由する方法は、カルス培養の一つと考えられるが、ここでは、体細胞起源カルスを中心に考えてみる。

植物は根・茎・葉・花・果実など、個体のどの部分からでも、カルスを誘導することが可能である。胚や生長点、形成層など分裂組織を含む方が形成率が良く、髄とか貯蔵組織のように、すでに分裂していない組織は、新たに分裂を誘起しなければならないので時間もかかり、移植片も5 mm以上の大きさが必要である。カルスを誘導し生長を続けさせるためには、無機塩類のほか、糖、ビタミンB類、オーキシシンなどを培地に加えることが必要である。これらの合成培地のみで、カルス誘導の困難なものには、CM（コナツミルク）やYE（イーストエキストラクト）など、いろいろの抽出物の添加が

有効である。

組織培養の歴史の当初から、カルス細胞が扱われて来たため、カルス細胞の形成に関しては、多くの知見が得られているが、カルス培養を育種に利用する場合に、二つの矛盾した面を常に考慮しなければならない。その一つは、カルス細胞は均一に見えるけれども、非常に変異に富んだ細胞の集団であるということであり、他の一つはそれにもかかわらず、現在までにカルスから誘導された多数の植物体は、きわめて安定していて、顕著な変異は認められていないという点である。

培養中におけるカルス細胞の染色体変異は、植物の種類や組織によっても異なるが、ほとんどの場合、そのひん度は培地の組成によって左右されており、一般にイースト抽出物やカイネチンの入っている培地を用いた場合に、染色体の倍数化する傾向が強いとされている。この原因については、現在のところ全く明らかにされていないが、この現象を利用して異数体や倍数体植物を育成することも可能であると考えられる。

山田ら（1967）は、ナスのカルス細胞を用いた実験で、培養中のカルスの染色体変異は非常

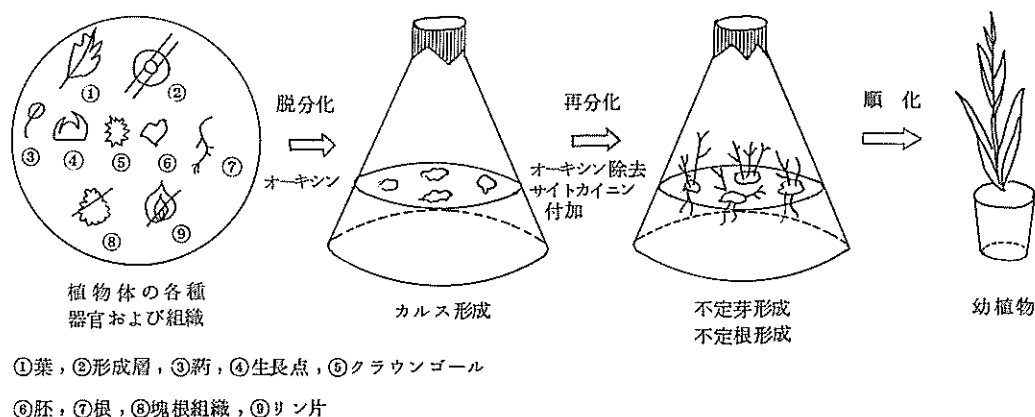


図7 カルス培養による植物体育成模式図

に大きかったが、それらカルスから誘導した植物体は、すべて通常の2倍体であったことを報じ、カルス細胞レベルでの変異性は大きくても、不定芽の分化したカルスは、2倍性の安定した細胞に集中している事実を指摘している。したがってカルス細胞における変異性と、カルスからの植物体誘導における遺伝的変異とは、次元を異にする問題とも考えられるので、今後更に多くの研究蓄積が必要であろう。

カルス培養のもう一つの利用面として、大量培養による「カルス工業」という考え方がある。これは育種というより薬学的な視点で考えられているものであるが、カルスを微生物と同じように医薬品、食品、工業製品原料を生産するための材料として、開発利用しようとするものである。この場合にも、いかにして遺伝的に均一で安定した細胞集団としてのカルスを得るかという点が、最も大きな問題点となっている。さらにまた、もし培養カルスが、培地組成や培養条件によって、遺伝的に均一で安定した系として維持しうるのであれば、遺伝質の銀行（カルスバンク）として、あらゆる遺伝形質をカルス状態で維持することも可能となり、遺伝学・育種学に画期的な貢献をすることになるはずである。

最後にカルスを経由して育成した幼植物から、ウイルスフリー株の得られることについて述べてみたい。これは筆者らの研究室で行った、イチゴの薬培養の過程で、薬のカルスから育成したイチゴが、ウイルスフリーになっていたことによって明らかになったことである。現在、筆者らはイチゴにとどまらず、ニンニク、ヤマイモ、キク

など、ウイルス汚染の激しい栄養繁殖性作物のウイルス除去にこのカルス経由の茎葉分化が有効であろうと考え、実験を進めているが、ニンニクでは発芽葉のカルスから、外観的に無病徴の植物体が得られている。

ウイルスフリー株は、従来多くの作物で生長点培養によって得られていたが、作物によってはウイルス除去がむずかしかったりするので、カルス経由によるウイルス除去の手法が確立されるならば、その有効性はきわめて大きいものがある。しかし前述のように、カルス細胞の変異性の問題が常につきまとっているのも、肉眼的には判別しにくい変異の含まれる可能性などについて、注意が必要である。育種の面からみると、ウイルスフリー株が簡便に得られるのであれば、無病苗を使ってよりの確な選抜ができることにもなる。

(6) 細胞融合

動物細胞では、ある種のウイルスが、細胞融合（細胞と細胞とが合体すること）を誘起し、融合細胞の培養が可能となっているが、植物細胞では強固な細胞壁が存在するため、細胞融合は不可能と考えられていた。しかし1960年にCockingがトマトの根から、セルラーゼ処理によって初めて細胞壁のない遊離細胞（プロトプラスト）を得る方法を見いだして以来、プロト

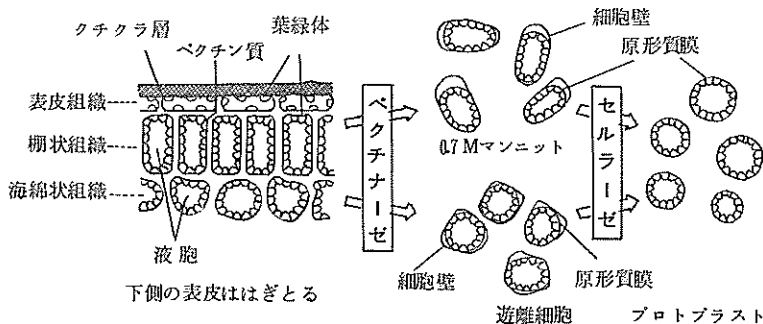


図8 葉肉組織からプロトプラストを作る方法を示す模式図（建部，1968）

プラストを用いた実験が進められる様になってきた。わが国でも建部ら(1968)は、タバコの葉肉組織からプロトプラストを作り、TMVの感染機構解明の実験系としてこれを利用した。図8にプロトプラストを作る方法を模式図で示したが、まず葉肉組織をペクチン分解酵素で崩壊させて、遊離した葉肉細胞を取り出し、次いでセルラーゼで細胞壁を分解してプロトプラストにするのである。現在ではプロトプラストの培養は、めざましい進歩をとげ、プロトプラストから細胞壁を再生させてカルスをつくり、カルスから器官形成を経て植物体を再生させるところまで進んでいる。プロトプラストの培養は、エンドウ、ダイズ、トウモロコシ、ニンジン、ハクサイなど、種々の材料で普遍化されるようになり、タバコ、ナタネ、ニンジン、ペチュニア、キンギョソウ、ユキナでは、プロトプラストからの個体復元に成功している。

植物プロトプラストの持つ最大の功績は、植物細胞における細胞融合への道を開いたことであろう。1970年にPowerらが、0.25 MのNa₂NO₃液中で、カラスミギとトウモロコシのプロトプラストを融合させたのが植物の細胞融合の初めであった。さらにKao(1974)はポリエチ

表7 細胞融合における植物プロトプラストの組合せ(Kaoら, 1974)

培養細胞プロトプラスト				葉肉細胞プロトプラスト			
ダ	イ	ズ	—	大	麦		
ダ	イ	ズ	—	トウモロコシ			
ダ	イ	ズ	—	エンドウ			
ダ	イ	ズ	—	ソラマメ			
ダ	イ	ズ	—	ナタネ			
ニンジン	—			エンドウ			
ソラマメ	—			大	麦		
ソラマメ	—			ナ	タネ		

現在までのところ、生化学的変異株が得られていないため、葉肉細胞プロトプラスト(葉緑体がある)と培養細胞プロトプラスト(葉緑体がない)との組合せにより、融合細胞の選択を行っている。上記の組合せでは細胞壁の再生、細胞分裂がみられる。

レングリコール(PEG)で処理することにより、植物プロトプラストの種類に関係なく、細胞融合を高頻度で誘起させることができると報告している(表7)。

細胞融合が可能になれば、次に来るのは融合した細胞から体細胞雑种植物を作ることである。Carlsonら(1972)はタバコのNicotiana glauca(2n=24)とN. langsdorffii(2n=18)を用い、両者のプロトプラストを0.25 MのNa₂NO₃で30分処理した後、生長ホルモンの含まれていない寒天培地で培養し、33個のカルスを得た。この場合、雑種細胞だけがカルスになり、単細胞や同種の融合細胞からは、カルスが出来なかったという。さらにこのカルスから器官分化を誘導した結果、染色体42の雑种植物が得られたと報告している。結果的に、この雑种植物は、通常の交配でも容易に得られる組合わせの雑種であったが、この研究によって、細胞融合による雑种植物育成が、現実のものとして考えられるようになったのである。

しかし、細胞融合の研究もまだ日が浅く、未だに多くの技術的な問題が残っている。例えば①植物および器官の種類を問わず、プロトプラストが誘導できるか、②同種細胞の融合と異種細胞の融合との識別、③プロトプラストが融合しても、核の融合は行われるのか、④融合した細胞からの植物体の再生が常に可能か、⑤再生した植物体の変異性即ち培養細胞の変異性はどうか、などといった点が考えられる。しかし、植物プロトプラストが、これからの遺伝学、育種学の進歩に貢献するであろうことは確実であり、筆者らのように園芸作物の品種改良にたずさわる者にとっては、全く新しい雑种植物の育成方法として、大きな期待を抱かせるものである。

4. 植物組織培養の実際

植物の組織培養には、まず適当な培地（培養基ともいう）を捜し出すことが最も大切である。それは植物の種類や組織、ステージ（令）によって、要求される養分が異なっているからであり、さらに培養の目的に応じて、最適の添加物や基礎培地（基本となる無機養分だけを含む培地で、その割合が研究者によっていろいろと考察されている。）が異なるからである。次に培養しようとする部位の無菌的採取と無菌的植えつけを行うことである。それが済めば、あとは適当な環境下（温度・湿度・光度でのコントロールされていることが望ましい）で培養し、養分の欠乏を起こさぬよう、適当な時期に適当な培地に植え継ぐことにより、目的とする植物体（あるいはクローンやカルスなど）を得ることができることになる。

(1) 培地の組成と作り方

高等植物は独立栄養を営んでいるので、個体レベルの培養は、無機養分だけで十分であるが、器官→組織→細胞とレベルが低くなるにしたがって、いろいろの養分を必要とするようになる。また、生長点や胚をそのまま正常に発育させ、植物体を得るためには、無機養分だけでよいが、生長点や胚でも、カルスを作らせようとしたり、形成層や葯など、そのままでは植物体に発育しえないものを、いったん（カルス化）脱分化させて、その後不定芽を発生させて植物体を得ようとするような場合には、必ず無機養分以外の植物生長物質の添加を必要とする。

(f) 溶媒としての水：培地を溶かす溶媒としての水は、水道水でもよいが、場所によって水質が異なるので、一度蒸溜しさらにイオン交換したものを用いることが望ましい。普通の蒸溜水中には、微量な金属イオン、特に銅イオンが

含まれている恐れがあり、これが培養組織に有害な働きをするということで、イオン交換と蒸溜を組み合わせた、再蒸溜水を用いているが、そのような設備がないところでは、井戸水や水道水をそのまま使っても、微細な培養物や特殊な培養物を扱うのでない限り、出来ないことはない。

(g) 基礎培地：筆者らの研究室で使用している主な基礎培地（無機養分培地）の組成一覧を表8に示した。目下のところ筆者ら研究室では、イチゴやトマト・キュウリなど各種野菜の葯（やく）培養、生長点培養、ニンジン・ヤマイモ・サトイモなどの表皮・塊根・形成層・茎・葉の培養、ニンニク・ラッキョウなどのりん茎の培養などを行っているが、基礎培地としては Linsmaier & Skoog の培地（別称 RM-1964 の培地）が、最も広くかつ有効に利用されるようになっている。培養液の本体をなす無機物質は、鉄分を除き、10～20 倍液程度 of 原液を作って貯蔵しておく。各液とも、 $-\text{SO}_4$ 基の含む化合物と他の物質とは、別々に蒸溜水に溶かし、完全に溶けてからまぜる。これはグループ分けしないと反応を起こし、カルシウムと結合して水に不溶の化合物の生ずる可能性があるからである。Nitsch-K や Murashige & Skoog 及び Linsmaier & Skoog の鉄分については、 $\text{Fe SO}_4 \cdot 7 \text{H}_2 \text{O}$ と $\text{Na}_2 - \text{EDTA}$ とを別々に溶かしてからまぜ、200 倍液程度の貯蔵液を作る。このようにして作った無機養分と鉄分の貯蔵液は、それぞれ着色ビンに入れて冷暗所（ $5 \sim 6^\circ \text{C}$ の冷蔵庫でよい）に置いておけば、1 年間は十分有効に使用することが可能である。有機物質は、短期間であれば、冷暗所に保存できないわけではないが、培地作成の都度溶かす方が望ましいし、それほど手間のかかるものでもない。水に易溶

表 8 主要培地組成一覽表

(単位: mg/l)

培地名	WHITE (1943)	NITSCH -K (1967)	HOLLEY & BAKER	MURASHIGE & SKOOG (RM-1962)	LINSMAIER & SKOOG (RM-1964)	MILLER (1963)	KNUDSON -C	NAKATA (1971)	(Hypoxex) KANŌ
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	288	500	500			347	1000	600	これらのかわりに 0.3 ~ 3 g/l の Hypoxex を用いる。
$\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$	453								
KNO_3	80	125	125	1900	1900	1000		200	
KCl	65					65			
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	186								
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	736	125	125	370	370	35	25	100	
$\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22	10	(*) 0.05	86	86	15	(*) (0.5)		
H_3BO_3	15	10	(*) 0.025	62	62	16	(*) (0.5)		
KI	0.75		(*) 0.25	0.83	0.83	0.8			
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$		25	10	223	223	44	(10.5)(*) 75	10	
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$		0.25		0.25	0.25		(*) (0.025)		
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$		0.025	(*) 0.025	0.025	0.025		(*) (0.00025)		
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$		0.025	(*) 0.025	0.025	0.025		(*) (0.025)		
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$			(*) 0.025						
KH_2PO_4		125	125	170	170	300	250	100	
$\text{BeSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$			(*) 0.05						
NH_4NO_3				1650	1650	1000			
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$				440	440				
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$							500		
$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$	25		25				25		
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$		(*) 278		(*) 278	(*) 278			(*) 2785	
$\text{Na}_2\text{-EDTA}$		(*) 373		(*) 373	(*) 373			(*) 3735	
Na-Fe-EDTA						32			
glycine	3	2		2		2			(*)
nicotinic acid	0.5	5		0.5		0.5			(*)
pyridoxine-HCl	0.1	0.5		0.5		0.1			(*)
thiamine-HCl	0.1	0.5	1	0.1	0.4	0.1			(*)
folic acid		0.5							(*)
biotin		0.05							(*)
sucrose	20000	(*)		30000	30000	30000	(*)	30000	(*)
myo-inositol		100		100	100			100	(*)
agar	(*)	(Agarose*) 10000		10000	10000	10000	(*)	6000	(*)
auxins	(*)	(*)	NAA 1 etc.	IAA 1~30 etc.	IAA 1~30 etc.	(*)	(*)	IAA 15	(*)
cyto-kinins	(*)	(*)	adenine 8 etc.	kinetin 0.04~10 etc.	kinetin 0.001~10 etc.	(*)	(*)	kinetin 15 adenine H_2SO_4 10	(*)
... etc. ...	(*)	(*)	(*)	(*)	(*)	(*)	(*)	thymidine 5	(*)

* 1 BERTHELOT 微量要素液に含まれる。 * 2 NITSCH 微量要素液を加用する場合。

* 3 745 g の $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ と 557 g の $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ を 1 l の水に溶かしたものを 5 cc/l 加用。

* 4 目的により、必要に応じて用いる。

* 5 Neutral component of agar, isolated by ARAKI (1956)。

なものと難溶なものがあるので、その点に注意しないと、添加した物質が有効に働いていないということにもなりかねない。例えば、有機物質のうち、糖や寒天、アミノ酸やビタミン類、Inositol、植物ホルモン中のIAA、NAA、IBAなどは水に溶けるが、2,4-Dは水には溶けないので、熱湯かアルコールに溶かす。またカイネチンやベンジルアデニン（ベンジルアミノプリンと同じもの）などは、強酸か強アルカリにしか溶けないが、通常の基礎培地は処方通りに作ると酸性に傾きやすいので、これらの化合物は強アルカリ（通常INのNaOH）を数滴落して、完全に溶けてから蒸留水を加えて用いる。滴下するIN NaOHの量が多すぎると培地全体に悪い影響を及ぼすので、注意しなければならない。

(イ) 寒天と糖：筆者らの研究室では、振盪培養（液体培養）の培地以外は、寒天 7 g/l 、ショ糖 30 g/l の固形培地を用いている。寒天には粉末寒天が使いやすいが、棒寒天を使う場合は、水につけて良く洗い付着しているゴミを落してから用いる。ショ糖の代りにグルコースなども用いられるが、市販の砂糖でも十分有効である。前述の基礎培地（各種無機養分）や薬品類が手に入らない場合は、寒天と砂糖と鉄分だけを用いて、培養培地を作ることにも可能である。

(ロ) pHの調整：以上のようにして、各種添加物を溶かし終ったならば、良く攪拌して、オートクレーブにかける前に、 $\frac{1}{10}\text{N HCl}$ と $\frac{1}{10}\text{N NaOH}$ を用いて、pHを5.8～6.0に調整する。普通WhiteやNitsch-K, Linsmaier & Skoogなどの無機養分の培地は、pH 4.5程度であり、そのままでは培養組織に不适当であり、そもそも寒天が固まらない。また培地にCMやYEを加えると（培地の緩衝作用や添加量にもよるが）、通常pHが0.2～0.5程度上がり、寒天を加える

と0.1～0.2程度下がる。またオートクレーブをかけることによっても、0.1～0.2程度下がるようである。

(ハ) 分注とキャップ：pH調整の終わった培養液は、試験管やフラスコに分注するが、この場合培地の溶液を管の口や外側につけると、培養中にその部分から雑菌が入りやすいので、十分注意が必要である。分注した試験管には、アルミホイル（2枚を二つ折りにして縦・横6 cm程度のものをつくり、かぶせる）を使ってキャップにする。従来広く使われた綿栓は、作るのが面倒なのと、培地が早く乾燥しやすいので、筆者らの研究室では、もっぱらアルミホイルを使っている。恒温培養室内で培養すれば、ほとんど雑菌も入らず、安価で使い捨てできるうえ、何よりも綿栓に比べて乾燥しにくく、長期間の培養が可能であり、かつ試験管番号や培地番号を書くこともできるので、きわめて便利である。

(ニ) 培地の殺菌：以上のようにして作成した培地の殺菌には、オートクレーブ（高圧殺菌器）を用いる。圧は 1.0 kg/cm^2 で冬期10分間、夏期15分間程度殺菌している。高圧で長時間行くと、分解したり、変性したり、また寒天が固まらなくなったりするので、なるべく短時間ですませるようにする。IAAやCM（ココナツミルク）などの、熱に弱いと言われている添加物は、従来アルコール溶液として滅菌してから加えるか、ザイツのフィルターが用いられていたが、最近はミリポアフィルターが広く利用されている。しかしオートクレーブは、筆者らの研究室で常用している範囲（ 1 kg/cm^2 圧、10～15分間程度）では、IAAもCMも処理後の変性はないようである。またチアミンは、熱によって加水分解されやすいが、普通は分解物のチアゾールとピリミジンも、同様に有効なので心

配は要らないとのことである。

(b) 斜面培地の作成：オートクレーブ処理の完了した培地は、固まる前に斜めにして放置し斜面培地を作る。斜面培地は培養材料（器官、組織など）の置床、カルスの移植、培養中の生育観察、写真撮影等、あらゆる点で平面培地に比べて便利である。

(2) 材料の分離と殺菌方法

以上のようにして無菌培地を作った後は、培養材料をいかに無菌的に採取・分離するかである。培養の目的や部位によって、殺菌方法・採取方法は異なるが、無菌的に培地に植えつけることが必須の条件である。

(i) 培養材料の殺菌方法：植物体の表面は、通常必ずカビや細菌で汚染されている。しかし、植物体の内部は、通常無菌状態であるから、生長点や葯、形成層などの内部組織を培養の材料にする場合の殺菌および無菌状態の保持は容易である。しかし葉や茎や根、表皮細胞など、直接外部に露出している部分を培養する場合の殺菌は、簡単ではない。この場合、種子繁殖性の植物で、発芽した幼植物を培養の材料にしようものでは、殺菌した種子を試験管やフラスコ内にまいて、無菌植物を育て、この植物から葉や茎や根、表皮細胞などを切り取ればよい。しかし、成熟した植物体からの組織や器官を培養しなければならないことも多く、また種子繁殖しない植物からの材料を、無菌的に育てねばならないこともあるので、この場合は殺菌に苦慮することが多い。

・殺菌剤は殺菌効果があつて、植物細胞への影響が少ないものほど良いわけであるが、殺菌力の高いものは、通常材料そのものへの害作用も高いのが普通であるから、それぞれの作物や培養部位別に、その最適殺菌方法（殺菌剤の種類、

濃度、浸漬時間など）の試験が必要となつて、くる。植物組織の殺菌には、現在サラン粉上澄液（サラン粉 1～10% 溶液の上澄液）、次亜塩素酸ソーダ液（0.5～10%）、アンチホルミン 10～200 倍液（成分は次亜塩素酸ソーダ）、ウスブルン液（800～1,500 倍液）、塩化第 2 水銀（しょうこう水）0.01～0.5% 液などが広く用いられている。これらの内サラン粉上澄液とアンチホルミン（次亜塩素酸ソーダ液）とは、毒性が残らないので使いやすいが、細菌類への殺菌力が劣ることと、時間が経つと有効塩素量が低くなってしまう欠点がある。サラン粉上澄液の場合、筆者らの研究室では、9% 溶液（ウイルソン液という）の上澄液を用いているが、作成後約 1～2 カ月で液の黄色が消えて白色化する。そうなった液は、殺菌効果が劣るので、新しく作り直さなければならない。ウスブルン液やしょう

表 9 0.1% 昇汞水（ HgCl_2 ）による植物材料の殺菌例（Butenko, 1964）

植 物 材 料	時 間	結 果
葉	ウキタサ	0.5 分 充 分
頂 芽	シソ	3 良
	ハウチワマメ	4 良
	ダイズ	15 良
	タバコ	12 充 分
	トマト	1.5 良
	ジャガイモ	3 充 分
	アサガオ	1.5 良
	コムギ	2 充 分
	タバコ	8 充 分
茎	ヒマワリ	6 充 分
	ハスノハカズラ	8 充 分
	ニンジン	15 充 分
肉質根	キクイモ	15 充 分
	ハスノハカズラ	15 良
	コムギ	10～20 良
種 子	エンドウ	8 充 分
	ダイコン	8 良

(ii) 殺菌後 4～5 分間注意深く水洗する必要がある。

こう水には残留毒性（水銀）があり、とくに目に入ると失明の恐れもあり、身体につけないことはもちろん、培養材料も殺菌液浸漬後、滅菌水で数回にわたって洗浄する必要がある。表9に0.1%しょうこう水による各種植物の殺菌例を示した。

以上述べた殺菌液を用い、材料を浸漬する前に注意すべきことがある。それは植物体の各種器官の表面は、多くの場合疎水の性質をもっているのを、それを除去してやることである。筆者らの研究室では、殺菌部位を70～99%エチルアルコールに1～2秒接触させた後、殺菌液に浸漬するようにしている。

(ロ) 培養材料の採取方法：さまざまな目的で

さまざまな器官や組織を培養するので、その採取方法も幾つかに分けることができる。今までに培養された植物の器官・部位は、ほとんど植物体のあらゆる部分に及んでいるが、どの部分からでも同じようにカルスが得られるというわけではない。細胞分裂の盛んな茎や根の頂端分裂組織、形成層などが最も培養しやすいが、一般に植物細胞は分化の進んだ器官や、すでに分裂生長を示さなくなっている組織であっても、切り出されて適当な培地上に植えられると、細胞分裂を再開することが認められる。表10に培養器官別の採取方法と殺菌方法について、筆者らの研究室で行っている手順を示したが、このように、どの部位を培養するかによって、その

表10 採取部位と殺菌方法（野菜試）

採 取 部 位	採 取 方 法	難 易	殺 菌 方 法	難 易
① 生長点及び茎頂組織	解剖顕微鏡下で無菌的に取り出す。大半の野菜類で生長点の大きさは0.2 mm程度であり訓練を要する。	難	生長点を含む芽先の部分を切り取り、ウイルソン液（サラン粉9%上澄液）に15分浸漬する。	易
② 葯及び花器	つぼみの中から肉眼あるいは拡大鏡下で取り出す。 葯の大きさは約 1～10 mm 花弁 同 1～10 mm 子房 同 1～10 mm がく 同 1～10 mm 野菜の種類、ステージで異なる。	易	密閉しているつぼみをウイルソン液に15分浸漬する。 成熟花粉やステージの進んだ花弁などで必要な時は、密閉状態時に殺菌し、後無菌シャーレ内でステージを進ませてから採取する。	易
③ 塊根及び表皮組織	メスで必要な部位を必要な大きさ・形に切り取って採取する。	易	0.1% HgCl_2 液に30分以上浸漬して用いる（3回水洗）。外気に触れている部分であり、ていねいに洗浄しても完全に殺菌することはむずかしい。	難
④ 葉・茎・根組織	メスやパンチ、コルクボーラなどで切断して採取する。	易	クレゾール石けん液で洗浄後、軽くアルコールでふき、0.01% HgCl_2 5分または0.1% HgCl_2 に1分浸漬後採取する。殺菌はむずかしい。	難
⑤ 形成層及び内部組織	コルクボーラで打ち抜き、それらを1～2 mm 間隔で輪切りにして採取する。	易	根や茎の表面はいくら殺菌してもかわかない。0.1% HgCl_2 30分又はウイルソン液30分以上浸漬。	易
⑥ りん片及び貯蔵葉細胞	メスで必要な部位を必要な大きさ、形に切り取って採取する。	易	球全体、あるいはりん片球をウイルソン液に15分浸漬する。	易

方法は異なっているのである。

(3) 培 養 条 件

このようにして採取された培養部位の、その後の生長・発育は、採取部位の大きさにもよるが、ほぼ親植物と同様に、温度・湿度・光・pHなどの環境要因によって支配される。植物組織培養の技術が多くの学問の分野で利用されるようになった最も大きな原因は、試験管などを用いて培養するのであるから、小面積・小規模な施設（培養室）で多量の培養材料を扱うことがで

き、しかもその培養室内の環境要因の制御が比較的容易であると、いう点にあったのではないかと考えられる。表 11 に 筆者らの研究室で設定している培養条件と注意点などをまとめて示した。

(4) 成 体 順 化

筆者らの研究室のように、組織培養技術を育種的手段に利用しようとしているところでは、目的どおりに試験管の中でカルスや植物体を誘導できていたとしても、それだけでは不十分で

表 11 培 養 条 件 （ 野 菜 試 ）

項 目	組織培養に用いられる範囲	野菜試の設定条件	備 考
① 温 度	15 ～ 30℃	20℃、25℃	大半の植物組織は 20 ～ 25℃ が最適であり、この範囲内であればすべて培養可能である。
② 湿 度	70 ～ 100 %	照明時 50 ～ 60 % 暗黒時 100 %	液体培地であっても寒天培地であっても、通常キャップをしている試験管内部は、90 % 以上であり、特に操作を要しない。培養室内の湿度は照明時には 50 ～ 60 % になり、暗黒時には 100 % (過湿) になっている。
③ 光	500 ～ 6000 ルクス	3000 ルクス	出来れば植物育成用ランプ（赤色光が強くなっていると思われる）を用いるとよいが、普通のけい光灯でもこの照度があれば十分である。しかし、照度が強くなると、それだけ室内の温度が上がるので、蛍光灯と培養室の間に水槽を置いて、温度の上昇を防ぐ必要がある。効果の上がる最少の照度でよいのであって、不必要に照度を上げないことが望ましい。
④ 日 長	0 ～ 16 時間	12 時間	カルスの培養・増殖などだけで植物体の誘導を目的としない場合は、暗黒条件下の培養が多く用いられる。筆者らの研究室では植物体の誘導が主体であるので、12 時間照明・12 時間暗黒の条件下で培養することが多い。
⑤ pH	5.0 ～ 7.0	5.8 ～ 6.0	植物の種類で最適 pH に差があるが、大半の植物で 5.6 ～ 6.0 であれば、培養可能である。 $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ や FeCl_3 の形で Fe を加えると、pH 5.5 以上になると鉄が不溶性の水酸化物として沈殿してしまう。鉄をキレート剤として与えると、pH 7.2 になっても鉄の不足現象は起こらない。
⑥ 組織片の大きさ	培養部位で異なる	同左	組織片の小さい方が、各種要因の影響をきびしく受けることになる。小さすぎると退化・枯死してしまうことが多い。一定以上の組織片の培養では生長調節物質は不要であるが、一定以下の組織片の培養には、その添加が必要となる。

ある。すなわち、それら試験管中の幼植物を外界に植え出し、順化させて、無事成体にまで育成させなければならないからであり、成体にして始めて育種材料として用いることができるからである。ところが生理学、発生学、薬学や形態形成など、他分野での組織培養は、試験管内での脱分化・再分化で完了とされることが多く、組織培養の手引き書にも試験管内の幼植物を、外界に順化させる方法については、ほとんど触れられていない。しかし、貴重な培養物を、試験管から外界に出した段階で枯らしてしまうことは、筆者らの研究室の場合には、致命的である。試験管内の幼植物の根は、寒天中の水分や養分を吸収する力はあるけれども、そのままでは土壌中の水分や養分を吸収する力はないのが普通である。したがって、試験管内の植物をストレートに一般土壌に植え出すと、ほとんどすべての株を枯死させてしまうことになる。

数多くの失敗を経て、現在筆者らの研究室では、試験管中で十分に発根し、茎葉伸長の認められる幼植物を、径2~4mmのれき(礫)を入れた径6cmのはちに植え出し、ハイポネックス2000倍液が3時間ごとに約30分間循環する水耕装置に置いて栽培している。この場合、試

験管から植え出した直後の数日間は、ヨシズなどを掛けて、直射日光にさらさないようにすることはもちろん、急激な湿度の変化を避けるために、ミニビーカーを各はちごとにかぶせるなどの配慮を払っている。

水耕装置などのないところでは、以下に述べる、さらに簡便な方法を用いるとよい。すなわち、イチゴの出荷などに用いられる、ポリ容器(イチゴパック)の下面に、多数の小穴をあけ、殺菌済みのパーミキュライトを入れ、そこに試験管中の幼植物を植え出す。植え出し後約一週間程度は、急激な湿度変化を防ぐために、上部に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、小穴から吸い込ませるようにする。パーミキュライトは保水性が高いので、過湿にならないように注意しなければならない。この場合の養分は2~3週間に一度、ハイポネックス2000倍液を吸い込ませて行う。図9にその模式図を示した。

おわりに

筆者の一人大沢はかつて、ある雑誌に「組織培養で育成した作物で、ほ場をうめつくしてみ

たい」と書いたことがあるが、7年経った現在、筆者らの扱っているほ場では、カルスを経由して育成したイチゴの苗が、試験ほ場をうめつくしている。その意味で、組織培養の利用は進歩し、育種の利用も現実のものとな

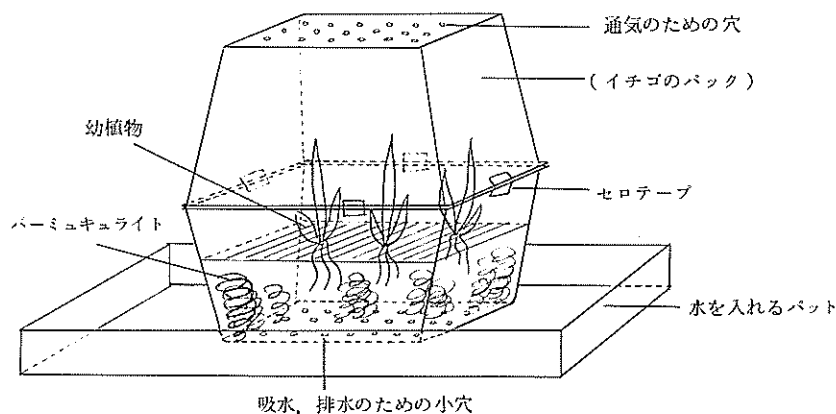


図9 簡易成体順化法

った。

本文でも述べたように、最近の組織培養の技術は、育種的利用を含むさまざまな場面で極めて著しい進歩を遂げており、野菜育種を例にとると、基礎と応用の接点を受け持つ筆者らの任務は極めて大きなものがあると考えている。この方法によって、新しい優れた作物（品種）を作り出すことの可能性が急速にひろがりつつある。たとえば、試験管内での受精現象の研究が進めば、不和合性や不親和性の除去だけでなく、全く新しい交配が可能になることも考えられるし、またカルス細胞を遺伝子バンク（銀行）として利用することも可能となるであろう。さらには他殖性野菜の半致体を作り、倍化して純系を作ることも、細胞融合によって今まで存在しえなかった作物を作ることも、可能性としては

考えられる様になったのである。

科学的な技法の進歩は、その基礎となる諸分野の発展とそれらの積み重ねとがあって、段階的に行われるというのが、通説であるが、時によっては、ある分野での発見あるいは技法の発展が、一つのトリガーとなって、それまでの停滞を一挙に破り、全体の進歩を予期しなかった方向や段階にまで押し進め、ある場合にはそれが、従来の科学（生物学）の風潮を変え、基本となる思考形態をすら変革する場合のあることも、過去においてしばしば知られている。

組織培養の技術と、その進歩の内容とは、まさにそのような様相を示しつつあるといっても、過言ではなく、単に育種への利用などに限らず、生物学全般への寄与が期待されている。

水田多年生雑草の種生態と防除

農林省農事試験場作物部 草薙得一

はじめに

最近の水田多年生雑草の増加は近年における水田の利用形態や栽培法、除草手段など農業技術の著しい変化に基因する面が大きいといわれている。たしかに雑草群落の組成変化や年次変動は、開田や基盤整備のような立地条件の変化を除けば、栽培管理や耕種操作などの変化が大きな要因として浮かび上がってくる。例えば耕起回数の減少、ロータリ耕の普及、機械除草の減退、特定除草剤の連年使用、浅水管理、早植えなどは多年生雑草の繁殖を助長しやすい要

因となりうるからである。

また多年生雑草の発生が広域化の傾向を示していることは、多年生雑草の分布の常在度からみて、最近全国的に休耕田が増加したこと、畦畔や水路の管理が粗雑になったことなどが一因とみられる。さらに伝播についてみると、ホタルイ、ヘラオモダカのように種子で繁殖する草種やウリカワのように塊茎が小さくて形成位置が浅い草種がふえていることは種苗や農機具にくっついて持ちこまれたり、休耕田から鳥類が持ち運ぶことなどが考えられる。伝播を助ける要因が灌漑水や風以外に人為的要因を強めてお