

Haworthia 属植物の花器器官の培養による花芽形成

小西達夫*・伊神光男**・本橋 強**・天野 實**

KONISHI, Tatsuo*, Mitsuo IKAMI**, Tsuyoshi MOTOHASHI** and Minoru AMANO**:
Flower Bud Formation from Cultured Floral Organs of *Haworthia* (Liliaceae)

近年、植物の器官培養を利用し、茎頂や種子の栄養成長を経ての花芽形成、葉や茎、根などの器官の一部を培養し、茎葉ばかりか花芽などの不定芽が形成される研究や、カルスを経ての不定花芽が形成されるなどの花成に関する研究が多数報告されている (van Staden and Dickens 1991)。また、花芽形成物質 (丸茂・鳥羽 1992) や花芽形成開始機構の分子遺伝学的研究 (米田 1992) も行われている。カルスを経て不定花芽が形成された例に、タバコ品種ウイスコンシン 38 (*Nicotiana tabacum* L. cv. 'Wisconsin 38') の花茎 (Aghion-Prat 1965a, 1965b)、クレピス (*Crepis capillaris* L.) の下胚軸 (Jayakar 1970)、キクニガナ (*Chicorium intybus* L.) の根 (Paulet and Nitsch, 1964; Pierik, 1966b)、ルナリア (*Lunaria annua* L.) の葉柄 (Pierik 1966a)、アカマツリ (*Plumbago indica* L.) の茎 (Nitsch and Nitsch 1967a, 1967b)、ベゴニア (*Begonia* sp.) の葉、花梗 (Ringe and Nitsch 1968)、シソ (*Perilla furtescens* Britton var. *crispa* (Thunb.) Decne.) の葉 (Tanimoto and Harada 1980)、トレンニア (*Torenia fournieri* Linden ex E. Fourn.) の節間 (Tanimoto and Harada 1979) などの培養がある。

Haworthia 属 (ユリ科) 植物については、若い花序を培養し、カルスを経て不定芽を再分化させた報告がある (Kaul and Saboharwal 1970; Majumder, 1970a, 1970b)。また、Majumder (1970c) は、*H. variegata* L. Bol., *H. sp. aff. baccata*, *H. fasciata* (Willd.) Haw. ならびに、近縁の *Astroloba* 属の *A. aspera* (Haw.) Uitew. の若い花序の節位を培養し、若い蕾を開花させた報告をした。しかし、いずれもカルス由来の花芽形成は起こらなかった。筆者らは、*H. arachnoidea* (L.) Duval と *H. cymbiformis* (Haw.) Duv. の花被片を培養し、花被片由来カルスから不定花芽が形成されることを報告した (Konishi et al. 1982)。

本報告では、花被片由来のカルスからの不定花芽の形成が、*H. arachnoidea* と *H. cymbiformis* のみに生ずる現象なのかを確かめる為に、*H. altilinea* Haw., *H. angustifolia* Haw., *H. arachnoidea*, *H. bilineata* Baker, *H. chloracantha* Haw., *H. cymbiformis*, *H. fasciata*, *H. fasciata* f. *browniana* (V. Polln.) Bayer, *H. planifolia* f. *alata*, *H. retusa* (L.) Duv. の type A, type B, type C および *H. truncata* Schönl. × *H. cuspidata* Haw. (F. 雑種) の計 8 種 2 品種 1 雑種について花被片、あるいは種によっては雌ずい、雄ずい、苞、花托および小花梗を培養した。花器器官の部位、花被片のサイズの違いが不定花芽の形成に及ぼす影響、新たに分化した花器器官の形成過程、花の咲き方や雌雄性、雌ずいの子房の室数、花粉稔性などについて調査した。ならびに、培地に添加する生長調節物質の NAA (α -naphthalenacetic acid) と KIN (Keinetin, 6-furfurylaminopurine) の濃度組み合わせについて比較検討を行った結果、形成した不定花芽に形態的異常が認められるなどの若干の知見を得たので報告する。

* 国立科学博物館 筑波研究資料センター 筑波実験植物園. Tsukuba Botanical Garden, National Science Museum, Tsukuba, 305.

** 東京農業大学農学部農学科育種学研究室. 〒156 東京都世田谷区桜ヶ丘 1-1. Department of Agriculture, Tokyo University of Agriculture, Setagaya-ku, Tokyo, 156.

材料および方法

Haworthia 属植物はユリ科の多肉植物で、南アフリカのカルー高原を中心に分布し、従来は約150種が定説であったが、最近、67種に統合整理されている (Bayer 1976)。本実験では、東京農業大学農学部農学科育種学研究室で栽培維持している *H. altilinea*, *H. angustifolia*, *H. arachnoidea*, *H. bilineata*, *H. chloracantha*, *H. cymbiformis*, *H. fasciata*, *H. fasciata* f. *browniana*, *H. planifolia* f. *alata*, *H. retusa* の type A, type B, type C および *H. truncata* × *H. cuspidata* (F₁ 雑種), 計 8 種 2 品種 1 雑種を供試材料とした。いずれも総状花序で、小花は外花被片 3, 内花被片 3, 雄ずい 6 からなり、花被は筒状で先が 2 唇形となる。材料は出穂した花序の小花が開花以前の蕾のものを採取した。なお、若い蕾とは花粉の発達段階が花粉母細胞分裂後期から花粉二核期のものを用いた。

花序を薄く希釈した中性洗剤で洗った後、滅菌水でよく洗い流し、15%アンチホルミン (5% 次亜塩素酸ナトリウム) 液に約 5 分浸漬殺菌し、再び滅菌水で洗い流し、その後ピンセットおよびメスを使い、外花被片、内花被片、雄ずい、雌ずい、苞、花托および小花柄を取り出した。花被片については 2, 3, 4 等分に切断して用いた場合もある。小花柄は節間を 3~5 mm の長さに切り取ったものを用いた。

培地は MS 培地 (Murashige and Skoog 1962) の処方をもととし、蔗糖濃度を 4%, 寒天濃度を 0.8% とした (以下 MS 培地と表記する)。以下 NAA1.0mg/l と KIN1.0mg/l の濃度で組み合わせて添加した培地を MS+NAA1+KIN1, NAA1.0mg/l と KIN2.0mg/l の濃度で組み合わせて添加した培地を MS+NAA1+KIN2, また NAA2.0mg/l と KIN1.0mg/l の濃度で組み合わせて添加した培地を MS+NAA2+KIN1 の略号で示す。なお、培地の pH は寒天添加時に 1 N HCl あるいは 1 N NaOH を用いて 5.8 に調整し、試験管 (直径 20mm × 長さ 90mm) に 10ml ずつ分注し、アルミ箔で栓をした後に、120°C で約 15 分間加圧滅菌した。培養は原則として暗所下で 26°C ± 1°C で行い、不定花芽を再分化したものを明所 (26°C ± 1°C) に移し培養した場合もある。

なお、培養物の調査は肉眼または実体顕微鏡下で行った。また、雌ずいの子房の室数、胚座数は、10.0 から 15.0 ppm のメチレンブルーで染色し、エチルアルコールで脱水し、キシロールで透明化した後に調査した。花粉稔性は 45% 酢酸カーミンで染色して観察し、核、細胞質が染まり充実しているものを稔性があると判定した。

結果および考察

1. 花被片の培養

a) カルス形成およびカルスからの根、不定芽、不定花芽の再分化

今回実験に供試した 8 種 2 品種 1 雑種のうち、*H. planifolia* f. *alata* を除く 8 種 1 品種 1 雑種の外花被片と内花被片を、MS+NAA1+KIN1, MS+NAA1+KIN2, および MS+NAA2+KIN1 の 3 種類の培地に置床し、置床後 60 日目までのカルス、根、不定芽、不定花芽の形成について調査した (Table 1)。内花被片、外花被片いずれも、置床後 3~5 日目で花被片の切り口の部分が肥大し始め、7~10 日目でカルスを形成し、21 日目には根、不定芽、不定花芽の区別が認められた。

カルスは *H. fasciata* を除いた 7 種 1 品種 1 雑種で外花被片と内花被片の両方から形成され、カルス形成反応における外花被片と内花被片の顕著な差異は認められなかった。また、カルス形成については培地の種類による差異は認められなかったが、種の違いによって差異が認められた。*H. fasciata* f. *browniana* は、MS+NAA1+KIN1 培地で内花被片、外花被片からカルスが形成されず、MS+NAA1+KIN2 と MS+NAA2+KIN1 培地で外花被片からのみにカルスを形成し、

Table 1. Flower bud formation from the inner and outer perianth segments cultured in *Haworthia* on the MS medium containing NAA and KIN

| Culture medium | MS + NAA 1 + KIN 1 | | | | | | MS + NAA 1 + KIN 2 | | | | | | MS + NAA 2 + KIN 1 | | | | | | | | |
|---|--------------------|----|----------------------------|---|---|---|--------------------|-----------------|---|----------------------------|---|----|--------------------|---|-----------------|---|----------------------------|----|---|---|---|
| | No. of explants | | No. of explants with calli | | R | S | F | No. of explants | | No. of explants with calli | | R | S | F | No. of explants | | No. of explants with calli | | R | S | F |
| <i>H. altilinea</i> | in | 2 | 2 | 0 | 1 | 0 | 2 | 1 | 0 | 1 | 0 | 2 | 2 | 0 | 1 | 1 | 2 | 2 | 0 | 1 | 1 |
| | ou | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 1 | 1 | 1 | 0 | 2 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| <i>H. angustifolia</i> | in | 9 | 8 | 3 | 1 | 1 | 9 | 7 | 1 | 2 | 0 | 7 | 6 | 2 | 1 | 2 | 9 | 8 | 2 | 1 | 2 |
| | ou | 7 | 7 | 0 | 2 | 0 | 7 | 6 | 0 | 2 | 0 | 9 | 8 | 1 | 3 | 1 | 9 | 8 | 1 | 3 | 1 |
| <i>H. arachnoidea</i> | in | 9 | 9 | 8 | 2 | 6 | 8 | 7 | 6 | 1 | 3 | 9 | 9 | 7 | 0 | 2 | 9 | 9 | 7 | 0 | 2 |
| | ou | 9 | 9 | 6 | 4 | 4 | 8 | 7 | 2 | 1 | 3 | 8 | 8 | 6 | 1 | 1 | 8 | 8 | 6 | 1 | 1 |
| <i>H. bilineata</i> | in | 12 | 9 | 1 | 0 | 0 | 12 | 6 | 0 | 0 | 0 | 12 | 10 | 0 | 0 | 0 | 12 | 10 | 0 | 0 | 0 |
| | ou | 12 | 9 | 1 | 0 | 0 | 12 | 8 | 2 | 0 | 0 | 12 | 10 | 2 | 0 | 0 | 12 | 10 | 2 | 0 | 0 |
| <i>H. chloracantha</i> | in | 3 | 2 | 0 | 1 | 0 | 3 | 2 | 0 | 2 | 0 | 3 | 2 | 1 | 1 | 0 | 3 | 2 | 0 | 2 | 0 |
| | ou | 3 | 1 | 0 | 0 | 0 | 3 | 1 | 0 | 1 | 0 | 3 | 2 | 0 | 2 | 0 | 3 | 2 | 0 | 2 | 0 |
| <i>H. cymbiformis</i> | in | 12 | 9 | 1 | 1 | 5 | 12 | 9 | 1 | 0 | 3 | 12 | 12 | 7 | 8 | 1 | 12 | 12 | 7 | 8 | 1 |
| | ou | 12 | 9 | 2 | 2 | 3 | 12 | 8 | 0 | 2 | 1 | 11 | 9 | 2 | 2 | 2 | 12 | 9 | 2 | 2 | 2 |
| <i>H. fasciata</i> | in | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | ou | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>H. fasciata</i> f. <i>browniana</i> | in | 9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 8 | 1 | 0 | 1 | 0 | 8 | 2 | 1 | 1 | 0 | 8 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | ou | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>H. retusa</i> (type A) | in | 8 | 4 | 3 | 3 | 1 | 9 | 4 | 0 | 4 | 0 | 8 | 4 | 4 | 1 | 0 | 8 | 4 | 4 | 1 | 0 |
| | ou | 7 | 4 | 4 | 3 | 0 | 9 | 4 | 0 | 0 | 0 | 9 | 4 | 2 | 0 | 1 | 9 | 4 | 2 | 0 | 1 |
| <i>H. retusa</i> (type B) | in | 3 | 3 | 0 | 1 | 2 | 4 | 4 | 0 | 2 | 0 | 4 | 4 | 0 | 0 | 2 | 4 | 4 | 0 | 0 | 2 |
| | ou | 4 | 3 | 0 | 1 | 2 | 4 | 4 | 1 | 3 | 1 | 4 | 4 | 0 | 2 | 1 | 4 | 4 | 0 | 2 | 1 |
| <i>H. retusa</i> (type C) | in | 9 | 8 | 7 | 0 | 2 | 9 | 8 | 7 | 1 | 2 | 9 | 8 | 6 | 0 | 1 | 9 | 8 | 6 | 0 | 1 |
| | ou | 9 | 6 | 5 | 0 | 1 | 9 | 9 | 2 | 2 | 1 | 9 | 9 | 7 | 1 | 0 | 9 | 9 | 7 | 1 | 0 |
| <i>H. truncata</i> × <i>H. cuspidata</i> | in | 9 | 9 | 5 | 1 | 1 | 9 | 5 | 0 | 0 | 2 | 9 | 7 | 0 | 0 | 0 | 9 | 7 | 0 | 0 | 0 |
| | ou | 9 | 8 | 2 | 0 | 3 | 9 | 8 | 0 | 0 | 2 | 9 | 9 | 0 | 0 | 3 | 9 | 9 | 0 | 0 | 3 |

MS: MS medium (Murashige & Skoog, RM-1962), NAA: Naphthalenacetic acid, KIN: Kinetin, 6-Furfurylaminopurin, in: inner perianth segment, ou: outer perianth segment, R: No. of calli which formed adventitious roots, S: No. of calli which formed adventitious shoots, and F: No. of calli which formed adventitious flower buds.

前者が1/8, 後者が2/8とカルス形成率は低かった。また, *H. altilinea* では, 供試数も少ないこともあったが, 外花被片を MS+NAA1+KIN2培地で培養した場合にはカルスが得られなかった。

カルスからの不定根の形成については, 種の違いだけでなく培地の違いによっても差異が認められた。*H. arachnoidea* と *H. cymbiformis*, *H. retusa* (type C) の3種は, MS+NAA1+KIN1, MS

+NAA1+KIN2およびMS+NAA2+KIN1の3種類のいずれの培地でも外花被片と内花被片由来のカルスからの不定根を形成した。これらの内花被と外花被の両者から得られたカルスのうち、不定根を形成したカルス数を合計して比較すると *H. arachnoidea* は、MS+NAA1+KIN1培地で14/18 (78.0%)、MS+NAA1+KIN2培地で8/14 (57.0%)、MS+NAA2+KIN1培地で13/17 (76.0%)。 *H. cymbiformis* は、MS+NAA1+KIN1培地で12/14 (85.0%)、MS+NAA1+KIN2培地で9/17 (53.0%)、MS+NAA2+KIN1培地で13/17 (76.0%)。 *H. retusa* の type C は、MS+NAA1+KIN1培地で12/14 (86.0%)、MS+NAA1+KIN2培地で9/17 (53.0%)、MS+NAA2+KIN1培地で13/17 (76.0%) で、不定根の形成率は高かった。次いで、いずれかの培地で不定根を形成したカルス数は *H. retusa* type A のMS+NAA1+KIN1培地7/8 (88.8%)、MS+NAA2+KIN1培地6/8 (75.0%)、*H. cymbiformis* のMS+NAA2+KIN1培地9/21 (20.3%)、*H. truncata* × *H. cuspidata* (F₁雑種) のMS+NAA1+KIN1培地7/17 (24.3%) であった。なお、全体的に見ると、3種類の培地でMS+NAA2+KIN1培地が他に比較して効果的に不定根を形成する傾向を示した。

カルスからの不定芽の形成は、不定根の形成と同時に、単独あるいは不定根の形成前であった。不定芽を形成したカルス数は、種や培地により異なっていた。*H. arachnoidea*, *H. cymbiformis*, *H. angustifolia*, *H. chloracantha*, *H. retusa* (type A と type B) および *H. altilinea* の7種は、3種類の全ての培地で外花被と内花被由来カルスのいずれからも不定芽が形成された。*H. retusa* の type C では、MS+NAA1+KIN2とMS+NAA2+KIN1培地、*H. truncata* × *H. cuspidata* (F₁雑種) では、MS+NAA1+KIN1培地で形成された。

カルスからの不定花芽の形成は、不定根あるいは不定芽を形成する前にほぼ同時に起こっていた。不定花芽の形成は8種1品種1雑種中 *H. altilinea*, *H. angustifolia*, *H. arachnoidea*, *H. bilineata*, *H. cymbiformis*, *H. retusa* (type A, type B, type C) および *H. truncata* × *H. cuspidata* (F₁雑種) の5種1雑種であった。このうち、最も不定花芽の形成が高率に得られたのは、*H. arachnoidea* の内花被片をMS+NAA1+KIN1培地で培養したカルスからの67.0% (6/9)、次いで *H. cymbiformis* の内花被片をMS+NAA1+KIN1培地で培養した56.0% (5/9) であった。また、*H. arachnoidea* と *H. cymbiformis* の2種は、3種類の全ての培地で、内花被片と外花被片の両方から得られたカルスから不定花芽の形成が認められた。不定花芽を形成した内花被と外花被由来のカルス数を合計して比較すると、*H. arachnoidea* がMS+NAA1+KIN1培地での55.6% (10/18) と最も高く、次いでMS+NAA1+KIN2培地の42.9% (6/14)、MS+NAA2+KIN1培地の17.8% (3/17) の順であった。*H. cymbiformis* についても同様で、MS+NAA1+KIN1培地が44.4% (8/18) で最も高く、次いでMS+NAA1+KIN2培地の23.5% (4/17)、MS+NAA2+KIN1培地の14.3% (3/21) の順であった。このことは、他の種についても同様の傾向が認められた。なお、*H. retusa* の type C では内花被片、*H. truncata* × *H. cuspidata* (F₁雑種) では外花被片から3種類の全ての培地でカルスが得られ、いずれからも不定花芽の形成が起こった。*H. angustifolia*, *H. retusa* (type A, type B, type C) および *H. truncata* × *H. cuspidata* (F₁雑種) の2種1雑種では、3種類の培地で少なくとも内花被片または外花被片のどちらかから得られたカルスから不定花芽の形成が認められた。さらに、*H. altilinea* では、MS+NAA2+KIN1培地で内花被片由来のカルスのみから不定花芽を形成した。最も低い比率で不定花芽が形成されたのは、*H. cymbiformis* の内花被片をMS+NAA1+KIN2培地で培養して得られたカルス12個中1個 (8.3%) であった。*H. bilineata*, *H. fasciata* f. *browniana*, *H. chloracantha* では、わずかにカルス形成が認められ不定根を形成することはあっても、不定花芽の形成はいずれの培地でも全く起こらなかった。これに対し、*H. fasciata* ではカルスの形成、直接の不定根や不定芽、不定花芽などの形成は全く認められなかった。

なお、不定花芽の形成は外花被片より内花被片由来のカルスがより高い比率で生ずる傾向が認められたが、MS+NAA2+KIN1培地で培養した *H. retusa* の type B とMS+NAA1+KIN1培地

で培養した *H. truncata* × *H. cuspidata* (F₁雑種) のカルスでは、内花被片より外花被片由来カルスの方が、不定花芽の形成が良好であった。また、カルスからの不定根や不定芽、不定花芽の形成は、単独に再分化する場合はごく稀で、三者を同じカルスに形成する場合もあるが、不定芽と不定根、不定花芽と不定根が同時に、または不定花芽あるいは不定芽の形成が起こった後に不定根が形成されることが殆どであった。なお、花被片からカルスを経ずに不定花芽、不定芽、不定根が直接形成されることはなかった。

b) 花被片由来カルスから得られた花芽形成の過程

H. arachnoidea の花被片を、MS+NAA2+KIN1培地で培養して得られた花被片由来のカルスからの不定花芽の代表的な形成過程は次のとおりであった。

内花被片、外花被片いずれを培養した場合も、置床後3～5日目で花被片の切口の部分が肥大してカルス化し、7～10日目でカルスが生長すると共に不定芽様突起が発達し始め、置床後15～20日目の間に、不定芽様の突起が生長し、外見上不定花芽や不定根、不定芽としての器官に分化

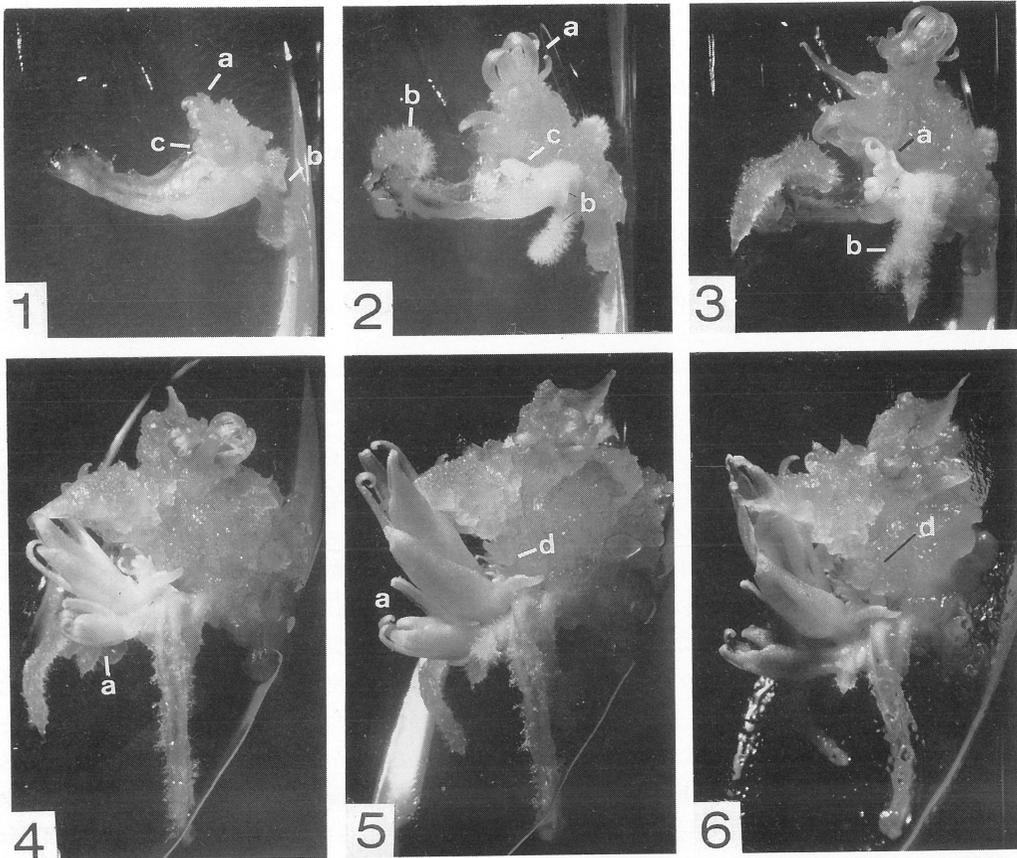


Fig. 1. Process of formation. 1: After 23 days inoculation, a = adventitious flower buds, b = adventitious root and c = adventitious flower buds like-body. 2: After 30 days inoculation, a = adventitious flower buds, b = adventitious root and c = adventitious flower buds like-body. 3: After 37 days inoculation, a = adventitious flower buds and b = adventitious root. 4: After 46 days inoculation, a = adventitious flower buds. 5: After 50 days inoculation, a = adventitious flower and d = new adventitious flower buds like-body. 6: After 52 days inoculation, d = new callus adventitious flower buds like-body.

した。置床後23日目 (Fig. 1-1) には花被片の切口部のカルスが生長し、不定花芽 (Fig. 1-1, a) と不定根 (Fig. 1-1, b) を分化し、同時に不定芽とは異なる不定花芽様突起 (Fig. 1-1, c) の形成が認められた。この不定花芽様突起は置床後30日目 (Fig. 1-2, c) にはさらに生長し、置床後37日目 (Fig. 1-3) には、若い蕾状の不定花芽として生長した (Fig. 1-3, a)。また、不定根 (Fig. 1-2, b) は白色根毛を密生し旺盛に伸び出した。しかし、置床後23日目に形成を認めた不定花芽 (Fig. 1-1, a) は生長が止まり、透明化した。置床後46日目 (Fig. 1-4) には、若い蕾状の不定花芽はさらに生長したが、置床後23日目に形成が認められた不定根 (Fig. 1-3, b) の生長は、ほぼ途中で止まった (Fig. 1-4)。なお、最初に形成された不定花芽は外観上、生長を停止し、置床後50日目 (Fig. 1-5) には新たに、不定花芽突起 (Fig. 1-5, d) を形成した。この状態のものを暗所より明所に移した2日後 (置床52日目) には、花被片の中肋様部分の両側が僅かに淡緑色を呈し、親植物の小花の蕾に似た形状となった。置床後52日目 (Fig. 1-6) になると、カルスの生長が旺盛になり、さらに新しい不定花芽突起 (Fig. 1-5, d) の形成が観察された (Fig. 1-6, d)。

すなわち、カルス形成初期に、カルスの生長を伴いながら、親植物の多汁質の多肉葉とは明らかに異なる不定花芽様小突起が認められ、この部位が発達し、不定花芽を形成する場合がほとんどであった。また、不定花芽は1試験管内の2~3ヶ所に同時期あるいは時期を異にして形成される場合や、肥大した小突起様部位や花梗様部位を有する場合などが認められたが、いずれも多汁質の多肉葉を形成せず、カルス化と同時に直接形成されたものと考えた。この形成過程は、本実験で用いた他の種の花被片由来カルスから不定花芽が形成される場合もほぼ同様の過程であった。ただし、花被片、雄ずい、雌ずいの数などの異なる形態異常が多数認められた。なお、不定芽であるか、不定花芽であるかを判定することは困難であったが、不定花芽に分化する場合は、花被片が葉のように多肉化を伴わないこと、明所条件にすると中肋が緑化すること、さらに同心円状に並ぶことなどから不定芽と区別できた。しかし、中には中間の形も認められ、明確に判定できない場合もあった。

c) 花被片由来のカルスから得られた不定花芽の形状

最も高率よく花被片由来のカルスから不定花芽の形成が認められた MS+NAA1+KIN1 の培地を用い、*H. planifolia* f. *alata* の花被片を112個培養し、置床後60日目までに再分化した61花について、花被片、雄ずい、雌ずい数などの形態的な特徴を調査した。

花被片由来のカルスから得られる不定花芽の形成のタイプは様々であったが、①花被片由来のカルスより直接形成されるタイプ (Fig. 2-1) の他に、②再分化した不定根に近い部位より形成されるタイプ (Fig. 2-2)、③再分化した不定芽の先端部に形成されるタイプ (Fig. 2-3) および④花被片より直接形成されるタイプ (Fig. 2-4) とに大別することができた。その割合は、カルスより直接形成されるタイプが54 (88.8%)、再分化した不定根に近い部位より形成されるタイプ4 (6.6%)、再分化した不定芽の先端部に形成されるタイプ2 (3.3%)、置床カルスより直接形成されるタイプ1 (1.6%) 個であった。このうち、僅か65個中1例であった④のタイプは前記した8種1品種1雑種中花被片由来カルスから不定花芽が得られた5種1雑種 (Table 1 参照) では認められなかったタイプであった。

再分化した不定花芽の形態は、親植物 (*H. planifolia* f. *alata*) と同様な形で咲く花 (Fig. 4-6) は認められなかった。大別すると次のようになる。花被片の先端が3枚ずつ上下に反転せずに、中央部に雌ずい1、雌ずいの周囲に雄ずい6、その外側に花被片6を有する両性花タイプ (Fig. 3-1)、雌ずいを欠き、雄ずいと花被片の数が少ない雄性花タイプ (Fig. 3-2)、雄ずいを欠き、花被片の数の少ない雌性花タイプ (Fig. 3-3)、さらに雄ずいと雌ずいを欠き、花被片の数が少



Fig. 2. Flower formation occurred from; 1: Callus, a = adventitious flower buds. 2: Redifferentiated adventitious roots, a = adventitious flower buds and b = adventitious root. 3: Redifferentiated shoots, a = adventitious flower buds, b = adventitious root and c = leaf and 4: Perianth explanted, a = adventitious flower buds.

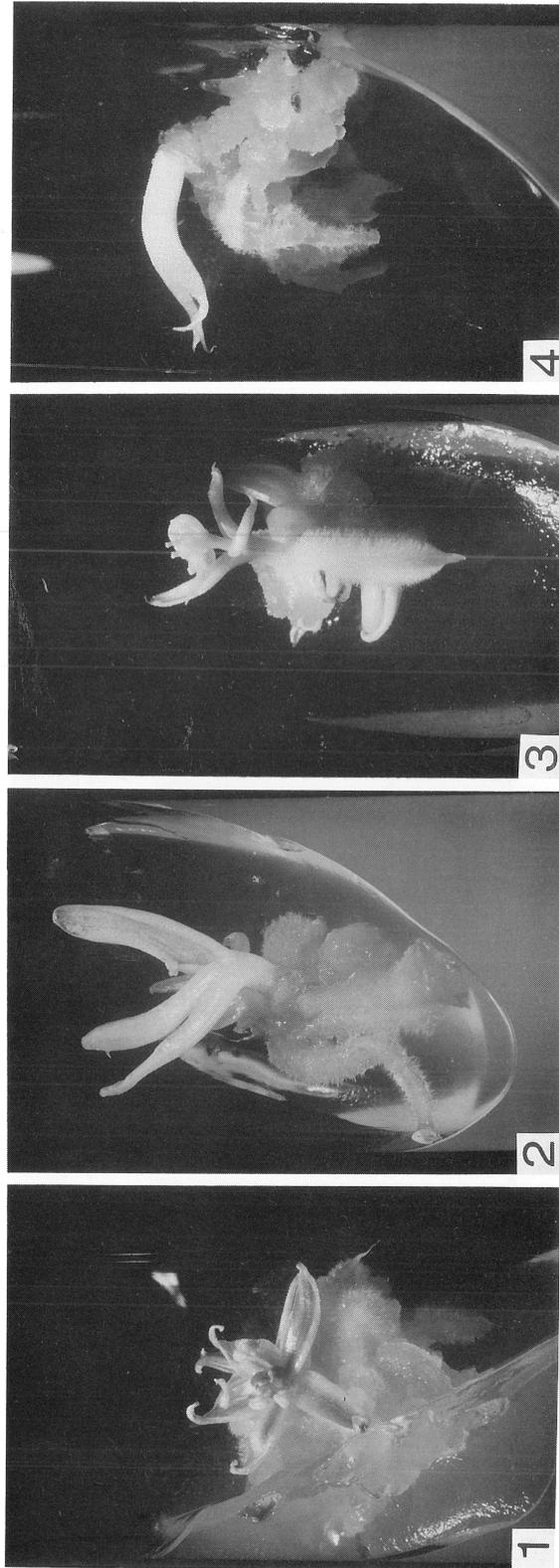


Fig. 3. Sexualities of flowers. **1:** Bisexual (male). **2:** Unisexual (female). **3:** Unisexual (male). **4:** Asexual (perianth only).

なく先端が開かない無性花タイプ (Fig. 3-4) の4タイプであった。最も多かったのは両性花タイプの49花 (77.0%) で、次いで無性花タイプの6花 (9.8%), 雄性花タイプと雌性花タイプの各4花 (6.6%), であった。

不定花芽の付き方は、両性花が単一の小花梗に咲く単一花タイプ (Fig. 4-1), 肥大した小花梗様体が2, 3に分枝して花序ようになるタイプ (Fig. 4-2), 肥大し短い幾つかの小花梗様体を分枝し、花序のようになるタイプ (Fig. 4-3), 肥大した小花梗様体が融合し数個の花あるいは花被片のみの花器を形成するタイプ (Fig. 4-4) および小花梗を欠き、花あるいは花被片の花器を形成するタイプ (Fig. 4-5) などであった。

再分化した不定花芽の雌ずいの子房の室数は、1から9まで認められ、著しい変異を示した (Table 2)。最も多かった室数は親植物と同じ3室のものが25花 (45.5%) で、次いで4室が7花 (12.7%), 2室が6花 (10.9%), 1室と5室が各5花 (9.1%), 7室が3花 (5.5%), 6室が

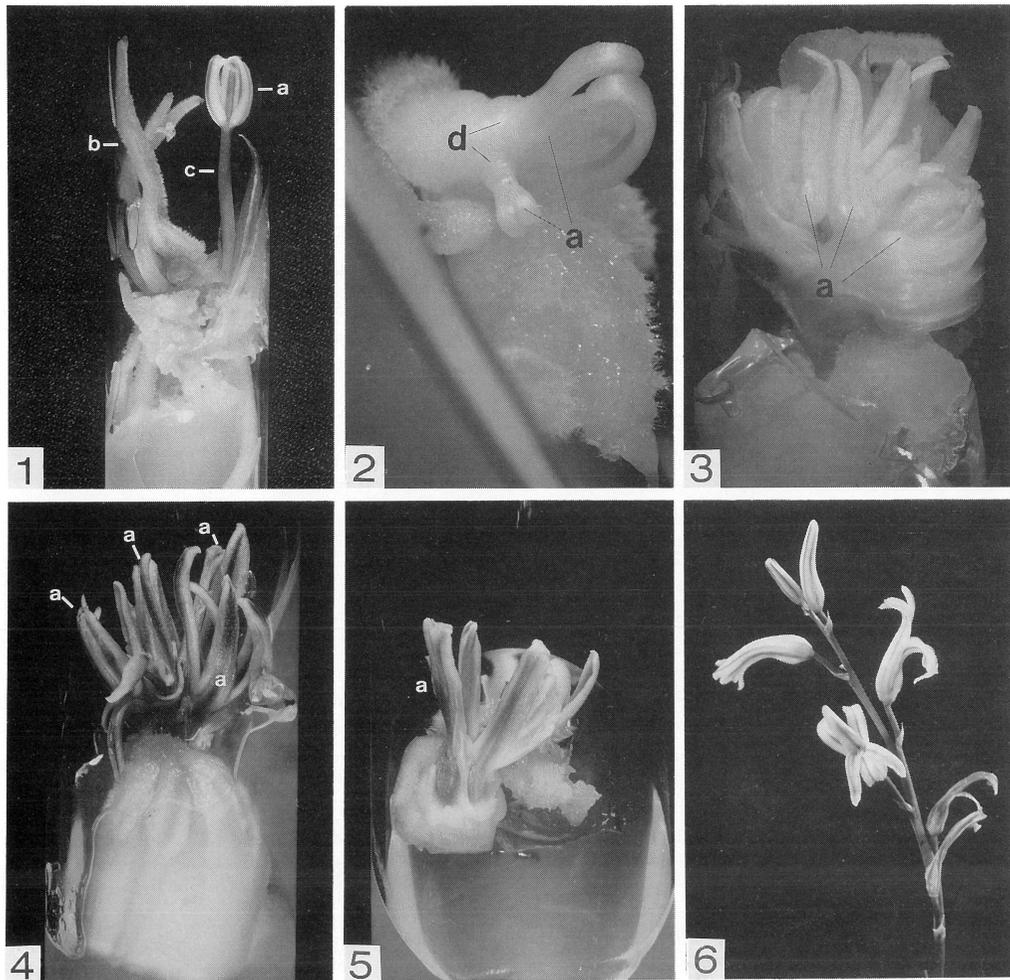


Fig. 4. Type of redifferentiated flowers. 1: Single type, a = adventitious flower bud, b = root and c = peduncle. 2 and 3: Compound type (with peduncle-like body), a = adventitious flower bud and d = peduncle-like body. 4 and 5: Aggregation type (without peduncle-like body), a = adventitious flower bud. 6: Normal flowers (Inflorescence of *H. planifolia* f. *alata*).

2花(3.6%), 8室と9室が各1花(1.8%)の順であった。

再分化した不定花芽の1子房当たりの胚珠数は、親植物の39個(13花の平均)に対し、1から90個までのものが認められ、再分化した花の雌ずいの子房の室数と同様に著しい変異を示した(Table 3)。1子房当たりの胚珠数が親植物と近似した値を示すものは、1子房当たり胚珠数31~40個の18子房(32.7%)と41~50個の4子房(7.3%)であった。

花粉稔性は、親植物の平均90.3(81.8~96.2)%に対し、両性花が平均42.2(1.9~90.4)%、雌性の単性花が平均88.7(69.2~96.4)%で、雌性の単性花が両性花よりも高い稔性を示した(Table 4)。また、1葯当たりの花粉数は親植物で平均3593(3230~4236)個であったのに対し、両性花で平均485(32~2350)個、単性花で121(39~216)個で、再分化した雄ずいに形成される花粉の数は親植物より少なく、さらに再分化した不定花芽は両性花より単性花が少なかった。雄ずい、雌ずいともかなりの形態異常が認められたが、生殖能力をある程度保って分化していると考えられ、試験管内受精の可能性が考えられた。

このように花被片由来のカルスから不定花芽の形成のタイプ、不定花芽の付き方、花梗の有無、花被片の数や形、雄ずいや雌ずい、子房の室、胚珠の数、花粉稔性など様々な形態変異が認められることは、シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.)で報告されているような花の形成過程に働く遺伝子(岡田・志村1991)などの何らかの要因があると考えられた。さらに、*Haworthia*の葉や茎の組織を培養しても、不定花芽の形成が認められないことから、培養に供した花被片組織は不定花芽分化能をもつ生殖成長相にある組織であり、その組織には不定花芽形成を促進するホルモン様物質、いわゆる花成物質フロリゲン(florigen)のような物質を保持しているものと考えられる。また、生殖器官の花被片、花糸、子房には、花の器官発生する働きが存在し、カルス化することにより不定花芽形成機構が未分化の方向になり、カルス上に不定芽の分化を経ずに直接不定花芽が形成されるものと考えられた。

Table 2. Number of locules induced flower

| No. of locules | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|----------------|-----|------|------|------|-----|-----|-----|-----|-----|
| No. of flowers | 5 | 6 | 25 | 7 | 5 | 2 | 3 | 1 | 1 |
| percentage (%) | 9.1 | 10.9 | 45.5 | 12.7 | 9.1 | 3.6 | 5.5 | 1.8 | 1.8 |

Table 3. Number of ovules per a induced flower

| No. of ovules | 1-10 | 11-20 | 21-30 | 31-40 | 41-50 | 51-60 | 61-70 | above 71-90 |
|----------------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------------|
| No. of flowers | 3 | 10 | 11 | 18 | 4 | 1 | 3 | 5 |
| percentage (%) | 5.5 | 18.2 | 22.0 | 32.7 | 7.3 | 1.8 | 5.5 | 9.1 |

Table 4. Pollen fertility of induced flowers

| sexuality | bisexual | | | | | | | | | | | | | | male | | | |
|------------------------------------|----------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Pollen fertility (%) | 1.9 | 3.9 | 10.9 | 17.9 | 20.2 | 20.4 | 22.7 | 35.4 | 67.1 | 76.8 | 79.8 | 81.1 | 82.8 | 90.4 | 69.2 | 94.1 | 91.4 | 96.4 |
| No. of pollen grains per an anther | 2 | 1378 | 1847 | 2350 | 1615 | 1234 | 1296 | 1612 | 1495 | 2019 | 585 | 1561 | 1863 | 764 | 39 | 34 | 216 | 196 |

Table 5. Influence of size and position of the perianth segments

| Explants size and position* | No. of explants | No. of calli explants formed calli | No. of calli which formed adventitious roots | No. of calli which formed adventitious shoots | No. of calli which formed adventitious flowers |
|-----------------------------|-----------------|------------------------------------|--|---|--|
| A-1 | 24 | 21 | 20 | 6 | 1 |
| A-2 | 24 | 21 | 21 | 8 | 3 |
| B-1 | 6 | 4 | 4 | 1 | 0 |
| B-2 | 6 | 4 | 4 | 1 | 1 |
| B-3 | 6 | 6 | 6 | 2 | 1 |
| C-1 | 6 | 6 | 6 | 0 | 0 |
| C-2 | 6 | 5 | 5 | 0 | 0 |
| C-3 | 6 | 6 | 6 | 0 | 0 |
| C-4 | 6 | 4 | 4 | 0 | 0 |

*see Fig. 5

d) 花被片を切断した切片の培養

不定花芽が最も高率に再分化した *H. arachnoidea* について、花被片を切断し、その花被片切片のサイズや位置の違いが不定花芽形成に及ぼす影響について調査した。材料の花被片の切断は、Fig. 5 に示したように二等分、三等分、四等分して供試した。培地は、MS+NAA2+KIN1 を用い、培養し、置床後60日目まで調査を行った (Table 5)。カルス形成、カルスからの不定花芽、不定芽、不定根の再分化は、花被片を切断し置床した場合とほぼ同様の過程を経過して認められた。

二、三、四等分した花被片切片のいずれの場合からも高率にカルスが得られた。最も多くカルスが形成された部位は、四等分した場合で21/24 (87.5%)、次いで二等分の41/48 (84.2%)、三

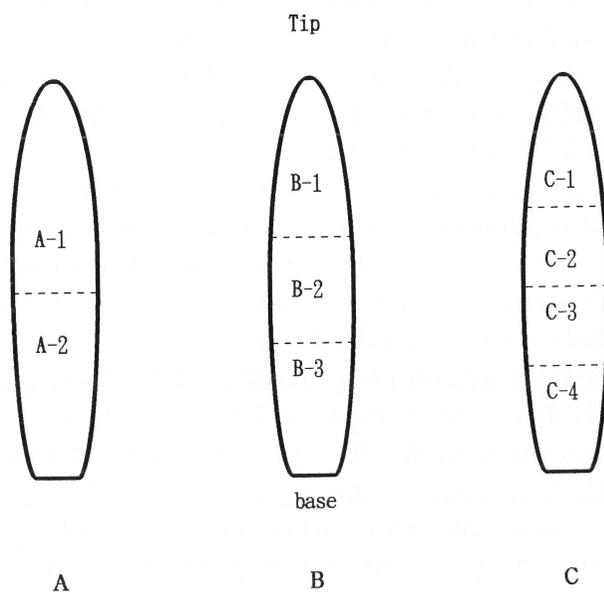


Fig. 5. Explants size and position of the perianth segments.

等分の14/18 (77.8%) の順であった。

不定根の再分化はいずれのカルスからも形成された。これに対し、不定芽および不定花芽が再分化したのは二および三等分した場合のみで、四等分した場合には認められなかった。

二等分した切片の先端に近い A-1 (Fig. 5 参照) と基部に近い A-2 切片の両方からカルスが得られ、不定花芽は両者に形成された。しかし、不定花芽を形成したカルス数は、基部に近い A-2 花被片切片から得られた21個のカルス中3個 (14.3%)、これに対し先端部に近い A-1 花被片切片から得られた21個のカルス中僅か1個 (4.8%) であった。三等分した場合は、花被片の最先端切片 B-1 から4個のカルスが得られたが不定花芽の形成は認められなかった。しかし、花被片中央部切片 B-2 および基部に近い B-3 切片では、両者共に得られた4個のカルス中1個 (25.0%) で不定花芽が形成された。

すなわち、二等分した場合の花被片先端部から形成されたカルスからは、不定花芽が再分化するが、三等分、四等分した場合はカルスは形成されるが、不定花芽は再分化しなかった。さらに、二等分、三等分したカルスから不定花芽が形成される場合は、先端部より基部に近い方が形成数が多い傾向を示した。また、花被片を二等分、三等分、四等分と細分するにしたがって切断花被片からのカルス形成率にほとんど変化は認められないが、不定花芽形成の比率は低下することが明らかとなった。切断しない1個の花被片であっても二あるいは三等分した場合には、先端部に近い切断片からの不定花芽形成率は中部と花托に近い部位からの不定花芽形成率よりもはるかに低いことが示された。このことは1個の花被片内でも先端部と花托部では内的要因に差があることを示唆するものであると考えられる。培養する花被片の大きさは、カルス化後の不定花芽形成に深く関連しているものと思えた。

2. 雄ずいの培養による不定花芽の形成

花被片を培養した場合と同じ *Haworthia* 属 8 種 1 品種 1 雑種の雄ずいを、MS+NAA1+KIN1, MS+NAA1+KIN2, MS+NAA2+KIN1 の 3 種類の培地で培養し、置床後60日目までのカルス、不定根、不定芽、不定花芽の形成について薬部と花糸に分けて調査し、結果を Table 6 に示した。カルスは雄ずい薬部あるいは花糸部から形成され、薬部から形成される場合は薬部全体が、花糸から形成される場合は花糸の基部の切り口部分がいずれも置床後3~5日目まで肥大し始め、7~10日目までカルスとして認められ、約21日目には不定根、不定芽、不定花芽の区別が解剖顕微鏡下で認められた。カルス形成、カルスからの不定花芽、不定芽、不定根の再分化は、花被片あるいは花被片を切断して置床した場合とほぼ同様であった。

カルスは、雄ずいの薬部と花糸の両方から形成されたが、種や培地の種類により著しい差異を示した。*H. angustifolia*, *H. arachnoidea*, *H. bilineata*, *H. retusa* の type C の 3 種は、全ての培地で薬部と花糸部の両者からカルスを形成した。その他、*H. altilinea*, *H. chloracantha*, *H. cymbiformis*, *H. fasciata*, *H. fasciata* f. *browniana*, *H. retusa* (type A, type B, type C) および *H. truncata* × *H. cuspidata* (F₁ 雑種) では、薬部からのカルスは形成されなかった。このうち、*H. cymbiformis* を MS+NAA1+KIN2 培地で培養した場合は薬部からも花糸部からもカルスは得られなかった。

カルスからの不定根の形成は、種や培地により差異が認められた。8 種 1 品種 1 雑種中、7 種 1 品種 1 雑種はいずれかの培地で不定根が得られた。しかしながら、*H. bilineata* のみはカルスは形成されたが、3 種類の全ての培地でも不定根を形成しなかった。花糸由来のカルスから最も多くの不定根を再分化した培地は MS+NAA1+KIN1 培地で、次いで MS+NAA1+KIN2 培地、MS+NAA2+KIN1 培地の順であった。MS+NAA2+KIN1 培地では、8 種 1 品種 1 雑種のうち 3 種、*H. angustifolia*, *H. arachnoidea* および *H. retusa* (type A と type B) (1 種は 2 type) のみで不定根が再分化された。

Table 6. Flower bud formation from the stamen cultured in *Haworthia* on the MS medium containing NAA and KIN

| Culture medium | MS + NAA 1 + KIN 1 | | | | | | MS + NAA 1 + KIN 2 | | | | | | MS + NAA 2 + KIN 1 | | | | | | | | |
|---|--------------------|----|----------------------------|---|---|---|--------------------|-----------------|---|----------------------------|---|----|--------------------|---|-----------------|---|----------------------------|---|---|---|---|
| | No. of explants | | No. of explants with calli | | R | S | F | No. of explants | | No. of explants with calli | | R | S | F | No. of explants | | No. of explants with calli | | R | S | F |
| <i>H. atilinea</i> | fi | 2 | 2 | 1 | 1 | 0 | 2 | 1 | 0 | 1 | 0 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | an | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>H. angustifolia</i> | fi | 8 | 8 | 3 | 1 | 0 | 9 | 8 | 1 | 0 | 0 | 8 | 8 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | an | 7 | 1 | 0 | 0 | 0 | 7 | 2 | 0 | 0 | 0 | 8 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>H. arachnoidea</i> | fi | 9 | 9 | 9 | 6 | 1 | 9 | 8 | 7 | 3 | 0 | 9 | 8 | 6 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | an | 9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>H. bilineata</i> | fi | 11 | 8 | 0 | 0 | 0 | 11 | 8 | 0 | 0 | 0 | 10 | 8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | an | 12 | 1 | 0 | 0 | 0 | 12 | 1 | 0 | 0 | 0 | 12 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>H. chloracantha</i> | fi | 3 | 1 | 0 | 1 | 0 | 3 | 2 | 2 | 2 | 0 | 3 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | an | 3 | 1 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>H. cymbiformis</i> | fi | 12 | 2 | 2 | 2 | 0 | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 12 | 9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | an | 12 | 2 | 0 | 0 | 0 | 12 | 0 | 0 | 0 | 0 | 9 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>H. fasciata</i> | fi | 7 | 3 | 1 | 0 | 0 | 7 | 1 | 0 | 0 | 0 | 7 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | an | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>H. fasciata</i> <i>f. browniana</i> | fi | 9 | 3 | 2 | 0 | 0 | 8 | 2 | 2 | 0 | 0 | 9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | an | 9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>H. retusa</i> (type A) | fi | 9 | 3 | 2 | 1 | 0 | 9 | 3 | 1 | 1 | 0 | 9 | 3 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | an | 8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>H. retusa</i> (type B) | fi | 3 | 2 | 0 | 0 | 2 | 3 | 3 | 0 | 0 | 0 | 3 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | an | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>H. retusa</i> (type C) | fi | 9 | 9 | 3 | 0 | 0 | 9 | 8 | 1 | 0 | 0 | 9 | 8 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | an | 9 | 4 | 1 | 0 | 0 | 9 | 3 | 0 | 0 | 0 | 9 | 6 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>H. truncata</i> × <i>H. cuspidata</i> | fi | 9 | 8 | 1 | 0 | 0 | 9 | 8 | 0 | 1 | 0 | 9 | 8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | an | 9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

fi: filament, an: anther.

MS, NAA, KIN, R, S, F, see Table 1.

不定芽は、雄ずいの花糸由来カルスのみに形成された。3種類の全ての培地で花糸由来のカルスから不定芽の形成が認められたのは、*H. arachnoidea* と *H. retusa* (type A) の2種のみであった。最も多くの花糸由来カルスから不定芽を再分化したのは *H. chloracantha* であった。置床数は少なかつたが MS+NAA1+KIN1培地、MS+NAA1+KIN2培地で、両者ともに1/1、2/2で100%であった。次いで *H. arachnoidea* を MS+NAA1+KIN1培地で培養した場合の6/9 (66.7%) であった。なお、不定芽を再分化した種数が最も多かつた培地は MS+NAA1+KIN1培地の5種、次

いで MS+NAA1+KIN2培地の4種1雑種, MS+NAA2+KIN1培地の3種の順であった。

不定花芽の形成例は, MS+NAA1+KIN1培地で培養した *H. arachnoidea* と MS+NAA1+KIN2培地で培養した *H. cymbiformis* のみであった。いずれも *H. arachnoidea* の花被片から不定花芽が再分化した場合と酷似し, 花糸の切口部が肥大してカルス化が起り, そのカルスの一部に小突起が形成され, やがて小突起が成長し, 不定花芽が再分化することが認められた。雄ずいの花糸からの不定花芽形成は稀で, 他の植物での報告は皆無と言える。雄ずいは花被片より生殖器官としての発生段階がより進んでいながら, 花被片と同じようにフロリゲンが存在しているのであろうか, あるいはカルス化することにより花器官を発生する遺伝機構が働いたのであるか, 興味深い点である。

3. 雄ずいの培養による不定花芽の形成

花被片, 雄ずいを培養した場合と同じ8種1品種1雑種の雌ずいを, MS+NAA1+KIN1, MS+NAA1+KIN2およびMS+NAA2+KIN1の3種類の培地で培養し, 置床後60日目までのカルス, 不定根, 不定芽, 不定花芽の形成について調査し, 結果をTable 7に示した。置床後3~5

Table 7. Flower bud formation from the pistil cultured on the MS medium containing NAA and KIN

| Culture medium | MS + NAA 1 + KIN 1 | | | | | MS + NAA 1 + KIN 2 | | | | | MS + NAA 2 + KIN 1 | | | | |
|---|--------------------|----------------------------|---|---|---|--------------------|----------------------------|---|---|---|--------------------|----------------------------|---|---|---|
| | No. of explants | No. of explants with calli | R | S | F | No. of explants | No. of explants with calli | R | S | F | No. of explants | No. of explants with calli | R | S | F |
| <i>H. altilinea</i> | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | — | — | — | — | — |
| <i>H. angustifolia</i> | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 | 0 | 1 | 0 |
| <i>H. arachnoidea</i> | 3 | 3 | 2 | 3 | 0 | 3 | 3 | 0 | 0 | 1 | 3 | 3 | 1 | 0 | 1 |
| <i>H. bilineata</i> | 4 | 2 | 1 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| <i>H. chloracantha</i> | 4 | 4 | 0 | 1 | 0 | 4 | 2 | 0 | 1 | 0 | 3 | 3 | 0 | 1 | 0 |
| <i>H. cymbiformis</i> | 4 | 4 | 0 | 1 | 0 | 4 | 2 | 0 | 1 | 0 | 3 | 3 | 0 | 1 | 0 |
| <i>H. fasciata</i> | 3 | 2 | 1 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>H. fasciata</i> f. <i>browniana</i> | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 | 2 | 0 | 0 |
| <i>H. retusa</i> (type A) | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>H. retusa</i> (type B) | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 4 | 0 | 0 | 2 |
| <i>H. retusa</i> (type C) | 3 | 2 | 0 | 1 | 0 | 3 | 3 | 0 | 0 | 0 | 3 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| <i>H. truncata</i> × <i>H. cuspidata</i> | 3 | 2 | 0 | 1 | 0 | 3 | 3 | 0 | 0 | 0 | 3 | 3 | 0 | 0 | 0 |

KS, NAA, KIN, R, S, F, see Table 1.

日目で雌ずい全体が肥大し始め、7～10日目でカルスとして認められ、約21日目には不定根、不定芽、不定花芽の区別が解剖顕微鏡下で認められた。

いずれも置床数は少ないが、*H. angustifolia*, *H. arachnoidea*, *H. chloracantha*, *H. cymbiformis*, *H. retusa* (type C) および *H. truncata* × *H. cuspidata* (F₁雑種) の5種1雑種は全ての培地でカルスが形成された。雌ずいが肥大しただけでカルスを形成しなかったのは *H. retusa* の type A のみであった。

不定根の形成は、MS+NAA1+KIN1培地で培養して得られた *H. arachnoidea*, *H. bilineata*, *H. fasciata* の3種の雌ずい由来カルスと、MS+NAA2+KIN1培地で培養し得られた *H. arachnoidea* と *H. fasciata* の2種であった。

カルスからの不定芽の形成は、種や培地により差異が認められた。雌ずい由来のカルスから不定芽の再分化が認められたのは、8種1品種1雑種中、4種1雑種であった (Table 7)。このうち、いずれも1例ずつにすぎないが、*H. chloracantha* と *H. cymbiformis* では、3種類の全ての培地で不定芽の再分化が認められた。他は、MS+NAA1+KIN1培地で培養した *H. arachnoidea* と *H. retusa* (type C) および *H. truncata* × *H. cuspidata* (F₁雑種) のみであった。最も多くの種で雌ずい由来のカルスから不定芽が再分化したのはMS+NAA1+KIN1培地で、次いでMS+NAA1+KIN2培地、MS+NAA2+KIN1培地の順であった。

不定花芽の形成が観察された例は、MS+NAA1+KIN2とMS+NAA2+KIN1の培地で培養した *H. arachnoidea* とMS+NAA2+KIN1培地で培養した *H. retusa* (type C) の2例のみであった。いずれも *H. arachnoidea* の花被片から不定花芽が再分化された場合と酷似し、雌ずいが肥大してカルス化が起り、そのカルスの一部に小突起が形成され、やがて生長し、不定花芽が再分化することが認められた。雌ずいは雄ずいより生殖器官の発生段階が進んでいながら、雄ずいと同じようにカルス化が起り、不定花芽を形成したことは発生段階が進んでも不定花芽を分化する能力があると考えられ、興味深い問題であった。

4. 花托、苞、小花梗の培養による花芽の形成

H. altilinea, *H. angustifolia*, *H. arachnoidea*, *H. bilineata*, *H. chloracantha*, *H. cymbiformis*, *H. fasciata* f. *browniana*, *H. retusa* (type A, type B および type C) の5種1品種の花托あるいは苞、小花梗の節間片の何れかを、MS+NAA1+KIN1, MS+NAA1+KIN2 および MS+NAA2+KIN1 の3種類の培地で培養し、置床後60日目までのカルス、不定根、不定芽、不定花芽の形成について調査した (Table 8)。

花托のカルスは雌ずい全体が置床後3～5日目で肥大し始め、7～10日目でカルスとして認められ、約21日目には不定根、不定芽、不定花芽の区別が解剖顕微鏡下で認められた。

花托、苞あるいは小花梗の節間片の3種類の部位について培養を行ったのは、*H. arachnoidea* と *H. cymbiformis* であった。*H. arachnoidea* では、3種類の全ての培地で、カルスの形成が認められた。これに対し、*H. cymbiformis* は、MS+NAA1+KIN1培地で花托のみからカルスが形成された。苞のみを培養した *H. angustifolia* と *H. retusa* (type B と C) では、3種類の全ての培地でカルスを形成した。なお、*H. fasciata* f. *browniana* と *H. retusa* (type A) の2種では、3種類の培地でいずれの部位を培養しても、カルスの形成、カルスからの不定根、不定芽ならびに不定花芽の形成が認められなかった。

不定根を再分化したのは、3種類の全ての培地で *H. arachnoidea* の苞、花托ならびに小花梗の節間片を培養し得られたカルスからのみで、他はいずれも認められなかった。

不定芽を再分化したのは、*H. arachnoidea* と *H. cymbiformis* の2種であった。*H. cymbiformis* では、3種類の培地の全てで花托由来のカルスから得られた。供試数は少なかったが、MS+NAA1

Table 8. Flower bud formation from the pedicel, bract, and receptacle cultured on the MS medium containing NAA and KIN

| Culture medium | MS + NAA 1 + KIN 1 | | | | | MS + NAA 1 + KIN 2 | | | | | MS + NAA 2 + KIN 1 | | | | |
|---|--------------------|----------------------------|---|---|---|--------------------|----------------------------|---|---|---|--------------------|----------------------------|---|---|---|
| | No. of explants | No. of explants with calli | R | S | F | No. of explants | No. of explants with calli | R | S | F | No. of explants | No. of explants with calli | R | S | F |
| <i>H. altilinea</i> | pe | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>H. angustifolia</i> | br | 3 | 1 | 0 | 0 | 0 | 3 | 2 | 0 | 0 | 0 | 3 | 1 | 0 | 0 |
| <i>H. arachnoidea</i> | br | 3 | 2 | 2 | 1 | 0 | 3 | 1 | 1 | 0 | 0 | 3 | 3 | 2 | 0 |
| | pe | 3 | 3 | 2 | 2 | 0 | 3 | 3 | 1 | 0 | 0 | 3 | 3 | 2 | 0 |
| | re | 3 | 3 | 3 | 2 | 0 | 3 | 2 | 0 | 1 | 0 | 3 | 3 | 0 | 0 |
| <i>H. cymbiformis</i> | br | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 1 | 0 | 0 | 0 | 4 | 3 | 0 | 1 |
| | pe | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 2 | 0 | 0 | 0 | 4 | 2 | 0 | 1 |
| | re | 3 | 2 | 0 | 1 | 0 | 2 | 1 | 0 | 1 | 0 | 4 | 2 | 0 | 1 |
| <i>H. fasciata</i> f. <i>browniana</i> | br | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| <i>H. retusa</i> (type A) | br | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| <i>H. retusa</i> (type B) | br | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| <i>H. retusa</i> (type C) | br | 2 | 2 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 |

br: bract, pe: pedicel, re: receptacle.

MS, NAA, KIN, R, S, F, see Table 1.

+KIN1で1/2, MS+NAA1+KIN2で1/1およびMS+NAA2+KIN1で1/2ずつであった。これに対し, *H. arachnoidea* では, MS+NAA1+KIN1培地で培養して得られた苞, 花托ならびに小花梗の節間片由来のカルスより不定芽を再分化した。苞で1/2, 花托で2/3, 小花梗で2/3であった。

以上, 本研究では, *Haworthia* 属 8 種 2 品種 1 雑種の花被片, 雄ずい, 雌ずい, 苞, 花托あるいは小花梗等を培養し, 5 種 2 品種 1 雑種, *H. altilinea*, *H. angustifolia*, *H. arachnoidea*, *H. cymbiformis*, *H. planifolia* f. *alata*, *H. retusa* (type A, type B, type C) および *H. truncata* × *H. cuspidata* (F₁ 雑種), の花被片から不定花芽の形成を認めることができた。このうち, 3 種 1 品種 1 雑種, *H. altilinea*, *H. angustifolia*, *H. planifolia* f. *alata*, *H. retusa* (type A, type B, type C) および *H. truncata* × *H. cuspidata* (F₁ 雑種), は今回が初めての報告になる。*Haworthia* 属植物における花被片以外の部位からカルスを経ての不定花芽形成の報告は皆無であったが, *H. arachnoidea* と *H. cymbiformis* の 2 種では例は少ないが花糸から, また *H. arachnoidea* の雌ずいからも不定花芽の形成が認められた。なお, 花托, 苞および小花梗の節間からの不定花芽形成は, 今回用いた *Haworthia* 属植物では Majumder (1970c) によっては認められなかった。不定花芽の分化は培養する種, あるいは花器の部位の違い, さらに外植片の位置や大きさによっても違いが認められた。不定花芽の形成過程は種によっては, 不定芽の分化を経て不定花芽を分化する場合もごく稀に認められたが, 殆どは不定芽の分

化を経ずに直接不定花芽が形成された。すなわち、カルスにより栄養生長の不定芽の段階を経ずに直接生殖生長である不定花芽形成過程に入る場合が大多数であった。しかしながら、不定花芽の形態はタバコ品種ウiskonシン38 (Aghion-Prat 1965a, 1965b), クレピス (Jayakar 1970), キクニガナ (Paulet and Nitsch 1964; Pierik 1966 b), ルナリア (Pierik 1966a), アカマツリ (Nitsch and Nitsch 1967a, 1967b), ベゴニア (Ringe and Nitsch 1968), シソ (Tanimoto and Harada 1980), トレニア (Tanimoto and Harada 1979) などを培養して不定花芽を形成させた場合と異なり、様々な形態異常を起こしていた。

すなわち、*Haworthia* 属では再分化した不定花芽の咲き方、花梗の有無、花被片の数や形、雄ずいや雌ずいの数あるいは形、子房の室数、胚珠の数、花粉稔性などに様々な形態変異が認められ、シロイヌナズナ、キンギョソウなどのホメオティック突然変異体 (岡田・志村1991) に類似した変異現象と考えられた。さらに、本実験では、フロリゲンの存在ばかりか、培養条件下でカルス化を経て不定花芽の初期器官分化過程の段階で様々な異常を起こし、その結果として変異に富んだ不定花芽が生じると考えられた。

謝 辞

本実験を遂行するに当たり、終始貴重なご助言を賜った東京農業大学名誉教授近藤典生博士、千葉短期大学校故角田昌一氏、ならびに原稿の御校閲を賜った茨城大学農学部助教授丸橋亘博士に深く感謝いたします。また、実験に協力して下さった東京農業大学農学部農学学科育種学研究室の諸氏にも感謝の意を表します。

Summary

Various flower organ parts of *Haworthia* (Liliaceae) were cultured. Adventitious and new flower buds were formed on calli which were derived from explants. Flower bud formation was affected by the size and variety of explants.

Eight species, two form and one hybrid, i.e. *H. altilinea*, *H. angustifolia*, *H. arachnoidea*, *H. bilineata*, *H. chloracantha*, *H. cymbiformis*, *H. fasciata*, *H. fasciata* f. *browniana*, *H. planifolia* f. *alata*, *H. retusa* (type A, type B, type C) and *H. truncata* × *H. cuspidata* (F₁), were used as the materials. Their flower organ parts were cultured on MS media containing NAA and Kinetin. Adventitious flower buds were directly formed on the calli induced without any shoots in five species and one hybrid (Table 1).

Perianth segments showed the most frequently adventitious flower bud formation. Stamens (filaments) and pistils also showed the adventitious flower bud formation, though their regeneration frequency was low. When pedicels, bracts and receptacles were used as the explants, flower bud formation was not observed.

Adventitious flower buds were usually regenerated from calli which were formed within two to three weeks after initiation of culture. After four or five weeks cultivation, other flower buds were regenerated on other areas of explants (Fig. 1). Shepe of flower represented many various morphoses in flowers with or without peduncle, number of perianths, stemens, pistils and capsules, or pollen fertility. Some flowers were formed from regenerated roots, shoots and inocurated perianth itself (Fig. 2). The sexualities of the flowers were bisexual, male, female or asexual (Fig. 3).

When the perianths were divided into two, three or four equal peaces before cultivation, flower bud

formation was not observed in the quarter perianth segments. In the half and trisection perianth segments, the basal portion of the perianth was better than the tip one in the regeneration.

引用文献

- Aghion-Prat, D., 1965a. Neof ormation de fleurs in vitro chez *Nicotiana tabacum* L. *Physiol. Veg.* **3**: 229–303.
- , 1965b. Floral meristem-organizing gradient in tobacco stem. *Nature* **207**: 1211.
- Bayer, M.B., 1976. *Haworthia Handbook*. National Botanic Garden of South Africa Kirstenbosch, Cape.
- Jyakar, M., 1970. In vitro flowering of *Crepis capillaris*. *Phytomorphology*. **20**: 410–412.
- Kaul, K. and P.S. Saboharwar, 1970. In vitro induction of vegetative buds on inflorescence segment of *Haworthia*. *Separatum Experimentia*. **26**: 433–434.
- Konishi, T., M. Hayashi and M. Ikami, 1982. Induction of flower buds in tissue culture of perianth of *Haworthia arachnoidea* and *H. cymbiformis*. *Proc. 5th Intl. Cong. Plant Tissue & Cell Culture*. 145–146.
- Majumder, S.K., 1970a. Production of plantlets from the ovary wall of *Haworthia turgida* var. *pallidifolia*. *Planta*. **90**: 212–214.
- , 1970b. Culture of *Haworthia* inflorescence in vitro. *J. South Afr. Bot.* **36**: 63–68.
- , 1970c. In vitro culture of flower buds of *Haworthia* and *Astroloba*. *Phyton* **27**: 31–34.
- 丸茂晋吾・鳥羽 眞, 1992. 開花・結実の分子機構. 秀潤社・東京. 18–41.
- Murashige, T. and F. Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia of Plantarum* **15**: 473–497.
- Nitsch, C. and J.P. Nitsch, 1967a. The induction of flowering in vitro on stem segment of *Plumbago indica* L. I. The production of vegetative buds. *Planta* **72**: 355–370.
- and ———, 1967b. The induction of flowering in vitro in stem segments of *Plumbago indica* L. II. The production of reproductive buds. *Planta* **72**: 371–384.
- 岡田清孝・志村令郎, 1991. 植物全能性の分子生物学. 朝倉書店・東京. 43–56.
- Paulet, P. and J.P. Nitsch, 1964. Flower formation on *Chichorium intybus* root tissues cultured in vitro. *Ann. Physiol. Veg.* **6**: 333–345.
- Pierik, R.L.M., 1966a. The induction and initiation of flower buds in vitro tissues of *Lunaria annua* L. *Naturwissenschaften* **53**: 45.
- , 1966b. The induction and initiation of flower buds in vitro in root tissues of *Chichorium intybus* L. *Naturwissenschaften* **53**: 387.
- Ringe, E. and J.P. Nitsch, 1968. Conditions leading to flower formation on excised *Begonia* fragments cultured in vitro. *Plant Cell. Physiol.* **9**: 639–652.
- Tanimoto, S. and H. Harada, 1979. Influences of environment and physiological conditions on floral bud segments formation on *Torenia* stem segments cultured in vitro. *Z. Pflanzenphysiol* **95**: 33–41.
- and ———, 1980. Hormonal control of morphogenesis in leaf explants of *Perilla frutescens* Britton var. *crispa* Decaisne f. *viride-crispa* Makino. *Ann. Bot.* **45**: 321–327.
- 米田好文, 1992. 開花・結実の分子機構. 秀潤社・東京. 49–61.
- van Staden, J. and C.W.S. Dickens, 1991. In vitro induction of flowering and its relevance to micropropagation. *Biotech. Agric. Forest.* **17**: 84–115.