

## キュウリの胎座切片培養による接合子と初期球状胚からの植物誘導

藤下典之・斎藤清子

大阪府立大学農学部  
(〒591 堺市百舌鳥梅町 4-804)

(1989年11月6日受付)

(1989年12月20日受理)

胚の早期退化を回避する培養系確立を目的に、キュウリの交雑和合な品種間で交配し、その受精直後の胚からの植物誘導を試みた。受粉後2日(接合子)から6日(初期球状胚)の子房を厚さ約1mmの輪切りにして、子房壁を除き、胚珠および胎座部分を含む中央部を置床した。この培養方法を胎座切片培養(placental region disk culture)と呼ぶことにした。培地はMSを用い、sucrose 10%と寒天0.8%のみを添加した。置床後20日頃から、乳白色の胚が、カルス形成の少ない培地接触面におもに出現した。これらの胚を、1/2 MSにsucrose 2%と寒天0.8%を添加した培地に移植すると2~3日で緑色を帯び、shoot・根を分化してplantletに発育した。誘導できた23個体のうち、成熟果の得られた18個体すべてに花粉親の優性形質が現れ、胚形成の組織学的観察結果とも合せて、誘導植物が受精卵由来であることが確かめられた。終始30~60%の低花粉稔性を示した誘導植物は、1個体が4倍体( $2n=28$ ), 3個体が2倍体( $2n=14$ )であった。本方法は、ごく小さな胚を傷つけることなく、一度の簡単な操作で多数置床することができる。また培地処方も簡便であり、*Cucumis*属植物における受精直後の胚からの植物誘導に有効な手法となろう。

### 1. 緒言

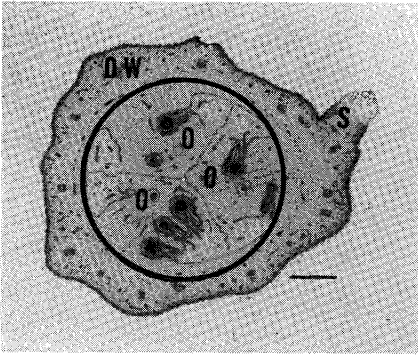
野生植物の持つ耐病性、耐虫性、耐ストレス性などの形質を栽培植物に取り入れることを目的とした種間・属間交雑が多く、植物で試みられているが、発芽力のある雑種子の得られることは少ない。その原因の一つに、受精後の胚の発育停止がある。このような*in vivo*では退化してしまう胚を培養して、雑種植物を誘導しようとする努力がなされている。その方法は様々であるが、最近のものではタバコ<sup>1,2)</sup>、トマト<sup>3)</sup>、ワタ<sup>4)</sup>での胚珠培養、アブラナ<sup>5,6)</sup>での子房培養、ユリ<sup>7)</sup>での子房切片培養などがあげられよう。ウリ科では、カボチャ<sup>8)</sup>や*Cucumis*属<sup>9)</sup>の種間交配で胚培養により雑種が育成されている。本報では、ウリ科植物の未熟胚からの植物誘導を目的に、その培養系確立の第一段階として、キュウリで交雑和合な品種間交配を行い、その受精直後の子房を用いて胎座切片培養を試みた。

### 2. 材料および方法

材料には、誘導植物の由来する組織を確かめやすいように、識別が容易で単一遺伝子で決定される、果実表面のイボの色と性表現型の異なる品種を組合せた。種子親には白イボで雌雄同株型の“台湾毛馬”と白イボで両性

花雄花同株型の“Apple Sherbet”のF<sub>1</sub>(白イボ、雌雄同株型)を、花粉親には黒イボで雌雄同株型の“加賀節成”を用いた。黒イボは白イボに、雌雄同株型は両性花雄花同株型に対して優性である。誘導植物が黒イボならば受精卵由来であることを示す。種子親の雄花は開花前に除去し、交配は開花当日の午前中に行った。なお花粉親である“加賀節成”は、発育が進むと雌花が節成りとなり雄花がなくなるので、第5葉が展開した頃からAgNO<sub>3</sub> 125 ppmを10日おきに4回、葉面散布して雄花形成を促した。

培養には受粉後2, 3, 4, 6日の子房を用い、アルコールで数秒間、さらし粉濾過液で15~20分間表面殺菌した後、花痕側から順に、厚さ約1mmの輪切りにした。次に余分な子房壁を取り除くために、胚珠を含む胎座部分をコルクローラーで繰り抜き置床した(Fig. 1)。このような培養方法を筆者らは、胎座切片培養(placental region disk culture)と呼ぶことにした。初代培地は、予備実験での基本培地の種類、糖濃度、寒天濃度の検討結果をふまえ、MSを基本にsucrose 10%、寒天0.8%を加え、生長調節物質無添加とした。pH 5.7に調整し、100 mlの三角フラスコに40 mlずつ分注した



**Fig. 1.** Transverse section of cucumber ovary at anthesis. Inside of the circle indicated in the section is placental region inoculated. Bar=1 mm. ow: ovary wall, s: spine, o: ovule.

後、120°C、1.2気圧のオートクレーブで15分間滅菌して用いた。培養は、25°C、3,000~4,000 lux、12時間照明の培養器内で行った。通常より短い照明時間にしたのは、長日条件による雌花形成の抑制を考慮したためである。

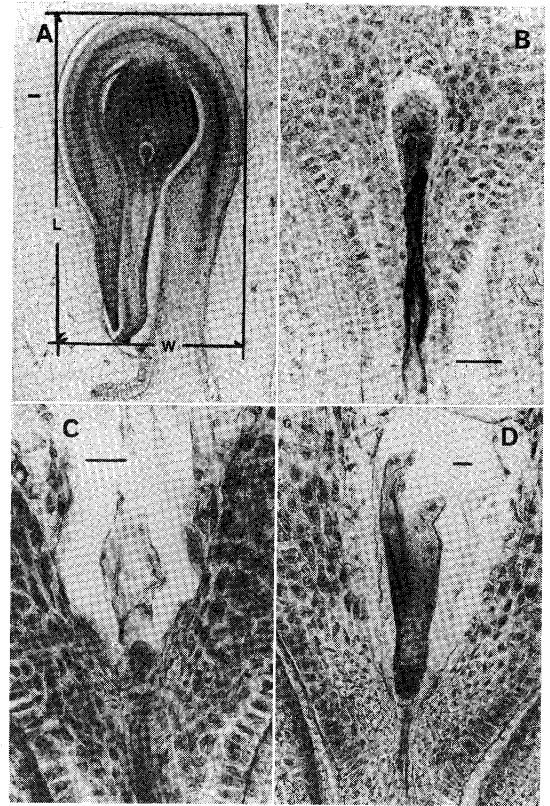
置床後、切片の表面または培地接触面で发育した乳白色の胚は、plantlet誘導培地に移植した。誘導培地は1/2 MSにsucrose 2%、寒天 0.8%を加え、生長調節物質は無添加とし、3×10 cmのガラス管に分注して用いた。移植後shoot・根を分化したplantletは、パーミキュライト入りのプラスチック製ビン内で、1,000倍のハイポネックス溶液を与えて馴化し、葉数が10枚、草丈が10 cm程度に发育した時、温室のれき耕ベッドに定植した。

誘導植物の果実のイボの色、性表現型と花粉稔性を調査した。花粉稔性は、開花当日の花粉をアセトカーミン染色し、よく染まる充実花粉、不均一に染まる充実不完全花粉、まったく染まらない空虚花粉に分けて数え、 $[(\text{充実花粉数}/\text{検鏡総花粉数}) \times 100 (\%)]$ で算出した。花粉稔性の低かった個体は染色体数を花粉母細胞と根端細胞について、それぞれアセトカーミンとアセトオルセイン染色による押しつぶし法で観察した。置床時における胚・胚珠の发育を確かめるために、開花当日と受粉後2, 4, 6, 8日の子房を、パラフィン切片法で厚さ20 μmの連続切片にし、デラフィールド・ハマトキシリンで染色して観察した。

### 3. 結果

#### (1) 植物体上での胚の发育

培養に供した胚の发育段階を組織学的に観察した結果をFig. 2とTable 1に示す。受粉後2日の胚珠・



**Fig. 2.** Ovule, embryo and endsperm at 0, 2, 6 and 8 days after pollination (DAP) *in vivo*. The micropylar end of ovules is located at the bottom in each plate. Bar=20 μm. A: Pre-fertilized ovule at anthesis. Length and width of ovule measured were shown as L and W, respectively (Table 1). B: 2 DAP, Fertilized egg cell and pollen tube. C: 6 DAP, Early-globular embryo. D: 8 DAP, Globular embryo and endsperm with many free nuclei.

胚のうの大きさは、開花当日と差はなかったが、花粉管が胚のう内へ侵入しており、接合子期と推測された。受粉後4日の胚珠の長さは、開花当日の2倍近くになり、胚のう内には2~4細胞の胚と数個の胚乳遊離核が確認できた。受粉後6日の胚珠の長さは、開花当日の約3倍となり、胚のう内には初期球状胚と胚乳遊離核が認められた。受粉後8日には、胚珠の長さと同幅は開花当日の約4倍となり、胚のう内には球状胚と細胞膜未形成の多数の胚乳核が認められた。胚のう内に侵入した花粉管は、受粉後8日にもまだその痕跡が認められた。

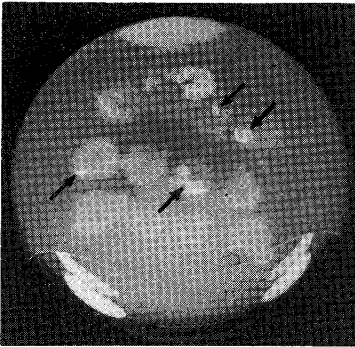
#### (2) 培養切片での胚の发育

**Table 1.** Development of ovary, ovule, embryo sac and embryo on pollinated flower *in vivo*.

DAP	Ovary			Ovule <sup>a</sup>		Embryo sac		Embryo		Confer.
	L (cm)	D (cm)	W (g)	L ( $\mu$ m)	W ( $\mu$ m)	L ( $\mu$ m)	W ( $\mu$ m)	D ( $\mu$ m)	Stage	
0	2.9	0.7	0.9	651	426	60	27	—	egg cell	Fig. 2 A
2	4.3	0.9	2.3	651	415	59	27	—	zygote	Fig. 2 B
4	6.2	1.2	5.8	1,220	595	204	60	15.0	2-4 celled	—
6	11.2	2.1	34.8	1,800	865	350	112	15.3	early-globular	Fig. 2 C
8	13.3	2.6	67.5	2,817	1,563	—	—	34.3	globular	Fig. 2 D

DAP: Days after pollination. L: Length, D: Diameter, W: Weight.

<sup>a</sup> Measured regions are shown in Fig. 2. Size of mature seed: length 10.1 mm, width 4.1 mm. Size of mature cotyledon: length 9.1 mm, width 3.8 mm.

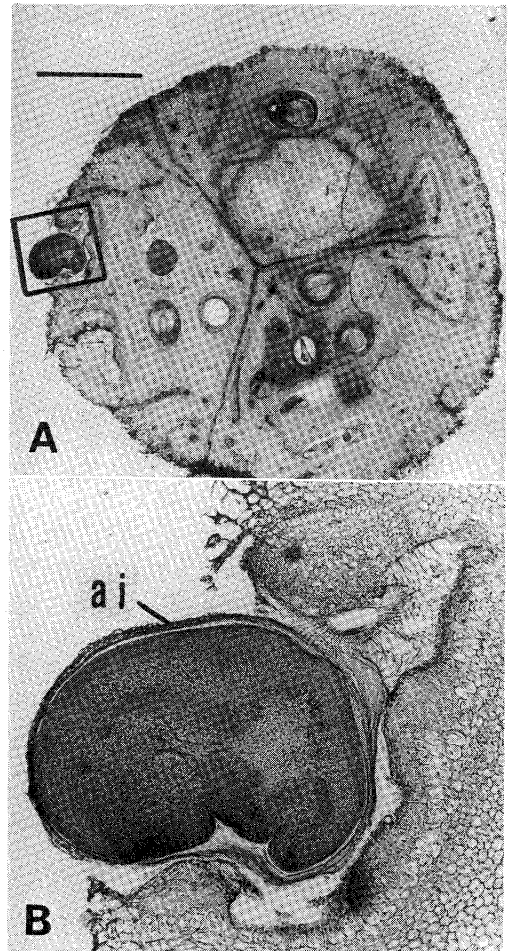


**Fig. 3.** Ivory-white embryos (arrows) emerged at the bottom side of disk, touching the agar medium. Photograph taken at 56 days after inoculation. These embryos were transferred on plantlet-inducing medium.

置床後 20 日頃に、培養切片の培地接触面に乳白色の胚が萌芽してくるような状態で出現した (Fig. 3, 4). 組織学的観察から、これらの胚は受精卵由来であると推測できた (続報で詳述). 切片の表面はカルス化し、表面付近の胚珠自体もカルス化していた (Fig. 5).

### (3) plantlet 誘導培地に移植した胚の発育

培養切片上で 2~5 mm に発育した胚 (置床後 36~74 日) は plantlet 誘導培地に移植した. 受粉後 2 日に置床した切片からは 6, 3 日の切片からは 10, 4 日の切片からは 73, 6 日の切片からは 3 の胚が移植できた (Table 2). 乳白色の胚は、移植後 2~3 日で緑色を帯び始めたが、いずれも種子の正常な発育過程を経ずに、カルス、葉状組織、根、葉そして shoot を分化した (Fig. 6, Table 2). 葉状組織は、緑色でサラダナの葉が肥厚したような形態を示した. カルスや葉状組織には、その後 shoot・根を分化して、plantlet に発育したのもあった. ガラス管内で開花した雄花は、花卉の長さ 0.2~0.7 cm, がく筒の径 0.2 cm と小さく、やく



**Fig. 4.** Transverse section of 20-day-old placental region disk inoculated 4 DAP. B: Magnified picture of enblocked portion in A to show irregular-shaped embryo and abortive integument (ai). Bar=2 mm.

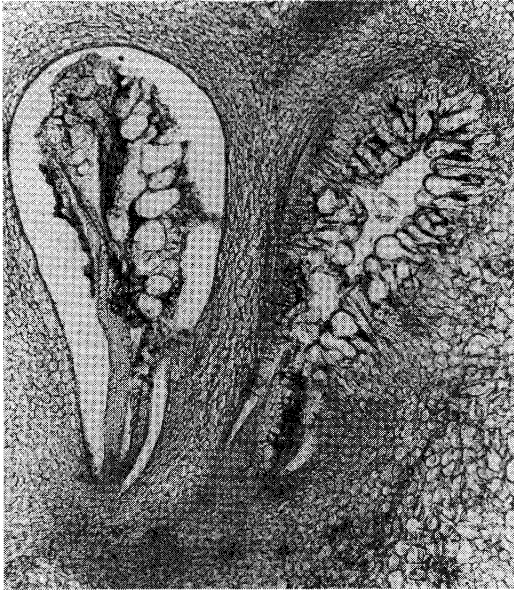


Fig. 5. Callusing ovules on surface of placental region disk. Photograph taken at 15 days after inoculation.

は退化していたり、存在してもやく胞内が空か空虚花粉のみ観察できる状態であった。

#### (4) 馴化中の plantlet の発育

ガラス管内で、shoot と根をともに分化した plantlet は、置床後 99~209 日に馴化を経て定植可能な苗に発育した。しかし、根のみ分化したもの、葉のみ分化したものをその状態で馴化に移しても、ほとんど生育せず、褐変、枯死した。また生長点が花蕾に変る個体があり、再び生長点を形成して生育を続けるものもあったが、多

くは間もなく枯死した。

#### (5) 定植後の誘導植物の生育

置床後 156~493 日に 23 の幼植物を温室に定植した。その数は、受粉後 2 日の切片から 2 個体、3 日から 1 個体、4 日から 18 個体、6 日から 2 個体であった (Table 2)。定植後、枯死したものが 5 個体あったが、それ以外は外観的には正常に生育した。植物体がごく小さい時期に、不釣り合いな正常な大きさの雄花の咲いたものもあった。やくは個体によって様々で、初期の雄花のやくには、花粉をまったく含まないものも観察された。

#### (6) 誘導植物の特徴

##### 1) 果実のイボの色・性表現型

置床後 185~525 日に、第一雌花が開花した。誘導植物の果実(子房)のイボの色は、成熟果の収穫できた 18 個体で、すべて花粉親の優性形質の黒イボが発現しており、受精卵由来であることが明らかとなった。第一雌花の子房が白イボに見えた 2 個体は、いずれも雌花開花直後に枯死し、最終的に果実のイボの色は確認できなかった。

誘導植物の性表現型は、調査前に枯死した 4 個体を除き、すべて雌雄同株型を示した。その中には、主枝に花芽だけを着け、側枝をまったく出さないものも 1 個体あった。

##### 2) 花粉稔性

置床後 145~506 日に、第一雄花が開花した。定植直後に枯死し、雄花が開花しなかった 1 個体の他は、馴化中に開花したものが 9 個体、温室定植後に開花したものが 13 個体あった。花粉稔性調査の結果、①終始、稔性が 80% 以上の個体、②初期の稔性は 60% 以下と低か

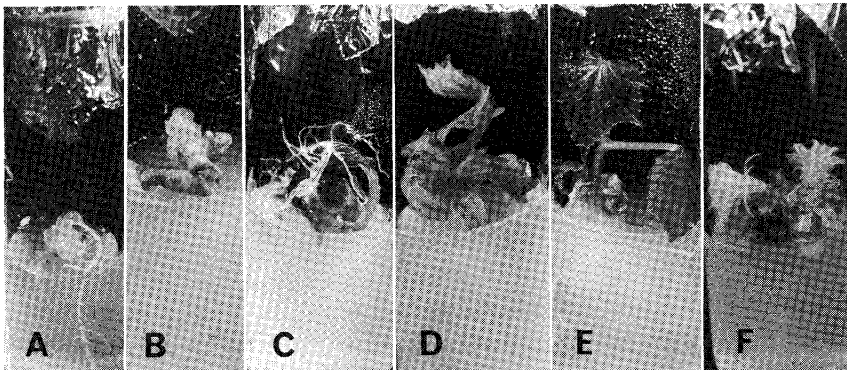


Fig. 6. Differentiation of organs from embryo on plantlet-inducing medium. A: Rooted callus. B: Leafy tissue. C: Bushy leaves, root-end grew away from medium. D: Vitrified leaves. E: Well-developed plantlet. F: Flowering plantlet. Photographs taken at around 115 (A-E) and 240 days (F) after inoculation.

**Table 2.** Development of embryo after transfer onto plantlet-inducing medium.

DAP <sup>a</sup>	No. of <sup>b</sup> disks	No. of <sup>c</sup> embryos	No. of embryos differentiated into					No. of embryos not responded
			callus	leafy tissue	root <sup>d</sup>	leaf	plantlet <sup>e</sup>	
2	30	6	1	0	2	0	3 ( 2)	0
3	44	10	2	1	2	0	2 ( 1)	3
4	118	73	12	15	8	6	27 (18)	5
6	26	3	1	0	0	0	2 ( 2)	0

Data taken at 500 days after inoculation.

<sup>a</sup> Days after pollination to inoculation.

<sup>b</sup> No. of disks inoculated. Each disk contained 20-30 ovules.

<sup>c</sup> No. of embryos transferred.

<sup>d</sup> Root differentiated from callus or leafy tissue.

<sup>e</sup> Plantlet has shoot and root. Numbers in parentheses indicate No. of plantlets planted in green house.

ったが、次第に向上し正常な稔性となった個体、③終始、稔性が30~60%の個体の3グループに分けられた。②の個体の稔性向上に必要とした日数は第一雄花開花後、平均24日であった。③の中には、稔性の低い原因がおもに空虚花粉によるもの、充実不完全花粉によるもの、空虚花粉と充実不完全花粉の両方によるものの3タイプがあった (Fig. 7)。また1個体 (87 OC-21) では、2倍体植物の花粉より大型で、多数の4発芽孔花粉を含む4倍体植物の花粉と思われるものが観察された (続報で詳述)。

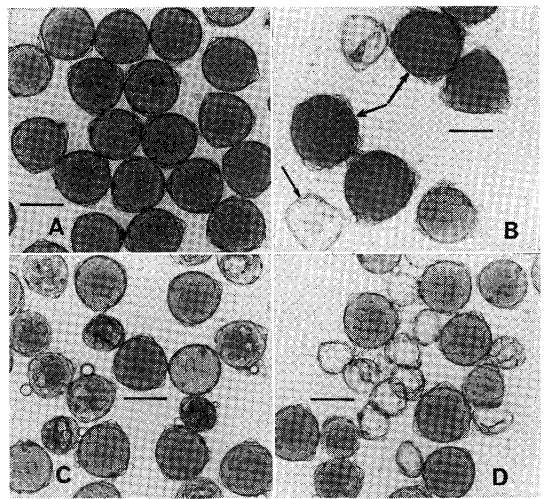
### 3) 染色体数

花粉稔性の向上しなかった4個体について染色体数を観察した。87 OC-21は根端細胞で28本の染色体が数えられ、4倍体であることが確認された。他の3個体は、根端細胞で14本、花粉母細胞で7本が数えられ、2倍体であることが確認された。

### 4. 考 察

今回、培養により誘導できた植物のうち、成熟果実を収穫できた18個体は、いずれも果実に花粉親の優性形質である黒イボが現れたので、受精卵由来であることが確認できた。さらに胚発生の組織学的観察でもそれが推測された。イネの無受精の子房培養<sup>10)</sup>では助細胞由来の植物が、カボチャの無受精の胚珠培養<sup>11)</sup>では珠心細胞由来の植物が誘導されており、これらはいずれも組織学的観察からその由来を推察したものであった。Sautonら<sup>12)</sup>はF<sub>1</sub>メロンの無受精の胚珠培養で、誘導植物に劣性形質が現れたことから、それを卵細胞由来であると確認している。

今回試みた胎座切片培養は、筆者らがメロンの無受精胚からの植物誘導<sup>13)</sup>で紹介して以来、キュウリ、メロン<sup>14)</sup>の他、*Cucumis*属の野生植物における受精直後の胚からの植物誘導に採用してきた方法である。その特徴



**Fig. 7.** Pollen grains in plants induced from 4 DAP placental region disk. Pollen was stained by aceto-carmin. Bar=50  $\mu$ m. A: Fertile pollen stained densely (87 OC-1). B: Giant pollen from spontaneous tetraploid plant (87 OC-21) involved 4 porate ones which are shown by arrows. C: Sterile pollen with shrivelled cytoplasm stained lightly (87 OC-3). D: Sterile empty pollen unstained (87 OC-2). Individual plant numbers are indicated in the parentheses.

は次のようである。①胚・胚珠培養に比べ、受精直後の小さな胚・胚珠を無傷で一度に多数置床できる (1切片には20~30の胚珠が内在し、100 mlのフラスコに5~12枚の切片の置床が可能である)。②胎座組織から胚・胚珠へ、初期発育に有効なバランスのよいホルモンや栄養素など、内生物質の供給が可能であると考えられる。③②の可能性から、無機塩類、糖以外の物質を培地へ添

加する必要性が少なくなり、培地の処方が簡便となる。④子房培養では困難な、培養容器内での胚の発育の観察が容易である。

筆者らと同様な目的や培養効果を意図した研究に、ユリにおける子房切片培養<sup>7,15)</sup>があり 0.1 mm の前胚期にある種間雑種胚からの植物育成に成功している。胎座組織や子房壁に含まれる物質が、胚や胚珠の初期発育に有効と考える研究はかなりある。フウチョウソウ<sup>16)</sup>では、胎座は胚や種子の生長と成熟に有効で、胎座つき胚珠培養で正常種子が誘導されている。ペチュニア<sup>17)</sup>でも胎座つき胚珠培養で異常発育がまったく起こらないことから、接合子の正常な発育を支える胚珠の生理条件に、胎座が関係していると考えられている。ユリ<sup>7)</sup>の場合、雑種胚が胚乳に依存する栄養を、胎座や子房壁が代用できると推論している。中島<sup>18)</sup>は、胚珠を胎座や子房壁をつけた状態で培養すると、未熟胚珠でも比較的簡単な培地で完全種子になる例を挙げ、これらの組織に内在する、あるいはそこで産出される物質が、胚の初期生長に重要な意義を持っていることや、これらの組織が胚珠と培地間の仲介的役割りを演じていることなどを述べている。筆者らは一連の研究で、NAA, 2,4-D, BA の培地への添加効果を調査したが、いずれの場合もカルス化が促され、胚・胚珠の発育はかえって阻害されたので、以降は胎座組織内の内生物質のみに依存するようにし、生長調節物質は一切添加しなかった。他にも無機塩類と sucrose のみ、あるいはそれにビタミンやカザミノ酸程度の添加がみられるような単純な培地での胚珠培養の例は多く、ユリの子房切片培養<sup>15)</sup>では IAA の添加は胚の発育に逆に阻害的であったとしている。

筆者らの胎座切片培養では、子房切片から胚珠・胎座とその周囲のわずかな子房壁のみを繰り抜いて置床し、外側の余分な子房壁は捨てた。その理由は次のようである。①子房壁のカルス化が胚珠にまでおよび、胚の発育が妨げられる。②外側の子房壁に比べて内側は生長速度が速く、切片がそりかえって培地に密着しなくなり、培地からの養分吸収能力が低下する。③切片1枚の表面積が小さくなり、フラスコあたりの培養切片数が増える。④子房表皮のイボ・シワ等の凹凸部や、微小な毛茸の間隙に付着しているバクテリア・糸状菌などの污染源を除去できる。

胎座切片のカルス化は、培地に添加する sucrose 濃度や寒天濃度によって、ある程度抑えられることを予備実験で確かめた。sucrose 濃度が 5% の時にカルス化は最も盛んで、それ以上でも以下でも抑えられたが、15% では胎座切片が褐変した。そこで今回の培養には 10%

sucrose を添加した。胚・胚珠培養では、sucrose を通常よりも高めの濃度で用いて、好結果を得ている場合が多く、特に未熟胚ほど高濃度が適しているとするものもある<sup>17,19)</sup>。また培地の浸透圧は、胚の発育に影響するという報告もある<sup>17)</sup>。そこで浸透圧が等しくなるように sucrose を mannitol に変えて培養したところ、切片のカルス化は抑えられたものの退色し、胚珠の発育には sucrose が必要であるように思われた。寒天濃度が 1.6%, 3.2% と高い場合、切片はカルス化し萎縮したが、0.8%, 0.4% と下げるに従いカルス化は抑えられた。今回の培養では、操作の容易さから一般的な 0.8% の寒天を加えた。受精直後の胚からの植物誘導には、カルス化を抑制する培養条件や、植物自体の生理条件を考える必要があろう。

キュウリの成熟種子には、厚い種皮があるにもかかわらず、今回の胎座切片培養では、胚乳・珠心組織も早期に消失し、珠皮が発育途中で消失した。胚は心臓型胚以降、胎座切片から直接萌芽するような状態で、異常な発育を示した。同じような発育過程が、その後のメロン<sup>14)</sup>や *Cucumis* 属野生植物でも認められている(続報で詳述)。アブラナの子房培養<sup>6,20)</sup>、ユリの子房切片培養<sup>7)</sup>などでは、培養中の胚珠の発育は *in vivo* と同様な経過をたどり、種皮を伴った種子を形成し、その後発芽することが報告されている。このような胚・胚珠の発育様相の違いは供試材料の差によるものであろうか。

胎座切片で発育した胚は、アルビノを思わせる乳白色であったが、MS 塩類の濃度を 1/2、sucrose 濃度を 2% に下げた培地に移植すると 2~3 日で緑色となった。また置床後 70 日の培養切片内の乳白色の胚組織には、クロロプラストの存在が確認できた。多くの植物で、培養によって誘導された *embryoid* や *plantlet*, *seedling* に、アルビノの出現が報告されており、カボチャ<sup>8)</sup>では、sucrose の高濃度の培地で培養した胚珠から、アルビノの子葉が出現したという報告がある。カーネーションの苗条の培養<sup>21)</sup>では sucrose 濃度を上げるほど、ランのカルス<sup>22)</sup>では fructose 濃度を上げるほどクロロフィル含量の減ることが報告されている。本実験でのアルビノ様の胚は、発育に必要な炭水化物源を培地の sucrose に依存しているが、その濃度が高いと、組織内のクロロフィル形成が抑えられ、緑化が妨げられていたと考えられる。培養によって誘導された *embryoid* や *plantlet* の中に、しばしば認められるアルビノ様の個体の中には、培養条件を変えることで緑化可能な生理的・一時的なもの、突然変異による真のアルビノとが存在することに留意するべきである。

shoot・根の分化は、初代培地上では抑えられているようであった。中島<sup>23)</sup>は、胚乳に幼根の発育を妨げる物質が含まれていることを報告しているが、胎座切片にもこのような物質が含まれていることが考えられる。胎座から胚だけを摘出して、plantlet 誘導培地に移植するとこのような物質が除かれ、shoot・根の分化が促されたのではなかろうか。

成熟果の得られた 18 個体の誘導植物は、形態的に特に異常は認められなかった。しかし、植物体各器官・組織の内では、最も異常環境に敏感に反応する花粉<sup>24)</sup>を観察したところ、初期に開花した雄花で、培養のストレスによると思われる異常花粉（低花粉稔性）が観察された。その多くは、漸次、正常な稔性を示すようになったが、果実収穫時まで花粉稔性が 30~60% と低かった 4 個体のうち、3 個体は 2 倍体、1 個体は 4 倍体であった。4 倍体の出現は、キュウリの子葉カルス<sup>25)</sup>、カボチャの無受精胚珠の珠心カルス<sup>11)</sup>、メロンのやく壁カルス<sup>26)</sup>から報告がある。このように培養で誘導された植物、特にカルス経由のものでは、染色体の倍化が高頻度で起きるようであるが、今回、誘導された植物はカルスを經由していない。メロンの無受精胚の胎座切片培養<sup>13)</sup>では、カルス経由せずに 2 倍体植物が、コヒメウリ (*C. melo*)<sup>27)</sup>では、メロンの 2 倍性花粉や異種花粉を受粉して無配偶生殖性の 2 倍体植物が誘導されている。メロンは温室栽培でも、しばしば 4 倍体の出現が報告されている<sup>28)</sup>。このようなことから、ウリ科植物、特に *Cucumis* 属植物では、染色体の倍化が起りやすいといえるかもしれない。

低花粉稔性を示した 2 倍体植物の中でも最も低かった個体の自殖次代では、11 個体中 7 個体が正常な花粉稔性 (90% 以上) を示し、残り 4 個体は低花粉稔性 (38%~62%) を示した。これは培養過程で生じた突然変異が、次代に遺伝したものである。培養による誘導植物の花粉稔性を調査した報告例は、現在までほとんどないが、果実・種子生産を目的とする植物において、結実や種子形成に直接影響をおよぼす花粉稔性の良否は、軽視できない要因であり、誘導植物のこの面での追跡調査が必須であると思われる。

今回の胎座切片培養では、胚の誘導率は、受粉後 4 日 (2~4 細胞期胚) に置床したもので最も高く、118 切片を培養して 73 の胚が移植できた。通常の採種法に比べると、この誘導率は非常に低い。また植物誘導に要した日数は、置床から第一雌花開花まで約 200~300 日であった。通常の栽培では、受粉から採種まで 40~50 日、播種から第一雌花開花まで 40 日程度であるから、所要

日数は 2~3 倍かかっていることになる。タマズダレの胚珠培養<sup>29)</sup>でも種子の成熟までに、*in vivo* での約 2 倍の日数を要したとしている。

今後、植物誘導率、所要日数などの点についてさらに改良を加える余地はあるが、簡単な操作で、受粉後 2~6 日の大きさ 10~15  $\mu\text{m}$  の胚 (接合子~初期球状胚) から植物誘導が可能となった。接合子からの植物誘導に成功した例はペチュニア<sup>17)</sup>、タマズダレ<sup>29,30)</sup>、クローバー<sup>31)</sup>などまだ極めて少ない。筆者らはその後、メロンでも胎座切片培養により接合子からの植物誘導に成功しており<sup>14)</sup>、本方法は、受精直後の胚からの植物誘導に関して、*Cucumis* 属では極めて有用であると考えられる。また、やく培養にかわる無受精胚からの植物誘導方法<sup>13)</sup>としても応用できるであろう。

## 文 献

- 1) 栗田直紀, 中島哲夫, 1982. 育種学雑誌, **32**: 371-377.
- 2) Iwai, S., C. Kishi, K. Nakata, S. Kubo, 1985. *Plant Sci.*, **41**: 175-178.
- 3) Imanishi, S., 1988. *Jpn. J. Breed.*, **38**: 1-9.
- 4) Thengane, S., S. V. Paranjpe, S. S. Khuspe, A. F. Mascarenhas, 1986. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **6**: 209-219.
- 5) Mohapatra, D., Y. P. S. Bajaj, 1988. *Euphytica*, **37**: 83-88.
- 6) Bajaj, Y. P. S., S. K. Mahajan, K. S. Labana, 1986. *Euphytica*, **35**: 103-109.
- 7) Kanoh, K., M. Hayashi, Y. Serizawa, T. Konishi, 1988. *Jpn. J. Breed.*, **38**: 278-282.
- 8) Kwack, S. N., K. Fujieda, 1987. *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.*, **55**: 455-460.
- 9) Fassuliotis, G., B. V. Nelson, 1988. *Euphytica*, **37**: 53-60.
- 10) Zhou, C., H. Y. Yang, H. Q. Tian, Z. L. Liu, H. Yan, 1986. *Haploids of Higher Plants in vitro*, p. 165-181, China Academic Publ., Beijing.
- 11) Kwack, S. N., K. Fujieda, 1988. *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.*, **57**: 34-42.
- 12) Sauton, A., R. D. de Vault, 1987. *Agronomie*, **7**: 141-148.
- 13) 藤下典之, 西谷勝美, 西井克美, 1987. 育種学雑誌, **37** 別冊 2: 26-27.
- 14) 斎藤清子, 藤下典之, 1989. 育種学雑誌, **39** 別冊 1: 18-19.
- 15) Hayashi, M., K. Kanoh, Y. Serizawa, E. Yoon, 1986. *Jpn. J. Breed.*, **36**: 304-308.
- 16) Chopra, R. N., P. S. Sabharwal, 1963. *Plant Tissue and Organ Culture, A Symposium*, p. 257-264, Delhi.
- 17) Wakizuka, T., T. Nakajima, 1975. *Jpn. J. Breed.*, **25**: 161-167.

- 18) 中島哲夫, 1970. 育種学最近の進歩, **11**: 53-59, 啓学出版, 東京.
- 19) Rietsema, J., S. Satina, A. F. Blakeslee, 1953. *Am. J. Bot.*, **40**: 538-545.
- 20) Inomata, N., 1977. *Bull. Univ. Osaka Pref. Ser. B.*, **29**: 1-6.
- 21) 高山真策, 三沢正愛, 松川時晴, 小林泰生, 1982. 園学要旨, 昭和 51 春: 296-297.
- 22) Chia, T. F., C. S. Hew, C. S. Loh, Y. K. Lee, 1988. *HortScience*, **23**: 599-601.
- 23) 中島哲夫, 1962. 大府大紀要, 農学, 生物学, **13**: 13-48.
- 24) 藤下典之, 1970. 大府大紀要, 農学, 生物学, **22**: 111-208.
- 25) Kim, S. G., J. R. Chang, H. C. Cha, K. W. Lee, 1988. *Plant Cell, Tissue Organ Cult.*, **12**: 67-74.
- 26) 藤下典之, 古川 一, 1982. 園学要旨, 昭和 58 秋: 162-163.
- 27) 藤下典之, 中川啓子, 1974. 花粉, **6**: 34-36.
- 28) 鈴木英治郎, 1958. 静岡大教育学部研究報告 **9**: 169-176.
- 29) Kapoor, M., 1959. *Phytomorphology*, **9**: 313-315.
- 30) Sachar, R. C., M. Kapoor, 1959. *Phytomorphology*, **9**: 147-156.
- 31) Nakajima, T., Y. Doyama, H. Matsumoto, 1969. *Jpn. J. Breed.*, **19**: 373-378.

### Summary

#### Induction of Plants from Zygote and Early-globular Embryos through the Placental Region Disk Culture in Cucumber (*Cucumis sativus* L.)

Noriyuki FUJISHITA and Kiyoko SAITO

*College of Agriculture, University of Osaka Prefecture, Sakai, Osaka, 591, Japan*

Ovaries of 2, 3, 4 and 6 days after pollination were surface-sterilized and sliced into 1 mm thick. Ovary walls of the slices were discarded by punching with cork-borer. These disks were inoculated on a MS basal medium supplemented with 100 g/l sucrose, 8 g/l agar and without growth substances.

About 20 days after inoculation, ivory-white embryos were recognized, on the agar medium. They were transferred on a plantlet-inducing medium, which consisted of 1/2 strength MS salt supplemented with 20 g/l sucrose, 8 g/l agar and without growth substances.

Most of induced 23 plants grew up morphologically normally and set fruits in green-house. They were recognized to be originated from fertilized egg cell, based on the observation of morphological characters and embryogenesis. Pollen fertility of 4 plants showed 30-60%, and others normal. On the root-tip chromosome of these 4 plants, one was tetraploid ( $2n=28$ ) and the rest were diploid ( $2n=14$ ).