

球根ベゴニアにおける葉挿し繁殖に関する研究 *

島田有紀子 ¹⁾

Propagation by leaf piece cutting of *Begonia* Tuberous Group *

Yukiko Shimada ¹⁾

Summary

Begonia Tuberhybrida Group has large, flattish perennial tubers. Their ancestors are seven tuberous species that inhabit the Andes of South America. Their various plant forms, flower sizes and colors make them one of the most popular pot flower crops.

Rhizomatous begonia plants including the Rex-cultorum Group, and *B. × cheimanthia* Everett ex. C. Weber plants form adventitious buds on leaf cutting. However, the *B. Tuberhybrida* Group is propagated mainly by seeds, because vegetative propagation with cutting has been considered impossible. However, seedlings generally exhibit a wide range of variations because of their high levels of heterozygosity and their limited pollination period. Therefore, the establishment of a vegetative propagation method for plants with excellent horticultural characteristics is in demand. Although most of the research on vegetative propagation of *B. Tuberhybrida* Group has been on *in vitro* propagation, the systems developed are not practical because of the presence of endotrophic bacteria in the tissues.

The aim of the present work was to study the conditions suitable for promoting adventitious bud formation in leaf piece cutting of *B. Tuberhybrida* Group, and to establish a new and efficient method of vegetative propagation.

Chapter 1. Frequency of adventitious bud formation in tuberous and other species

Whole leaf blades of four tuberous and 15 erect stemmed and 23 rhizomatous species were placed in distilled water, and the course of organogenesis was compared. Three tuberous species were the main ancestors of *B. Tuberhybrida* Group.

The majority of rhizomatous species formed adventitious buds on the cut end of the leaf blade, while hardly any of the tuberous and erect stemmed species formed them. Thus the lack of ability for adventitious bud formation in the ancestors of the *B. Tuberhybrida* Group can be assumed to be the reason why propagation by leaf cutting of the *B. Tuberhybrida* Group has generally been considered to be impossible.

There was no correlation between frequency of adventitious bud formation and continent of origin, size of leaf blade, thickness of leaf blade, or width of a main vein. There was a tendency for the percentage of adventitious bud formation of species having palmate veins to be higher than for those having pinnate veins. Species having some multiseriate hairs also showed higher percentages of bud formation than those which have no hairs or uniseriate hairs.

Chapter 2. Factors promoting adventitious bud formation of *B. Tuberhybrida* Group

Expanded young leaves of *B. Tuberhybrida* Group were detached from the stock plants and cut radially into four pieces from the base. Each leaf piece was inserted into one of five media: perlite, Kanuma soil, vermiculite, rockwool

A dissertation submitted in partial fulfilment of the requirement for the degree of Doctor of Agriculture of Osaka Prefecture University.

* Contribution from the Hiroshima Botanical Garden No. 85.

1) The Hiroshima Botanical Garden

Bulletin of the Hiroshima Botanical Garden, No. 26 : 1 – 52, 2008.

granule (rock fiber) or rockwool blocks in nursery trays. Only 20% or fewer of the leaf pieces that were inserted in perlite, Kanuma soil, vermiculite and rock fiber formed adventitious buds, whereas 50% of those inserted in the rockwool blocks formed adventitious buds. The rockwool blocks were therefore used in subsequent work.

Leaf pieces were inserted into rockwool blocks on 8 April, 20 May, 29 July and 13 October. The percentages of adventitious bud formation were 67% in April and 60% in October, whereas in July only 13% formed adventitious buds. Next, leaf pieces were inserted in rockwool blocks kept at 15, 20, 25, or 30°C under plant environmental control systems. The percentages of adventitious buds formed were higher at 15 and 20°C than at 25 and 30°C. Therefore, it appears that the optimum temperature for adventitious bud formation is around 15-20°C.

The effects of size and configuration of leaf cuttings on adventitious bud formation was determined. Leaf pieces of *B. Tuberhybrida* Group 'Tenella' were used for the experiment and five cutting configurations were compared. They were: whole leaf blade with 5 mm petiole, 5 × 4 cm leaf piece with 5 mm petiole, 2 × 1.5 cm leaf piece with 5 mm petiole, 2 × 1.5 cm leaf piece cut at leaf base without petiole, 2 × 1.5 cm leaf piece cut at 2 cm further away from a leaf base. The different types of leaf pieces were excised and inserted in rockwool blocks containing distilled water. Seventy three percentages of whole leaf blades with petioles formed adventitious buds, whereas smaller leaf pieces did not form adventitious buds at all and instead formed adventitious roots or calli.

2 × 1.5 cm leaf pieces with 5 mm petioles of five cultivars of *B. Tuberhybrida* Group were inserted in rockwool blocks containing distilled water. None of the cultivars formed any adventitious buds.

Chapter 3. Effects of plant growth regulators on adventitious bud formation in leaf piece cutting

It was anticipated that adventitious bud formation in 2 × 1.5 cm leaf pieces might be induced with high frequency by applying plant growth regulators. The leaf pieces were inserted in rockwool blocks containing different concentrations (0, 0.01, 0.1, 0.25, or 0.5 ppm) of NAA (α -naphthalene acetic acid) alone or (0, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1, or 2 ppm) of BA (6-benzylaminopurine) alone. About 20% of the leaf pieces inserted in the absence of NAA and BA became brown and died, the surviving leaf pieces did not form any adventitious buds at all. All of the leaf pieces treated with more than 0.1 ppm NAA died after showing leaf yellowing. All leaf pieces with more than 0.25 ppm BA survived without browning and/or yellowing and 80% of them formed adventitious buds. The surviving percentage was high with 0.1-0.5 ppm NAA plus 0.5 ppm BA, and the pieces did not turn yellow, but callus formation was promoted and the onset of adventitious bud formation was delayed.

Changes in the chlorophyll contents in leaf pieces inserted in rockwool blocks containing 0.5 ppm NAA, 0.5 ppm BA or free of growth regulators were investigated. After 10 days from inserting, total chlorophyll contents in leaf pieces treated with 0.5 ppm NAA decreased, and then the leaf began to yellow a little. Treatment of BA inhibited chlorophyll degradation in leaf pieces. Ethylene production from leaf pieces stayed low throughout the culture period, whether leaf pieces were treated with NAA and BA or not. Therefore, chlorophyll degradation in leaf pieces treated with NAA was not related to ethylene production.

Changes in total polyphenol contents in leaf pieces were investigated in comparison with BA treatment or in its absence. Total polyphenol contents in both sets of leaf pieces increased gradually after cutting: the amount of increase in non BA-treated leaf pieces was significantly more than that of BA-treated, and non BA-treated leaf pieces turned brown. Therefore, it was concluded that BA treatment reduced the rate of increase of total polyphenol contents and inhibited browning of leaf pieces. It was therefore adopted for the later studies.

Chapter 4. Effects of day length during growth of mother plant and leaf piece cutting, section position and orientation of leaf piece on adventitious bud formation

Mother plants were grown under 18 hr day length prior to this experiment. On 11 October, the mother plants

were placed in a glasshouse with a night temp 14°C under 18 hr day length (LD) and natural day length (SD). On 23 November, young, but fully opened leaves were selected for cuttings and were cut to 2 × 1.5 cm leaf pieces. The leaf pieces were inserted in rockwool blocks containing 0.5 ppm BA, then they were maintained in a glasshouse with a night temp 14°C under 18 hr and natural day length. Almost all of the leaf pieces from the LD mother plants formed adventitious buds, no matter what was the cuttings' day length regime, whereas 60-67% of leaf pieces taken from SD mother plants survived, but their percentage of adventitious bud formation was only 13%. The LD mother plant and LD cutting combination hastened the development of adventitious buds.

2 × 1.5 cm leaf pieces were cut at 0, 1, 1.5 or 2 cm away from the base towards the tip of leaf blades and inserted in rockwool blocks containing 0.5 ppm BA. The percentage of adventitious bud formation declined from the base towards the tip of the leaf, that is, the leaf pieces cut at 0 cm from the leaf base formed adventitious buds at the highest rate (87%), followed by 1 cm (33%), 1.5 cm (40%) and 2 cm (0%). The greater part of the leaf pieces cut further away from the base formed calli.

The leaf pieces cut at 2 cm from the leaf base were placed vertically upright, horizontally or vertically inverted in rockwool blocks containing 0.5 ppm of BA. When leaf pieces were placed vertically upright, none formed adventitious buds and most formed calli. However, when they were placed horizontally or vertically inverted, the percentages of adventitious bud formation were 60% and 80%, respectively. The leaf pieces placed vertically inverted formed small bud primordia directly without callus on some lateral veins of the distal cut end (the end immersed in the medium). When the leaf pieces placed vertically were inverted in rockwool blocks containing 0.25 ppm of NAA and 0.5 ppm of BA, none formed adventitious buds and all formed calli. In addition, when leaf pieces to which lanolin paste containing 100 ppm TIBA (2,3,5-triiodobenzoic acid) had been applied were inserted vertically upright in rockwool blocks containing 0.5 ppm BA, 73% of them formed adventitious buds. This can be attributed to the disturbance of the basipetal movement of auxin by inversion. Based on these results, it appears that a suitable balance of endogenous auxin and endogenous cytokinin may be established near this distal cut end with assisting of cytokinin exogenously supplied as a plant growth regulator, BA, too, and the resulting in the formation of adventitious bud primordia.

In order to know whether adventitious buds obtained by this leaf piece cutting method arose directly from the original tissues or indirectly through a callus phase, adventitious bud histogenesis was investigated. Adventitious primordia differentiated directly from epidermal and subepidermal layers. Ten plants propagated by this method showed no morphological aberrants for flower and leaf characteristics in comparison with the mother plant. Additionally, the chromosome numbers of both mother plant and plants propagated were the same ($2n=28$) and their karyotypes at metaphase were similar to each other. Therefore, it appeared that there were no chromosomal aberrations.

Finally, various begonias for which percentages of adventitious bud formation were low in chapter 1 were tried out again using the newly developed technique. 2 × 1.5 cm leaf pieces cut at the leaf bases of the begonias were inserted vertically upright in rockwool bed containing 0.5 ppm BA. Many species and cultivars except for two erect stemmed begonias formed adventitious buds. When leaf pieces of those two 'resistant' begonias were inserted vertically inverted in the medium, the percentages of adventitious bud formation were 93% and 73%.

In conclusion, vegetative propagation by the use of leaf piece cutting of *Begonia* Tuberhybrida Group, which had been considered almost impossible until now, was successfully developed. Rockwool blocks provided a suitable bedding medium and the optimum temperature for adventitious bud formation was around 15-20°C. It was found that 0.5 ppm BA enhanced survival, inhibited browning, and promoted adventitious bud formation of small leaf pieces. The frequency of bud formation was highly dependent on the position of the pieces in the leaf blade, declining from a high rate at the base towards no bud formation at the tip. Adventitious bud formation on pieces without the leaf bases was achieved by placing them vertically inverted, or by inserting them vertically upright with the addition of an application of lanolin paste containing 100 ppm TIBA. Plants propagated by this cutting method were not aberrant. Moreover, this method brought good results for other tuberous and erect stemmed begonias.

緒 言

ベゴニア属 (*Begonia* L.) はシュウカイドウ科に属する多年草または半低木で、オーストラリア大陸を除く世界の熱帯から亜熱帯地域にかけて広く分布し、野生種の数 は 1500 (Kiew, 2005), 園芸品種においては 10,000 を超える (Ingles, 1990, 1997) とされている。広範囲にわたる自生地ですれぞれ種分化が進んで発達したため、それらの形態および生育特性は極めて多種多様である。Doorenbos ら (1998) は 63 項目の形態学的特徴をもとに約 1400 種の野生種を 63 節に分類した。一方、日本における園芸の分野では、茎と根の形状をもとに、木立性ベゴニア、根茎性ベゴニア、球根性ベゴニアの 3 グループに大別されている (林ら, 1989)。木立性ベゴニアは直立茎またはつる状の茎を有し、地下に塊茎や根茎などの貯蔵器官を作らないタイプ、根茎性ベゴニアは根茎と呼ばれるほふく茎を有するタイプで、根茎からさらに細い直立茎を伸ばすものや、茎が斜上して生育するものなどがある。球根性ベゴニアは地下に塊茎を有するタイプで、夏または冬に地上部が枯れて休眠するものが多い。

現在、量的に最も多く生産、消費されているのは木立性ベゴニアに含まれる 1 品種群のベゴニア・センパフローレンス (*B. Semperflorens-cultorum* Group) で、主に花壇用草花として利用されており、一部の斑入り品種および八重咲き品種を除き、ほとんどが F_1 品種で種子繁殖されている (林ら, 1989)。鉢花として利用される木立性ベゴニアについては茎挿しにより営利生産されているが、花序が葉腋に連続的に着くため、開花株では管挿しができずに頂芽挿し为中心となり、繁殖効率はあまりよくないという問題がある。レックスベゴニア (*B. Rex-cultorum* Group) をはじめとする根茎性ベゴニアは根茎挿しおよび葉挿しによって繁殖され (Thompson・Thompson, 1981), また球根性ベゴニアに含まれるエラチオールベゴニア (*B. Elatior* Group) およびクリスマスベゴニア (*B. $\times$ cheimantha* Everett ex C. Weber) では葉挿し繁殖 (Heide, 1969a, 1969b) および組織培養 (Ringe・Nitsch, 1968; Fannesbech, 1974; Hilding・Welander, 1976; Welander, 1977, 1979; Mikkelsen・Sink, 1978; Takayama・Misawa, 1981, 1982; 角田・萩原, 1986; Simmonds・Werry, 1987) に関する研究が 1960 年代後半以降盛んに行われて、

現在、栄養系品種は主に葉柄挿しによって繁殖されている。

球根性ベゴニアに属する「球根ベゴニア (*B. Tuberhybrida* Group)」は、球根を有する 7 種の原種をもとに育種、改良された園芸品種群の総称である (Haegeman, 1979)。その原種は、*B. cinnabarina* Hook. ($2n=26$), *B. boliviensis* A. DC. ($2n=28$), *B. pearcei* Hook. f. ($2n=26$), *B. veitchii* Hook. f. ($2n=28$), *B. rosaeflora* Hook. f. (染色体数は不明), *B. clarkei* Hook. f. (染色体数は不明) および *B. davisii* Hook. f. ($2n=28$) で、いずれも南米アンデス山脈の標高 3,000 ~ 3,800 m の高地に自生する (Legro・Haegeman, 1971; Haegeman, 1979)。日本には明治時代後半に紹介され、1960 年頃から品種改良が始まり (吉江, 1980), 1970 年代には鉢花栽培に関する研究 (小泉, 1974a, 1974b, 1975, 1977) が行われて知名度が高まってきた。現在、球根ベゴニアはベゴニア属の中で最も豪華で美しく、植物園をはじめとする観光施設などで華やかに装飾されて人気を集めている。また、近年では耐暑性に富む品種が発表され、一般家庭においても少しずつではあるが浸透しつつある。形状は太い茎が直立して直径 20 cm ほどの豪華な花を咲かせるタイプ、分枝性のよいしなやかな茎が 1 m を超えて下垂して多数の花を咲かせるタイプの 2 つに大別され、花形は一重から八重、花卉の形状および花色は変化に富む。

球根ベゴニアは地下に胚軸が肥大した塊茎を形成するが、それは年々肥大するだけで分球しない (Haegeman, 1993)。加えて、茎は多汁質で腐りやすく、葉挿しを含めて栄養繁殖は不可能とされ、現在のところ繁殖は種子に頼っている。しかしながら、雄ずいが弁化して花卉が幾重にも重なった八重咲き品種では花粉の採取がほとんどできないことから交配に供することができず、観賞価値の高い花ほど種子繁殖が難しいという問題がある。さらに元来、球根ベゴニアは雑種群を起源とするために遺伝的に異型であり、種子繁殖を行うと次世代の実生の形質に大きな変異が生じる。一方、植物園や専門種苗会社では長年限られた系統の中で交配が繰り返されているが、遺伝的純度が高まると近交弱勢が生じて不良形質が現れることや不稔になることが経験的に知られている。以上のような理由から、球根ベゴニアで

は優良系統を保存、増殖できない現状にあり、栄養繁殖方法の確立が期待されている。

球根ベゴニアの栄養繁殖についての研究は、ほとんどが組織培養に関するものである (Peck・Cumming, 1984; 飯田ら, 1986; Viseur・Lievens, 1987; 土井ら, 1992; Nakano ら, 1999)。しかし、ベゴニアでは内在するバクテリアが認められており (飯塚, 1979)、長期にわたって栽培している個体を培養した場合、あるいは培養期間が長期に及ぶと、それが発生して汚染される。島田ら (1999) は、発根培地の支持体について検討した実験で、パーミキュライト培地を用いた場合に内生バクテリアによる汚染が軽減したことを報告しているが、継代培養中の汚染など根本的な汚染の回避は全くできておらず、労力やコストの点から考えても組織培養は実用的とはいえない。

一般に、全葉挿し、葉柄挿し、あるいは葉片挿しなどの葉挿し繁殖は、茎挿しに比べて少数の母株から多数のシュートを効率的に得ることができるという利点がある。しかし、葉には定芽が存在しないため、葉挿しが成功するためには不定根とともに不定芽の形成が伴わなくてはならない (富士原, 1968)。葉挿し繁殖が可能な植物としてはセントポーリアやペペロミア、サンセベリアなど一部の種類に限られる (Hartman ら, 1997)。

前述したように、ベゴニア属の一部の種および品種では葉挿し繁殖が行われているが、一般に球根ベゴニアでは葉挿し繁殖が不可能とされている。しかしながら、球根ベゴニアを交配親にもつエラチオールベゴニアで葉挿し繁殖が可能であること、また

組織培養では外植体に葉片を用いても成功している (Peck・Cumming, 1984; 飯田ら, 1986; Nakano ら, 1999) ことを加味すれば、球根ベゴニアにおいても適当な培地に植物成長調節物質を添加し、不定芽形成に必要な諸条件を検討することで、*in vitro* に頼らない葉挿し繁殖が可能になるのではないかと考えられる。もし、球根ベゴニアにおいても葉挿し繁殖方法が可能となれば園芸的な発展に貢献するところが大きい。

そこで本研究では、これまで葉挿し繁殖が不可能とされてきた球根ベゴニアについて、*ex vitro* での小葉片挿しにより、効率的に増殖するための手法を開発することを目的に、まず広島市植物公園で栽培している多数のベゴニアの野生種と球根ベゴニアの交配親との不定芽形成能を比較したうえで (第1章)、培地の種類および葉挿し時の温度など挿し床の諸条件を検討 (第2章)、多数の不定芽を得るために小葉片挿しへの植物成長調節物質処理を検討 (第3章)、母株の諸条件および小葉片の置床方法などを検討して不定芽形成率を高め、さらに不定芽の発生起源について組織学的に観察するとともに繁殖個体の変異の有無について調査した (第4章)。特に、第4章では、1枚の葉身内における不定芽形成能について部位別に比較したうえで、不定芽形成能の低かった部位からの不定芽形成を誘導する方法を見出そうとした。さらに最後に、ここまでで得られた方法を、葉挿し繁殖が困難であった他のベゴニア類にも適用できるかどうかを検討した。

第1章 球根性ベゴニアと他のベゴニア類との不定芽形成能の比較

レックスベゴニアをはじめとする根茎性ベゴニアは、慣例的に葉挿しによって繁殖されている (Thompson・Thompson, 1981) が、球根ベゴニアでは葉挿し繁殖が不可能とされている。ここでは、球根ベゴニアの葉挿し繁殖が難しいのは交配親に依存するのではないかと考え、球根ベゴニアの主要な交配親である *B. boliviensis* A. DC., *B. cinnabarina* Hook., *B. pearcei* Hook. f. の3種を含む42種の野生種を用い、葉挿し繁殖における不定芽形成能を比較した。また、不定芽形成能に関与している要因を探るため、種々の形態学的特徴および原産地と不定芽形成との関係についても調べた。

材料および方法

広島市植物公園で栽培しているベゴニア属42種の野生種 (球根性4種、根茎性15種、木立性23種) を供試した。4月8日に、完全に展開した若い葉を採取し、葉柄を切り離して葉身全体を挿し穂とし、蒸留水を5ml注いだ直径1.5cm、深さ4.5cmのプラスチック容器にその基部を挿す、いわゆる水挿しを行った (第1-1図)。葉の大きい種では容器に入るように葉身基部を筒状に少し丸めて挿した。さらに葉が特に大きい種では直径2.2cm、深さ13cmの試験管に挿した。いずれも25/15°C (昼温/夜温) に設定した50%遮光のガラス温室で管理し、葉挿

し6週後に、生存葉数、葉身基部における不定芽、カルスおよび根を形成した葉数について調査した。種により、葉身基部に高さ約5mmの不定芽が1個あるいは2個、さらにその基部に腋芽や小さい芽が多く混在しており、不定芽数を正確に数えることが

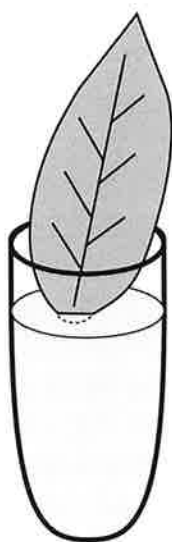


Fig. 1-1. Method of inserting a leaf blade in water.

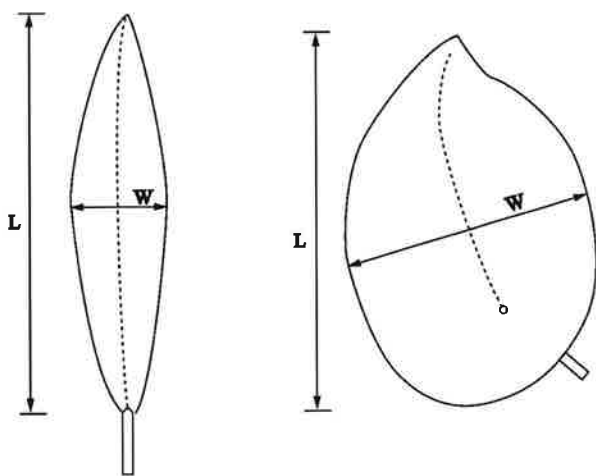


Fig. 1-2. The measurements of leaf length and width.

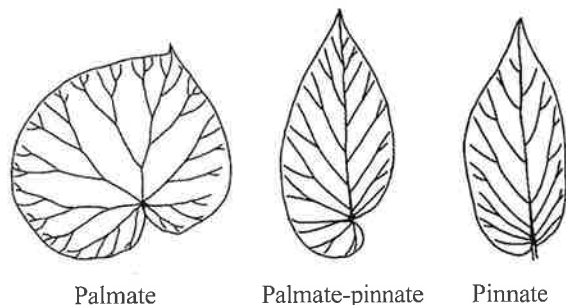


Fig. 1-3. Venation type.

できなかったため、ここでは不定芽を形成した葉の割合のみを記録した。各種5葉を供試して3反復した。また、各種の葉の形態、すなわち葉身の大きさ(第1-2図)と厚さ、葉脈の形状(第1-3図)と太さ、毛の多少について調査した。葉身の大きさは最大長(L)と最大幅(W)を測定し、最大長(L)×最大幅(W)を葉面積として表した。葉の厚さは葉身の中央部を、葉脈の太さは葉底における主脈の太さをノギスで測定した。葉の表皮に生える多細胞の毛の特徴については、必要に応じて実態顕微鏡あるいは光学顕微鏡を用いて観察し、その多少を4段階で(-, +, ++, +++)で評価した。これら葉の特徴に関わる調査には各種とも5枚の葉を供試した。

結 果

球根性ベゴニアでは、水の中に浸かっていた葉身基部で褐変が生じ、葉挿し6週後における4種の生存率は $45 \pm 23\%$ (平均±標準偏差)で低く、また種による差が大きかった。不定芽形成は、*B. sutherlandii*の1種においてのみ、7%の葉でみられたが、その他の種はすべて不定芽を形成しなかった(第1-1表)。

根茎性ベゴニアの生存率は $96 \pm 4\%$ 以上と高く、不定芽形成率は*B. bowerae* var. *nigramarga*を除いて60%以上となった。本種については、葉挿しから6週後も観察を続けたところ、約10週後から不定芽形成がみられ、約12週後にはすべての葉で不定芽が形成された。

木立性ベゴニアの生存率は $76 \pm 27\%$ であり、いくつかの種で葉身基部からの褐変が進み枯死するものがみられた。不定芽形成率は $8 \pm 13\%$ で低く、ほとんどの種が主脈の切断部から発根するのみであったが、*B. brevirimosa*, *B. fagifolia*, *B. isoptela*および*B. serratipetala*の4種では33%が不定芽を形成した。

なお、球根性ベゴニアおよび木立性ベゴニアの不定芽を形成しなかった種において、根のみを形成するものは多かったが、球根性ベゴニアの1種と木立性ベゴニアの9種では根もカルスも形成しないものが認められた。

各種ベゴニアの原産地および外部形態と不定芽形成との関係を見ると、原産地(第1-4図)、葉の大きさ(第1-5図)、厚さ(第1-6図)および葉脈の太さ(第1-7図)と不定芽形成との間に一定の関係はみられなかった。また葉脈の形状については掌状

Table 1-1. Percentage of surviving and organ formation in 42 species of *Begonia*.

Type of stem	Species	Surviving percentage	Percentage of organ formation			
			Adventitious buds	Only calli	Only roots	No change
Tuberous	<i>B. boliviensis</i>	53	0	6	20	27
	<i>B. cinnabarina</i>	27	0	0	27	0
	<i>B. pearcei</i>	73	0	0	73	0
	<i>B. sutherlandii</i>	27	7	0	20	0
	Mean±SD	45 ± 23	2 ± 4	2 ± 3	35 ± 26	7 ± 13
Rhizomatous	<i>B. aridicaulis</i>	100	73	0	20	7
	<i>B. auriculata</i>	93	87	0	0	6
	<i>B. bowerae</i> var. <i>nigramarga</i>	100	20	0	80	0
	<i>B. carolineifolia</i>	93	87	0	6	0
	<i>B. conchifolia</i>	100	60	0	40	0
	<i>B. conchifolia</i> var. <i>rubrimacula</i>	100	67	0	33	0
	<i>B. deliciosa</i>	100	100	0	0	0
	<i>B. heracleifolia</i>	100	86	7	7	0
	<i>B. microsperma</i>	93	93	0	0	0
	<i>B. palmata</i>	93	87	0	6	0
	<i>B. prismatocarpa</i>	93	93	0	0	0
	<i>B. rex</i>	100	100	0	0	0
	<i>B. richii</i>	93	87	0	6	0
	<i>B. scutifolia</i>	87	87	0	0	0
	<i>B. tenuifolia</i>	100	100	0	0	0
	Mean±SD	96 ± 4	82 ± 21	0 ± 2	13 ± 22	1 ± 2
Erect stemmed	<i>B. augustae</i>	93	13	0	80	0
	<i>B. boissiana</i>	27	0	0	27	0
	<i>B. borneensis</i>	87	0	0	87	0
	<i>B. breviformis</i>	93	33	0	0	60
	<i>B. coccinea</i>	87	0	0	87	0
	<i>B. convolvulacea</i>	93	0	0	93	0
	<i>B. cucullata</i> var. <i>hookeri</i>	87	13	27	47	0
	<i>B. dichroa</i>	87	0	0	80	7
	<i>B. fagifolia</i>	80	33	0	40	7
	<i>B. fissistyla</i>	87	7	0	27	53
	<i>B. glabra</i>	33	6	0	0	27
	<i>B. isoptela</i>	93	33	0	60	0
	<i>B. macrocarpa</i>	33	0	0	0	33
	<i>B. maculata</i>	87	0	0	87	0
	<i>B. mannii</i>	73	0	0	73	0
	<i>B. parva</i>	80	0	20	0	60
	<i>B. polygonoides</i>	20	0	0	20	0
	<i>B. radicans</i>	100	0	0	100	0
	<i>B. rhopalocarpa</i>	100	0	27	73	0
	<i>B. salicifolia</i>	87	0	0	80	7
	<i>B. schmidtiana</i>	26	0	0	13	13
	<i>B. serratifolia</i>	93	33	0	60	0
	<i>B. solananthera</i>	100	0	0	100	0
	Mean±SD	76 ± 27	8 ± 13	3 ± 9	54 ± 36	12 ± 20

Whole leaf blades (n=5) without petioles were inserted in distilled water. Three replicates were used for each species.

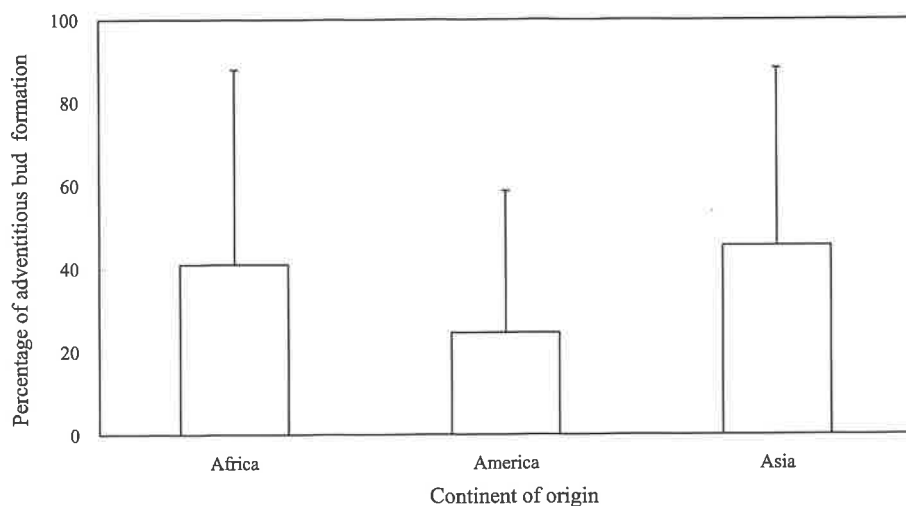


Fig. 1-4. Adventitious bud formation in begonia plants classified by continent of origin. Vertical bars indicate standard deviations. $n=9$, 22 and 11 in Africa, America and Asia, respectively.

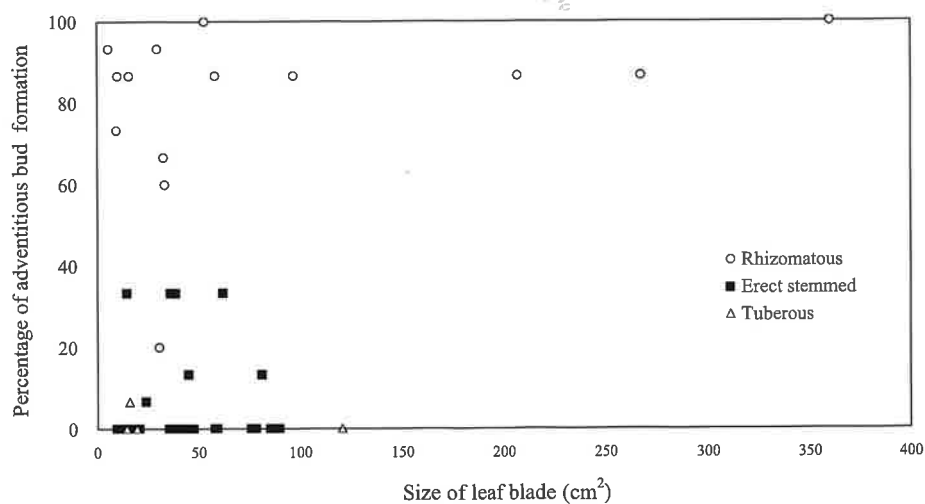


Fig. 1-5. Relationship between percentage of adventitious bud formation and size of leaf blade.

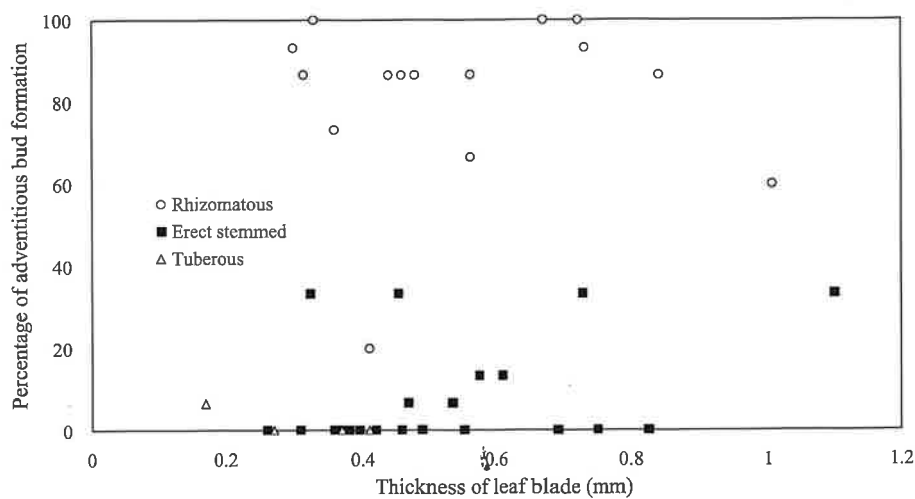


Fig. 1-6. Relationship between percentage of adventitious bud formation and thickness of leaf blade.

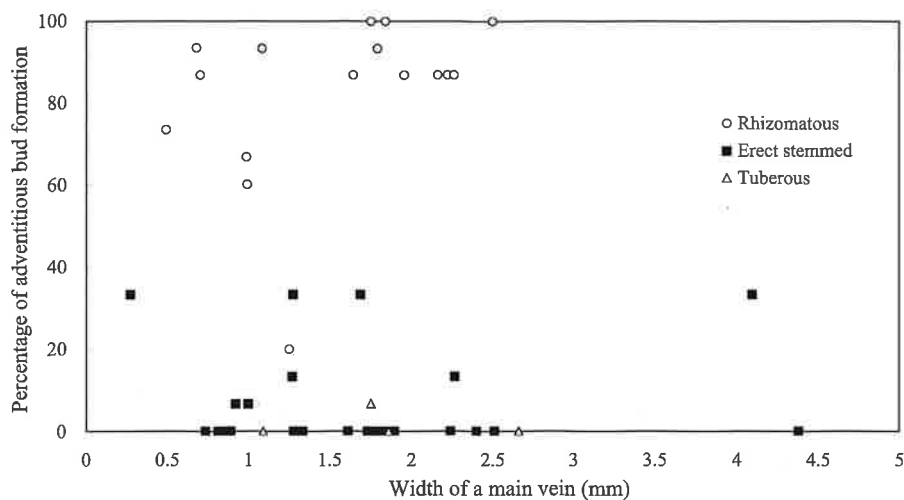


Fig. 1-7. Relationship between percentage of adventitious bud formation and width of a main vein.

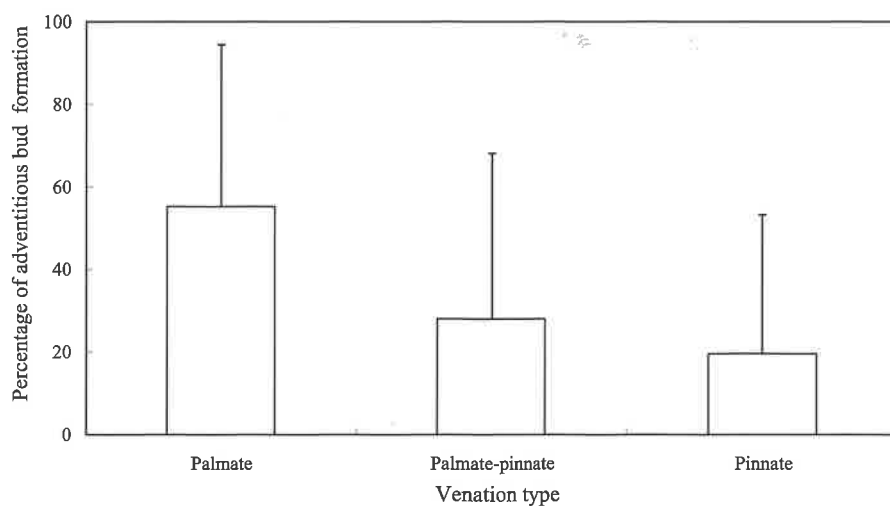


Fig. 1-8. Adventitious bud formation in begonia plants classified by venation type. Vertical bars indicate standard deviations. $n=14$, 10 and 18 in palmate, palmate-pinnate and pinnate, respectively.

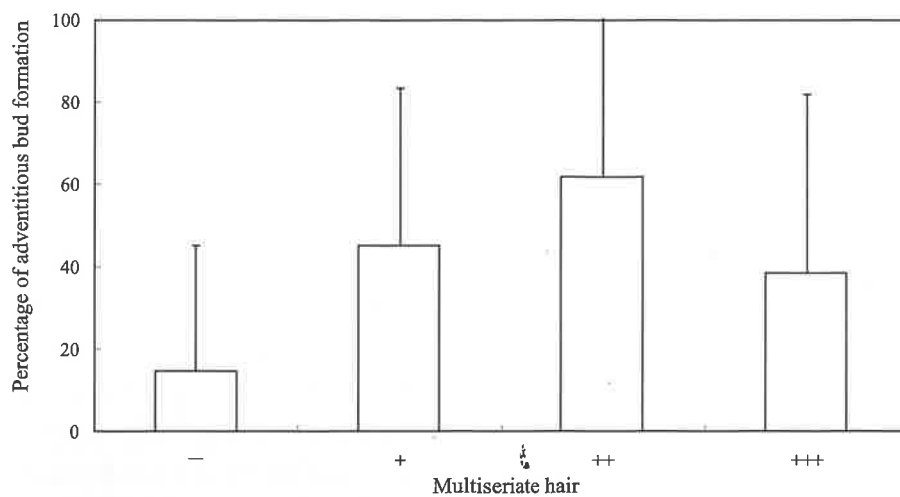


Fig. 1-9. Adventitious bud formation in begonia plants classified by degree of multiserial hair. Vertical bars indicate standard deviations. $n=15$, 8, 7 and 9 in -, +, ++ and +++ multiserial hair, respectively, and $n=2$ in uniserial hair.

葉脈である種が羽状葉脈の種よりも不定芽形成率が高い傾向にあった(第1-8図)。なお、掌状葉脈を呈する種は根茎性ペゴニアに多かった。表皮に生じる毛については、無毛の種が15種、単細胞の毛をもつ種が2種あり、その他の種では多細胞毛が観察されたが、無毛の種と比べると多細胞毛をもつ種の方が不定芽形成率は高かった。中でもその程度が++の種で不定芽形成率は最も高く、+++の種ではそれよりも低い傾向がみられた(第1-9図)。

考 察

同じ属にあっても種あるいは品種により不定芽形成能に差がみられることが、*Picea abies* (Arnold・Tillberg, 1987), *Brassica* (Jainら, 1988), *Fragaria* × *ananassa* (Nehraら, 1989) および *Lachenalia* (Niederwieser・Staden, 1990) などいくつかの植物で報告されている。本研究においても、ペゴニア属の野生種42種について葉挿し繁殖における不定芽形成を比較した結果、その頻度は種により大きく異なり、根茎性ペゴニアで不定芽形成率が高く、球根性および木立性ペゴニアでは極めて低いことが分かった。すなわち、レックスペゴニアの交配親 *B. rex* の他、ほとんどの根茎性ペゴニアでは不定芽を形成したのに対し、球根ペゴニアの主要な交配親とされる *B. boliviensis*, *B. cinnabarina* および *B. pearcei* は不定芽を全く形成しなかった。さらに、ペゴニア・センパフローレンスの交配親 *B. cucullata* var. *hookeri* および *B. schmidtiana*, 鉢花の木立性ペゴニアの交配親 *B. coccinea*, *B. dichroa*, *B. maculata* においても不定芽形成率は極めて低かった。これらのことから、

現在の園芸品種における不定芽形成能はその交配親の能力に依存することが示された。

Arnold・Tillberg (1987) は、*Picea abies* を用い、不定芽形成能の差は異なる遺伝子タイプの種における内生ホルモンレベルの違いによるものだと述べている。一方、Niederwieser・Staden (1990) は、*Lachenalia* において種および品種で不定芽形成能に差がみられたが、不定芽形成に及ぼす種・品種の影響と内生サイトカイニンレベルとの間に関係はなかったとしている。本研究では、内生ホルモンを測定しなかったため、内生ホルモンレベルと種によって異なる不定芽形成能との関係は明らかでない。しかしながら、種々の形態的特徴と不定芽形成能との関係について調べた結果、茎の形状と不定芽形成能との関係が強く、葉の大きさや厚さ、葉脈の太さなど他の形態的特徴と不定芽形成能の間には一定の関係が認められないことが分かった。サイトカイニンは根端分裂組織で主に合成されることが知られており (Taiz・Zeiger, 2004)、根と葉の距離が近い根茎性ペゴニアが、その距離がより離れている他のペゴニアよりも不定芽形成に有利であるのかもしれない。今後、より詳細な形態的、生理的な見地からの検討が必要である。なお、葉脈の形状および多細胞毛の程度との間には何らかの関連性が存在することが示唆された。

本章より、ペゴニア属の野生種における不定芽形成能は根茎性ペゴニアで優れ、球根性ペゴニアおよび木立性ペゴニアでは極めて劣ることが明らかとなり、球根ペゴニアで葉挿し繁殖が難しいとされているのは、その交配親そのものの不定芽形成能が低いということに依存していると考えられた。

第2章 球根ペゴニアの分割葉片挿しにおける不定芽形成の促進条件

葉挿し繁殖において、培地の種類、葉挿しの時期と温度および挿し穂の大きさなどは不定芽形成の成否を左右する最も重要な要因である。茎挿しの発根に関する研究は数多く行われてきたが、葉挿し繁殖が可能な植物が少ないことから、葉挿しにおける不定芽および発根を誘導する条件についての情報はあまり多くない。

球根ペゴニアは高冷地原産の原種をもとに改良されているため、高温では生育できず、また低温下では休眠に入る性質をもっている (林ら, 1989)。また、長日下で栄養成長し、花芽を形成する長日植物であ

る。したがって、熱帯・亜熱帯地域に広く分布して、生育温度および生育可能な日長の範囲が比較的広い根茎性ペゴニアと異なり、球根ペゴニアの不定芽形成に好適な葉挿し時期は限定される可能性がある。

そこで、本章では、球根ペゴニアの分割葉片を用いて、不定芽形成を誘導するための挿し床および挿し穂の諸条件について検討し、その反応が球根ペゴニアの品種間で異なるかどうかを調査した。

共通の材料および方法

第1節の実験では、前年の11月下旬に播種し栽培した球根ベゴニア‘クリップス・イエロー’を母株として供試し、完全に展開した若い葉を採取して、葉底から放射状に4分割した葉片（葉面積約30 cm²）を挿し穂とした（第2-1図）。分割葉片を育苗箱（34.5 × 27.0 × 深さ7.0 cm）に挿し、適度な湿度を保つため最初の1週間はポリエチレンフィルムで箱を覆い、その後外した。各区10葉片を供試して3反復した。葉挿し9～10週後、各葉片を培地から掘り上げて洗い、生存葉片数、不定芽、カルスおよび根を形成した葉片数を調査した。なお、不定芽を形成した葉片では高さ5 mmほどの不定芽が1個あるいは2個、およびその基部には小さい芽や腋芽が多数着生しており、不定芽数を正確に数えることができなかったため、ここでは不定芽を形成した葉片の割合のみを記録した。母株および葉挿しは冬季最低15℃に維持したプラスチックハウスで管理し、5月上旬から10月下旬までは自然光の60%遮光を行った。実験中のプラスチックハウスにおける外気温の変動を第2-2図に示した。なお、第2節および第3節の実験については後述のとおりである。

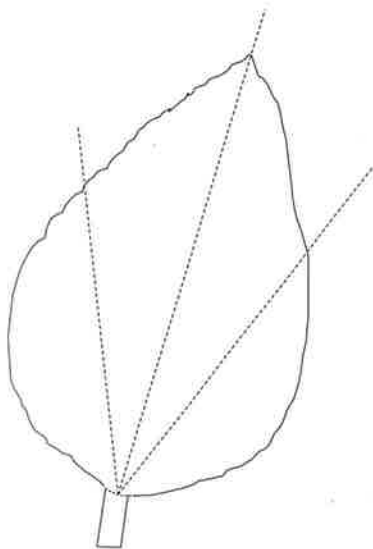


Fig. 2-1. Leaf pieces used for leaf cutting. An expanded young leaf blade was cut into four pieces radially from the junction with the petiole, and each piece was used in experiments.

第1節 挿し床の培地、葉挿しの時期および温度と不定芽形成

一般に、挿し木用土は挿し穂の支持と挿し穂への水分および酸素の供給という役割を担っており、赤玉土、川砂、鹿沼土、バーミキュライト、パーライト、ロックウールなどが用いられている（林，1997）。ここでは、根茎性ベゴニアの葉挿し繁殖でしばしば用いられるバーミキュライトとパーライトの他、花木類の茎挿しなどで用いられるロックウールのプレート状のものおよび粒状のもの、さらに多孔質で団粒構造に富む鹿沼土の5種類の培地を供試し、球根ベゴニアの不定芽形成について比較した。

葉挿しの時期および温度に関する研究は、クリスマスベゴニアを用いた Heide (1962, 1964, 1965a, 1965b, 1967) による一連の実験に示されるが、球根ベゴニアに関する報告は皆無である。温周性および光周性をもつ球根ベゴニアにおいては、葉挿しによる不定芽形成にも周期性を示すと思われる。本節では、4期にわたって葉挿しを行い不定芽形成に及ぼす季節の影響を調べたうえで、種々の温度下で葉挿しを行い、不定芽形成のための適温を知ろうとした。

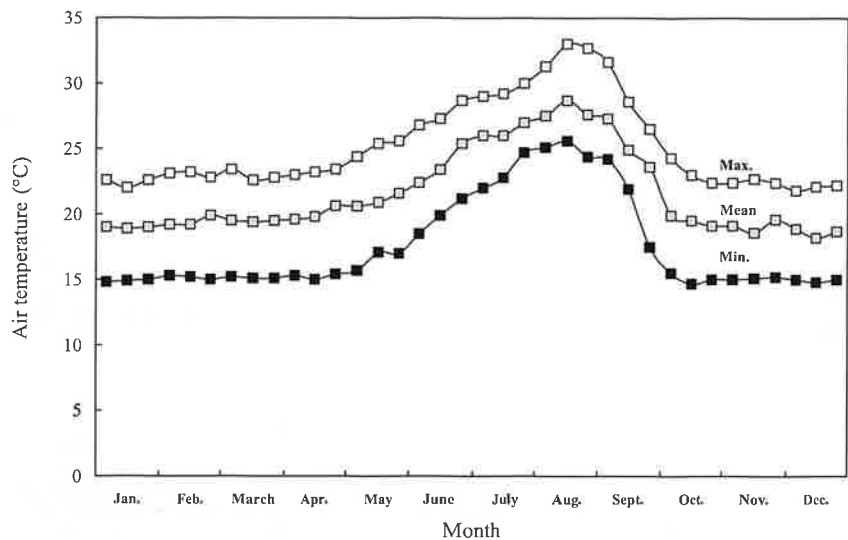


Fig. 2-2. Maximum, minimum and mean air temperatures in a plastic house during the experiments.

1-1. 培地の種類が不定芽形成に及ぼす影響

材料および方法

挿し穂の母株には約6か月齢の実生株を供試した。培地としてパーライト、鹿沼土、バーミキュライト、ロックウール粒状綿（42R、日東紡績株式会社）およびロックウール成形物（32×24×高さ5cm、日東紡績株式会社）の5種類を用い、これらを前述の育苗箱に詰め、5月20日に第2-1図に示す1/4分割葉片を挿した。葉挿し10週後に形態形成の様相を調査した。

結 果

生存率は、パーライト、鹿沼土、バーミキュライトおよびロックウール粒状綿培地でそれぞれ43、40、60および53%であったのに対し、ロックウール成形物培地では77%で高かった（第2-1表）。また、不定芽形成率は、パーライト、鹿沼土、バーミキュライトおよびロックウール粒状綿培地でそれぞれ7、7、13および20%であったのに対し、ロックウ

ル成形物培地では50%で高かった。なお、いずれの培地においてもカルスのみあるいは根のみを形成する個体があったが有意な差はみられなかった。

1-2. 葉挿し時期が不定芽形成に及ぼす影響

材料および方法

挿し穂の母株には11月下旬に播種して栽培した実生株を供試した。4月8日、5月20日、7月29日および10月13日に1/4分割葉片を第1-1節の実験と同様のロックウール成形物に挿した。なお、使用した母株の展開葉枚数はそれぞれ7、9、11および15枚であった。葉挿し9週後に形態形成の様相を調査した。

結 果

生存率は、4月、5月および10月挿しはそれぞれ73、77および63%であったのに対し、7月挿しでは40%で低かった（第2-2表）。また、不定芽形成率は4月、5月および10月挿しでそれぞれ67、50

Table 2-1. Effects of propagation medium on adventitious bud formation of leaf pieces.

Medium	Surviving percentage	Percentage of organ formation			
		Adventitious buds	Only calli	Only roots	No change
Kanuma soil	40 a	7 a	7 a	26 a	0
Perlite	43 a	7 a	10 a	26 a	0
Rock fiber (Rockwool granule)	53 a	20 a	10 a	23 a	0
Rockwool block	77 b	50 b	7 a	20 a	0
Vermiculite	60 ab	13 a	10 a	37 a	0

Leaf pieces (n=10) were inserted in various media on 20 May. Three replicates were used for each treatment. Mean separation within a column followed by Tukey's multiple range test, $P=0.05$.

Table 2-2. Seasonal changes in adventitious bud formation of leaf pieces.

Date	Surviving percentage	Percentage of organ formation			
		Adventitious buds	Only calli	Only roots	No change
8 April	73 b	67 b	0 a	6 a	0
20 May	77 b	50 b	7 a	20 b	0
29 July	40 a	13 a	7 a	20 b	0
13 October	63 b	60 b	0 a	3 a	0

Leaf pieces (n=10) were inserted in rockwool blocks on various date. Three replicates were used for each treatment. Mean separation within a column followed by Tukey's multiple range test, $P=0.05$.

Table 2-3. Effects of the temperature on adventitious bud formation of leaf pieces.

Temperature (°C)	Surviving percentage	Percentage of organ formation			
		Adventitious buds	Only calli	Only roots	No change
15	97 b	50 c	10 a	37 b	0
20	97 b	43 bc	7 a	47 bc	0
25	87 b	27 b	3 a	57 c	0
30	23 a	0 a	7 a	16 a	0

Leaf pieces (n=10) were inserted in rockwool blocks. Three replicates were used for each treatment. Mean separation within a column followed by Tukey's multiple range test, $P=0.05$.

および60%であったのに対し、7月挿しでは13%で低かった。なお、いずれの時期に挿しても不定芽を形成しない葉片は根のみを形成するものが多く、5月挿しと7月挿しの葉片における根のみの形成率が有意に高くなった。

1-3. 葉挿し時の温度が不定芽形成に及ぼす影響

材料および方法

挿し穂の母株には約6.5か月齢の実生株を供試した。6月4日に1/4分割葉片を第1-1節の実験と同様のロックウール成形物に挿し、15、20、25および30°Cの恒温機（NKシステム LP-300D, 日本理科機器株式会社）で管理した。葉挿し9週後に形態形成の様相を調査した。

結 果

生存率は、15、20および25°Cの場合にそれぞれ97、97および87%であったのに対し、30°Cでは23%で低かった（第2-3表）。また、不定芽形成率は15°Cが50%で最も高く、生存葉片の過半数が不定芽を形成したが、温度が高くなるにしたがって低下した。30°Cでは不定芽を形成する葉片が全くなかった。なお、いずれの温度下で挿しても不定芽を形成しない葉片は根のみを形成するものが多かった。

第2節 挿し穂の部位および大きさと不定芽形成

実際栽培において、レックスベゴニアのような葉の大きな品種では、葉身をいくつか分割した葉片が挿し穂として用いられ、葉の小さな根茎性ベゴニアの他の品種、あるいはクリスマスベゴニアおよび

エラチオールベゴニアでは葉柄をつけた全葉挿しが行われている（Thompson・Thompson, 1981）。繁殖効率を高めるには、葉を小さく切り詰めて多数の葉片を利用するのが望ましいが、*in vitro*での培養とは異なり、培地からの糖および植物成長調節物質の供給がないため、小さい挿し穂は育たない可能性がある。そこで、本節では挿し穂の大きさを小さくできるかどうか、また葉柄の必要性など、挿し穂の部位および大きさと不定芽形成との関係について検討した。

なお、本節では、前節で用いた‘クリップス・イエロー’と比べて1株により多くの葉をつけ均一な材料を用意しやすい‘ティネラ・ピンク’を供試した。

材料および方法

挿し穂の母株には‘ティネラ・ピンク’の約1年4か月齢の実生株を供試した。7月20日に、葉柄5mmをつけて葉身全体を切り取った葉柄つき全葉（葉身の長さ約13cm、幅約4.5cm）、その全葉の葉身部を5×4cmあるいは2×1.5cmに切り詰めた葉柄つき小葉片、葉柄を切り離して葉身を2×1.5cmに切り詰めた小葉片、および葉底から2cm離れた位置で葉先に向かって切り出した2×1.5cm小葉片の5種類を挿し穂とした（第2-3図）。挿し床の培地には第1節で用いたロックウール成形物と同じ材質で小型のロックファイバーミニポット（M25S30, 日東紡績株式会社、第2-4図）を用い、これを入れたプラスチック容器（10×15×深さ5cm）の底面に蒸留水250mlを注いで給水し、完全には密閉しない状態で蓋をした。なお、ロックファイバーミニポットの最大保持水分量は約91%であった。25/15°C（昼温/夜温）に設定した50%遮光のガラス温室で管理し、葉挿し6週後に形態形成を調査した。各区5葉片を供試して3反復した。

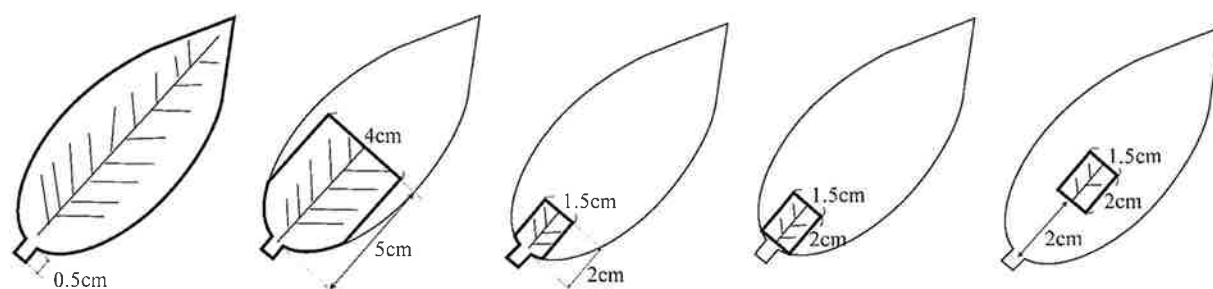


Fig. 2-3. Position and size of leaf piece cut from leaf blade.

結 果

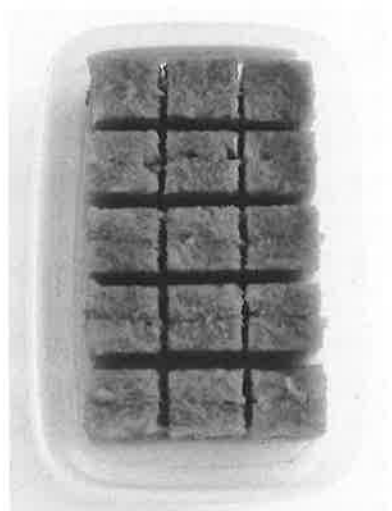


Fig. 2-4. Rockwool block (Brand name: rock fiber miniport) used in experiments.

生存率は葉柄の有無に大きく左右された。すなわち、葉身の大きさにかかわらず、葉柄をつけた挿し穂のほとんどが生存したのに対し、葉柄をつけない 2×1.5 cm の小葉片では切り口からの褐変が進んで枯死するものが多く、生存率は、葉柄をつけずに葉底を含む小葉片で 47%、葉底から 2 cm 離れた位置の小葉片で 60% と、葉柄付きの挿し穂と比べて低かった (第 2-4 表)。

全葉挿しでは 73% の挿し穂で不定芽形成がみられたが、他の挿し穂では発根はみられたものの、不定芽形成は全く認められなかった。カルス形成、あるいは変化なしの葉片はわずかにあった。

Table 2-4. Effects of size and position of leaf piece, and presence of petiole on adventitious bud formation.

Type of leaf piece	Surviving percentage	Percentage of organ formation			
		Adventitious buds	Only calli	Only roots	No change
Whole leaf blade with 5 mm petiole	100 b	73 b	0 a	27 a	0 a
5×4 cm leaf piece with 5 mm petiole	87 b	0 a	7 a	73 bc	7 a
2×1.5 cm leaf piece with 5 mm petiole	93 b	0 a	0 a	93 c	0 a
2×1.5 cm leaf piece cut at leaf base without a petiole	47 a	0 a	0 a	47 ab	0 a
2×1.5 cm leaf piece cut at 2 cm away from a leaf base	60 a	0 a	0 a	47 ab	13 a

Different types of leaf pieces ($n=5$) were inserted in rockwool blocks. Three replicates were used for each treatment. Mean separation within a column followed by Tukey's multiple range test, $P=0.05$.

第3節 小葉片挿しにおける不定芽形成の品種間差異

考 察

第2節において、小葉片挿しのときに不定芽形成がみられなかったが、この現象は球根ペゴニアの他の品種にも共通して起こるのかどうかを知るため、球根ペゴニア5品種について、小葉片挿しにおける不定芽形成について比較した。

材料および方法

挿し穂の母株には5品種‘クリップス・イエロー’、‘ヒロシマNo.1’、‘パノラマ・オレンジ’、‘ティネラ・ピンク’および‘イエロー・スウィーティ’の約1年6か月の実生株を用いた。10月5日に、葉柄5mmをつけ葉身を2×1.5cmに切り詰めた小葉片を作って挿し穂とし、第2節の実験と同様の方法で葉挿しした。なお、母株の栽培および葉挿しは25/15°C(昼温/夜温)に設定したガラス温室で行い、メタルハイドランプ(MF400・L-J2/BU-P, 東芝ライテック株式会社, PPFD約150 μmol・m⁻²・s⁻¹)を用いて早朝と夜間に明期を延長し、18時間日長とした。各区5小葉片を供試して3反復した。

結 果

生存率は品種により33～80%で差があったが、不定芽形成率は全品種で0%であった(第2-5表)。
‘イエロー・スウィーティ’のカルス形成率は40%、
‘ティネラ・ピンク’の発根率は67%で、他の品種よりも高い傾向がみられた。

一般に、好適な繁殖用培地には、通気性、透水性および保水性が求められる(Hartmanら, 1997)。本実験で用いた種々の培地、すなわちパーライト、鹿沼土、バーミキュライト、ロックウール粒状綿およびロックウール成形物はいずれもこれらの性質を十分に満たしており、種々の植物の挿し木苗生産において広く利用されているものであった。しかし、前者4種類の培地では、球根ペゴニア葉片の生存率は40～60%にとどまったのに対し、ロックウール成形物では77%とより高い値を示した。ロックウールは有機物を一切含まない無菌素材で清潔であり、大部分が空隙で培養液や空気を保持し、それを作物の根へ供給できる構造となっていることから、バラやポインセチアをはじめとする多くの植物の栽培培地として利用されている(Smith, 1989)。球根ペゴニアの葉片にとっても、保水性および通気性という点から、最も適した培地であると考えられた。また、狩野ら(1992)は *Stephanotis floribunda* の発根を促す挿し木用土としてロックウールが適していることを報告している。本実験の結果、不定芽形成率についてもロックウール成形物で50%と他の用土よりも高かったことから、茎挿しなどの発根を促すのに適しているばかりでなく、不定芽形成にも有効であることが分かった。

時期を変えて葉挿しを行ったところ、不定芽形成率は4月8日挿しで67%と最も高く、次いで10月13日挿しの60%、5月20日挿しの50%が続き、7月23日挿しではわずか13%と低かった。球根ペゴニアは長日植物で、長日下で成長と開花が促進され、短日下では休眠に入り球根形成が促進されることが知られているが(Djurhuus, 1985;

Table 2-5. Adventitious bud formation in leaf pieces of five cultivars of *Begonia* Tuberhybrida Group.

Cultivar	Surviving percentage	Percentage of organ formation			
		Adventitious buds	Only calli	Only roots	No change
Clips Yellow	33 a	0	7 a	7 a	19 ab
Hiroshima No.1	47 a	0	7 a	0 a	40 c
Panorama Orange	67 b	0	27 ab	7 a	33 bc
Tenella Pink	80 b	0	7 a	67 b	6 a
Yellow Sweetie	80 b	0	40 b	0 a	40 c

2×1.5 cm leaf pieces (n=5) with petioles were inserted in rockwool blocks. Three replicates were used for each cultivar. Mean separation within a column followed by Tukey's multiple range test, *P*=0.05.

Fonteno・Larson, 1982; Heide・Rünger, 1985; Lewis, 1951; Oloomi・Payne, 1982), 4月8日から9週間の平均日長は13時間37分, また10月13日から9週間の平均日長は10時間23分であったことから, 4月と10月とを比較すれば4月の方が球根ベゴニアの成長および開花には適している。しかし, 不定芽形成率には4月8日挿しと10月13日挿しで有意な差がみられなかったことから, 日長は不定芽形成に対し影響しないものと考えられた。Powell・Buant (1980) は, 絶対的短日植物であるとされるエラチオールベゴニア (Heide・Rünger, 1985) について, 不定芽形成は日長の影響を受けなかったが, シュートの発達には不定芽形成後の長日条件が促進的に作用したと報告している。本実験の球根ベゴニアにおいても, 形成された不定芽についてさらに観察を続ければ, その後長日下でシュートの発達が促進され, 短日下では休眠および球根を形成するかもしれない。なお, 本実験では供試した母株および挿し穂はともに同条件で季節の影響を受けており, この点については第4章で詳しく調べることにする。

4月, 5月, 7月および10月の葉挿し開始時における平均気温はそれぞれ19.6°C, 21.6°C, 27.0°Cおよび19.5°C (第2-2図), すなわち4月および10月の平均気温は同程度で, 5月および7月のそれよりも低かった。不定芽形成率は4月および10月挿しが5月および7月挿しよりも高かったことから, 不定芽形成には日長よりも温度の影響が強いものと考えられた。そこで, 15°C, 20°C, 25°Cおよび30°Cと葉挿しの温度を変えた結果, 15°Cおよび20°Cで不定芽形成率が最も高くなることが分かった。本実験では15°C以下の温度を設けなかったが, 球根ベゴニアは12°Cでは生育が阻害される (Djurhuus, 1985) ことから, 不定芽形成が12°Cで高まるとは考えにくく, 不定芽形成の適温は15~20°C付近にあると考えられた。なお, クリスマスベゴニアの場合, 不定芽形成を促進する条件は, 花芽分化を誘導する条件と同じ15~18°Cの低温と短日であり (Heide, 1962, 1964, 1965a, 1965b; Heide・Rünger, 1985), Heide (1967) によると, このとき葉中の内生サイトカイニンに対する内生オーキシンの割合が低いとされている。Zieslinら (1984) は, クリス

マスベゴニアについて, 葉中のサイトカイニン様物質の活性を測定した結果, 21°Cまたは24°Cで栽培した母株の葉よりも18°Cで栽培した母株の葉においてその活性が高かったことを報告し, さらにHansenら (1988) は, 温度と日長を変えて栽培した母株の葉から4種類のサイトカイニン類を抽出した結果, 24°Cで栽培した母株よりも, 不定芽形成の適温である15°Cで栽培した母株の葉の方がサイトカイニン量が数倍多かったことを報告している。球根ベゴニアの場合も, 不定芽形成の適温は花芽分化の適温 (Djurhuus, 1985) と同様の15~20°Cにあり, このとき内生ホルモンのバランスがそれらの器官分化に好適であったのであろう。このことから, 内生ホルモンのバランスを制御することができれば不定芽形成を誘導できると思われ, 外生的に植物成長調節物質を処理することが有効ではないかと推察された。この点に関しては第3章で詳細に追求したい。

第2節において, 挿し穂の部位および大きさと不定芽形成との関係について検討した結果, 全葉挿しの場合のみ不定芽形成が73%でみられ, それより小さな葉片になると不定芽は全く形成されなかった。不定芽形成には葉中の養分および植物ホルモンが大きく影響しているのであろう。また, 葉柄をつけない小葉片では切り口からの褐変が進み, 生存率が低下した。これについては, 第3章で小葉片挿しにおける生存率の向上を目指すことにする。

小葉片挿しで不定芽の形成がみられないのは, 球根ベゴニアの他の品種にも共通した現象であるかどうかを調べるため, 第3節では球根ベゴニア5品種について, 葉柄つき2×1.5 cmの小葉片における不定芽形成を比較した。その結果, いずれの品種も不定芽を形成しなかったことから, 球根ベゴニアでは品種に関係なく, 小葉片挿しによる繁殖が極めて難しいことが分かった。

本章より, 球根ベゴニアの葉挿し繁殖では, 挿し床の培地にロックウールを用いるとよいこと, 不定芽形成の適温は15~20°C付近にあることが分かった。また, 全葉挿しでは不定芽形成が約70%でみられるものの, 小葉片挿しでは品種に関係なく, 不定芽は全く形成されないことが示された。

第3章 植物成長調節物質処理が小葉片挿しにおける不定芽形成に及ぼす影響

第2章より、葉柄をつけない小葉片の場合、より大きな挿し穂と比べて生存率は低く、また不定芽は全く形成されなかった。しかし、大量増殖を目指すためには、1枚の葉身から多くの小葉片を採取し、不定芽形成を促して個体再生を得る必要がある。

一般に、植物組織培養においては、細胞の分裂および伸長を助けるために培地に植物成長調節物質が添加され、芽の発達を促すにはサイトカイニン類であるカイネチンやBAが、発根やカルス形成を促すにはNAAやIBAが使用されることが多い(細木, 1997)。Ex vitroでの葉挿しにおいても、小葉片を用いる場合には培地への植物成長調節物質の添加が効果的ではないかと考えられる。

Harris・Hart(1964)は、*Peperomia sandersii*の葉片挿しにおいて、まず不定根原基が形成され、その不定根の発生部位から不定芽が生じること、不定根を除去した場合には不定芽は形成されないことを報告している。不定芽形成と発根との関係は植物の種類によって異なるであろうが、球根ベゴニアの小葉片挿しにおいても、速やかに不定根の発生を促し、後で不定芽形成を促すことができれば好都合である。

本章第1節では、小葉片挿しにおける植物成長調節物質処理による不定芽形成の促進を検討し、その際、葉挿し中に発生する小葉片の黄化と褐変が問題となったため、第2節でその現象に関与する要因と防止法について検討した。

共通の材料および方法

種子から栽培した球根ベゴニア‘ティネラ・ピンク’を供試し、挿し穂には完全に展開した若い葉を用い、各実験に示す種々の形状に切断した。特に記述がない限り、挿し床の培地にはロックウール成形物(商品名:ロックファイバーミニポットM25S30, 日東紡績株式会社, 第2-4図参照)を用い、これを入れたプラスチック容器(10×15×深さ5cm)の底面に培養液250mlを注いで給水し、完全には密閉しない状態で蓋をした。なお、ロックファイバーミニポットの最大保持水分量は約91%であった。葉挿し6週後に小葉片を培地から引き抜き、生存小葉片数、不定芽、カルスおよび根を形成した小葉片数を調査した。小葉片基部には高

さ3mmほどの不定芽を複数形成するものがあったが、その基部には腋芽や小さい芽が多数着生しており、不定芽数を正確に数えることができなかったため、ここでは不定芽を形成した葉片の割合のみを記録した。母株の栽培および葉挿しは各実験に示す温度設定のガラス温室で行い、メタルハライドランプ(MF400・L-J2/BU-P, 東芝ライテック株式会社, PPFD約150 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)を用いて早朝と夜間に明期を延長し、18時間日長とした。5月上旬から9月下旬までの晴天時には自然光の50%遮光を行った。各区5小葉片を供試して3反復した。

第1節 NAA および BA 処理と不定芽形成

球根ベゴニアの葉片培養に関する研究報告によると、Peck・Cumming(1984)が5ppmBAと1ppmNAA、飯田ら(1986)が1ppmBAと1ppmNAA、Nakanoら(1999)が0.1ppmBAと0.1ppmNAAの植物成長調節物質を初代培地に添加している。一方、シクラメンの分割塊茎を用いた培養においては、0.01ppmのNAA処理が不定芽形成を促すことが報告されている(富士原, 1968)。このシクラメン塊茎からの器官形成について、Stichel(1959)は、NAAのみが芽または根を分化させる選択的能力をもつと述べている。

本節では、不定芽形成に対するNAAおよびBA処理の効果、ならびにそれらを組み合わせた処理の影響について検討した。またBA処理についてはその処理期間の影響を調べた。

1-1. NAA 処理濃度が生存率および不定芽形成に及ぼす影響

材料および方法

挿し穂の母株には約2年輪の実生株を用いた。3月22日に、葉柄5mmをつけ葉身を2×1.5cmに切り詰めた小葉片を作り、挿し穂とした。培養液には、0、0.01、0.1、0.25および0.5ppmのNAA(α -naphthalene acetic acid)溶液を用いた。25/15°C(昼温/夜温)に設定したガラス温室で管理し、葉挿し開始から1週間隔で生存率を調査するとともに、6週後におけ

る生存率および形態形成の様相を調査した。

結 果

葉挿し6週後の生存率はNAA無添加培地で87%, 0.01 ppm NAA 培地で73%であったが, NAA濃度が0.1 ppm 以上になるとすべての小葉片が枯死した(第3-1表)。生存した小葉片についてみると, NAA無添加培地では, 発根のみの小葉片が60%, 変化なしの小葉片が27%であったが, NAA 0.01 ppm 培地ではすべての小葉片で発根がみられた。しかし, いずれの培地においても不定芽を形成する小葉片は全くなかった。

NAA濃度が0.1 ppm 以上の培地では, 葉挿し約3週後から小葉片の黄化がみられ, 6週後にはすべての小葉片が褐変, 枯死した(第3-1図)。特に, NAA 0.5 ppm 培地で黄化の程度が著しく, より早期に枯死した(第3-2図)。

1-2. BA 処理濃度が生存率および不定芽形成に及ぼす影響

材料および方法

挿し穂の母株には約1年11か月齢の実生株を用いた。3月26日に, 葉柄を切り離し, 葉底と主脈を含んで葉身を2×1.5 cmに切り詰め, 挿し穂用の小葉片を作った。培養液には, 0, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1 および2 ppm のBA (6-benzylaminopurine) 溶液を用いた。25/15°C (昼温/夜温) に設定したガラス温室で管理した。

結 果

生存率は, BA無添加培地で73%, 0.05 ppm BA 培地で87%であったが, BA濃度が0.1 ppm 以上になるとすべてで100%となった(第3-2表)。不定芽

Table 3-1. Effects of NAA concentration on surviving percentage and organ formation of leaf pieces.

Concentration of NAA (ppm)	Surviving percentage	Percentage of organ formation			
		Adventitious buds	Only calli	Only roots	No change
0	87 c	0	0	60 a	27 b
0.01	73 b	0	0	73 a	0 a
0.1	0 a	—	—	—	—
0.25	0 a	—	—	—	—
0.5	0 a	—	—	—	—

2 × 1.5 cm leaf pieces with petioles (n=5) were inserted in rockwool blocks containing NAA of various concentrations. Three replicates were used for each treatment. Mean separation within a column followed by Tukey's multiple range test, $P=0.05$.

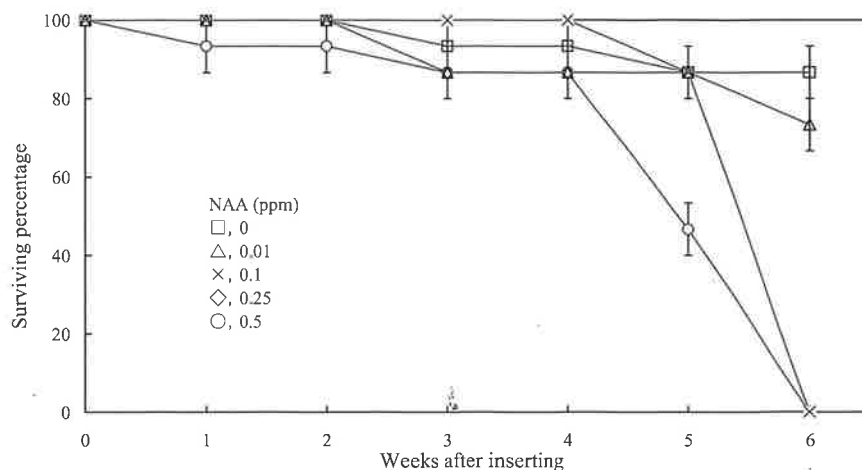


Fig. 3-1. Effects of NAA concentration on surviving percentage of leaf pieces. Vertical bars indicate standard errors (n=3).



Fig. 3-2. Leaf pieces inserted in rockwool blocks containing 0.5 ppm NAA (left) or not (right) for five weeks.



Fig. 3-3. Leaf pieces inserted in rockwool blocks containing 0.5 ppm BA (left) or not (right) for six weeks.

Table 3-2. Effects of BA concentration on surviving percentage and organ formation of leaf pieces.

Concentration of BA (ppm)	Surviving percentage	Percentage of organ formation			
		Adventitious buds	Only calli	Only roots	No change
0	73 a	0 a	0 a	73 b	0 a
0.05	87 b	20 a	7 a	60 b	0 a
0.1	100 c	20 a	0 a	67 b	13 b
0.25	100 c	80 b	20 b	0 a	0 a
0.5	100 c	80 b	20 b	0 a	0 a
1.0	100 c	80 b	20 b	0 a	0 a
2.0	100 c	80 b	20 b	0 a	0 a

Basal 2 × 1.5 cm leaf pieces without petioles (n=5) were inserted in rockwool blocks containing BA of various concentrations. Three replicates were used for each treatment. Mean separation within a column followed by Tukey's multiple range test, $P=0.05$.

形成は BA 無添加培地では全くみられず、0.05 ppm BA 培地および 0.1 ppm BA 培地では 20% でみられたが、その大部分は発根のみであった。BA 濃度が 0.25 ppm 以上のとき、不定芽形成率は 80% となり、他と比べて有意に高かった。

BA 無添加培地の小葉片は脱緑するとともに、切り口からの褐変が進んで小葉片全体が褐変、やがて枯死するものがあったが、BA 添加培地の小葉片では緑色が保たれて褐変はみられなかった(第 3-3 図)。

1-3. BA と NAA の組み合わせ処理が不定芽形成に及ぼす影響

材料および方法

挿し穂の母株には約 1 年 11 か月齢の実生株を用いた。7 月 19 日に、葉柄を切り離し、葉底と主脈を含んで葉身を 2 × 1.5 cm に切り詰め、挿し穂用の

小葉片を作った。培養液には、0.5 ppm BA と NAA の濃度を 0, 0.1, 0.25 および 0.5 ppm と変えて混合した溶液を用いた。25/15°C (昼温/夜温) に設定したガラス温室で管理した。

結 果

0.5 ppm BA に加えた NAA の濃度に関係なく、生存率は 93% 以上で、また生存した小葉片すべてが不定芽を形成した(第 3-3 表)。長さ 4 mm 以上に伸長したシュート数は、NAA 無添加培地と 0.1 ppm NAA 培地で他の培地よりも多く、これより NAA の濃度が高くなると減少した。逆に、カルス重は、NAA 無添加培地で 0.07 g であったが、NAA 濃度が高くなるにしたがって増加し、0.5 ppm NAA 培地で 0.15 g となった。なお、第 3-4 図に NAA 無添加培地および 0.5 ppm NAA 培地における不定芽形成とカルスの様相を示したが、NAA を添加した場合に

Table 3-3. Effects of NAA concentration added to 0.5 ppm BA on adventitious bud formation of leaf pieces.

Concentration of NAA	Surviving percentage	Percentage of adventitious buds formation	Number of shoots ($\geq 4\text{mm}$)	Fresh weight of calli (g)
0	100 a	100 a	2.0 c	0.07 a
0.1	100 a	100 a	1.8 c	0.11 ab
0.25	100 a	100 a	1.6 b	0.18 b
0.5	93 a	93 a	1.2 a	0.15 b

Basal 2×1.5 cm leaf pieces without petioles ($n=5$) were inserted in rockwool blocks containing NAA of various concentrations with 0.5 ppm BA. Three replicates were used for each treatment. Mean separation within a column followed by Tukey's multiple range test, $P=0.05$.

カルス形成が発達し、芽の発達が抑制される傾向にあった。

1-4. BA 処理期間が不定芽形成に及ぼす影響

材料および方法

挿し穂の母株には約 1 年 8 か月齢の実生株を用いた。11 月 19 日に、葉柄 5 mm をつけ葉身を 2×1.5 cm に切り詰めた小葉片を作り、挿し穂とした。それらの小葉片を 0.5 ppm BA を添加したロックファイバーミニポットに挿し、1, 2, 4, 8 および 11 日後に、

蒸留水のみを与えた培地に挿し替えた。0.5 ppm BA 連続区も設けた。25/15°C (昼温/夜温) に設定したガラス温室で管理し、葉挿し開始 6 週後に葉柄切り口における形態形成の様相を調査した。形成された不定芽はその発達状態から、ステージ I (芽原基)、II (未展開の葉をもつ芽)、III (展開葉をもつ芽) として分類し記録した (第 3-5 図)。

結 果

生存率はすべての処理区で 93% 以上であった (第 3-4 表)。不定芽および根の両方を形成した小葉片は、



Fig. 3-4. Adventitious buds induced by 0 ppm NAA and 0.5 ppm BA (left); calli induced by 0.5 ppm NAA and 0.5 ppm BA (right).

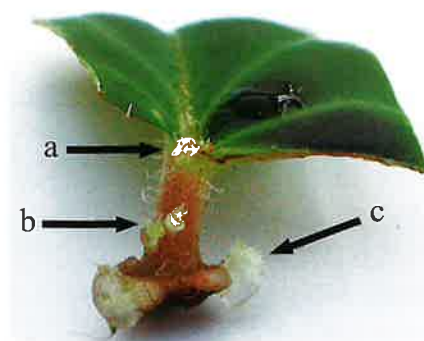


Fig. 3-6. Adventitious buds formed on leaf base (a), petiole (b) and cut end of petiole (c).



Fig. 3-5. Developmental stages of adventitious bud. Stage I, bud primordium (left); Stage II, bud with unexpanded leaves (middle); Stage III, bud with expanded leaves (right).

Table 3-4. Effects of days of BA application on adventitious bud formation of leaf pieces.

Days of BA application	Surviving percentage	Percentage of organ formation			Stage of adventitious bud ^z (%)		
		Adventitious buds and roots	Only adventitious buds	Only roots	I	II	III
0	93 a	0 a	0 a	93 d	0 a	0 a	0 a
1	93 a	27 a	0 a	66 c	27 ab	0 a	0 a
2	93 a	60 b	0 a	33 b	46 b	7 a	7 a
4	100 a	80 bc	0 a	20 ab	14 a	33 b	33 b
8	93 a	93 c	0 a	0 a	0 a	40 b	53 b
11	100 a	100 c	0 a	0 a	7 a	53 bc	40 b
continued	93 a	0 a	93 b	0 a	13 a	73 c	7 a

2 × 1.5 cm leaf pieces with petioles (n=5) were transferred from 0.5ppm BA solution to distilled water. ^z Stage I, bud primordium; II, bud with unexpanded leaves; III, bud with expanded leaves. Organ formation was investigated six weeks after inserting. Three replicates were used for each treatment. Mean separation within a column followed by Tukey's multiple range test, $P=0.05$.

BA 無処理区で0%であったが、BA 処理期間が長くなると増加し、BA 1日処理区で27%、2日処理区で60%、4日処理区で80%、8日処理区で93%、11日処理で100%となった。BA 連続処理区では葉挿し6週後に不定根は認められず、不定芽のみの形成率が93%となった。なお、その後、発達した不定芽個体の基部から発根が確認された。BA0～11日処理区において不定芽を形成しなかった小葉片はすべて根のみを形成し、根は葉柄切り口から生じていた。

形成された不定芽の発達ステージはBA4～11日処理区で最も進み、展開葉をもつ芽（ステージⅢ）が多く確認されたが、BA 連続処理区では不定芽形成数が増える反面、個々の芽の発達は若干遅れ、未展開葉をもつ芽（ステージⅡ）が多かった。

なお、第3-6図には、BA 連続処理区における葉挿し4週後の形態形成の様相を示したが、葉柄基部に不定芽原基（c）が形成された他、葉底（a）および葉柄（b）上にも不定芽が観察された。

第2節 NAA 処理による黄化とクロロフィル含量およびエチレン生成との関係、ならびに BA 処理による褐変抑制とポリフェノール含量との関係

第1節より0.1 ppm以上のNAAを培地に添加すると葉片が著しく黄化することが分かったが、一般に、葉の黄化は、クロロフィルからクロロフィリド、フェオフォルバイドを経て無色の低分子化合物

となるクロロフィル分解を介して起こる老化現象として捉えられ（Vicentiniら、1995）、クロロフィル分解にはエチレンが促進的に作用していることが多い（兵藤、1994）。例えば、ブロッコリー小花の黄化に伴ってエチレン生成速度が増加することが示されている（Makhloufら、1989; Tianら、1994; Yamauchi・Watada、1998）。また、エチレン生成は組織が傷害を被ったときに増加する（兵藤、1994）として知られている他に、オーキシン処理によっても誘導されることがあり（Beyer・Morgan、1970; 大宮・土師、2001）、球根ベゴニアにおいても、小葉片の黄化、エチレン生成およびNAA処理は相互に関係しているのではないかと推察された。

一方、エチレン生成はサイトカイニン処理により減少するとの報告（Morら、1983; Cookら、1985; Yamaneら、1997）もあり、第1節においてBA培地で小葉片の黄化が全くみられなかった結果を支持するものと考えられた。そこで本節では、球根ベゴニアにおける小葉片の黄化は、葉身を切断したときに生じる傷害エチレンが引き金になり、NAA培地でエチレン生成が増加して引き起こされているのではないかと、逆にBA培地ではエチレン生成が抑制されているのではないかと仮説を立て、NAAおよびBAを添加した培地でクロロフィルの含量とエチレン生成量を経時的に測定した。

BA培地に挿した小葉片は黄化しないだけでなく、無添加培地で発生したような小葉片の褐変もみられなかった。褐変とは、植物組織が破壊されたことに

より、液胞に存在しているポリフェノールが葉緑体およびプラスチドに存在している酵素ポリフェノールオキシダーゼ (PPO) と接触可能になり、酵素的に酸化されキノン体が生じるために起こる現象である (村田・本間, 1998)。キノン体は化学的に反応性が高く、重合、縮合、他成分との反応を経て褐色色素を形成する。本節では、葉中におけるポリフェノール含量に着目して、BA 添加培地および無添加培地における経時の変化を調べた。

2-1. NAA および BA 処理とクロロフィル含量との関係

材料および方法

挿し穂の母株には約 11 か月齢の実生株を用いた。10 月 4 日に、葉柄を切り離し、葉底と主脈を含んで葉身を 2×2 cm に切り詰め、挿し穂用の小葉片を作った。0.5 ppm NAA, 0.5 ppm BA を添加または無添加の培養液 (蒸留水) を給水したロックファイバーミニポットに小葉片を挿し、25/15°C (昼温/夜温) に設定したガラス温室で管理した。各区 18 葉片を供試して 3 反復し、葉挿し開始から 40 日後まで 10 日毎に生存率を調査した。また、葉挿し開始から 30 日後まで 10 日毎に、小葉片 10 枚を供試し、分光測色計 (DM500d, ミノルタ株) により $L^*a^*b^*$ 表色系を用いて向軸面の葉色を測定し、葉の黄化指

数 ($L^* \cdot b^* \cdot |a^*|^{-1}$) を算出した。さらに、葉挿し開始時と葉挿し 10 日後に小葉片 5 枚を供試してクロロフィル含量を測定した。クロロフィルの測定に当たっては、小葉片 1 枚約 0.15 g を 20 倍量の N, N - ジメチルホルムアミドに浸して 5°C 暗黒下で 5 日間置き、クロロフィルを抽出した。得られた抽出液 1 ml を微量高速冷却遠心機 (MRX-152, 株トミー精工) を用いて、15,000 rpm, 3°C で 5 分間遠心分離し、上清液 100 μ l に N, N - ジメチルホルムアミド 100 μ l を加えて希釈し、分光光度計 (BioSpec-1600, 株島津製作所) で波長 647 nm と 664.5 nm におけるそれぞれの吸光度を測定した。得られた吸光度を用いて、Inskeep・Bloom (1985) の計算式からクロロフィル含量を算出した。

$$\begin{aligned} \text{全クロロフィル含量 (mg/100gFW)} \\ = 17.90A(647) + 8.08A(664.5) \end{aligned}$$

結 果

植物成長調節物質無添加培地および NAA 培地において、葉挿し 20 日後から枯死する葉片が急増し、40 日後の生存率はそれぞれ 31% および 8% となった (第 3-7 図)。それに対し、BA 培地の生存率は 85% で他の培地に比べ高かった。

葉挿し開始時における黄化指数は 57 であった (第 3-8 図)。無添加培地および NAA 培地では日ごとに黄化指数が増加し、葉挿し 10 日後にはそれぞれ 63

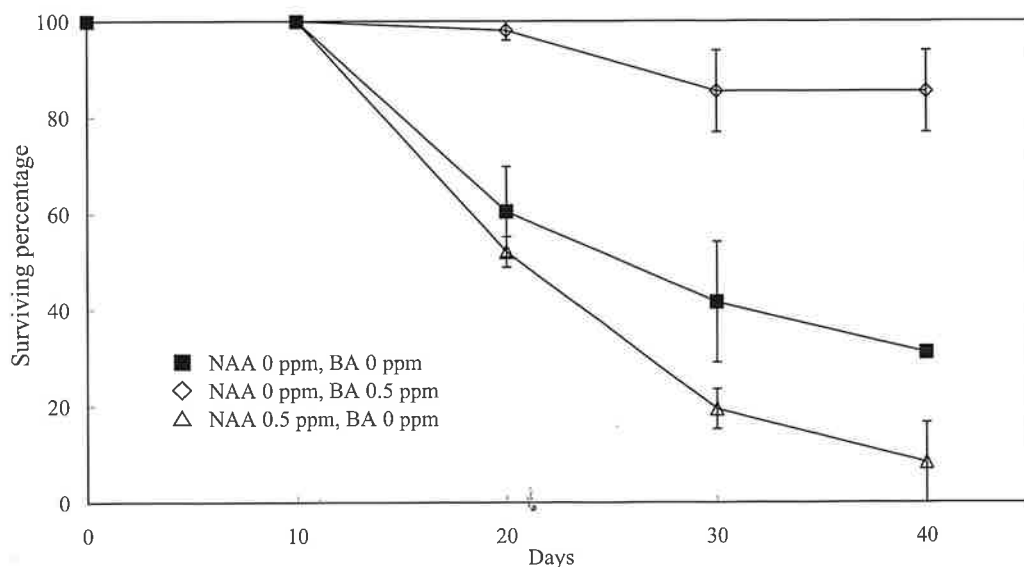


Fig. 3-7. Effects of 0.5 ppm NAA or 0.5 ppm BA on surviving percentage of leaf pieces inserted in rockwool blocks. Vertical bars indicate standard errors (n=3).

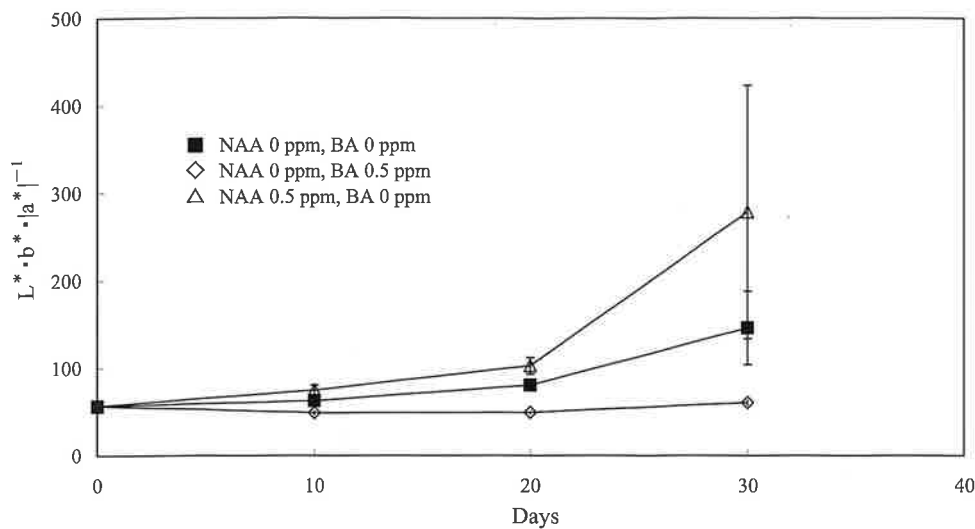


Fig. 3-8. Color changes of leaf pieces inserted in rockwool blocks containing 0.5 ppm NAA, 0.5 ppm BA, or NAA and BA free. Vertical bars indicate standard errors (n=10).

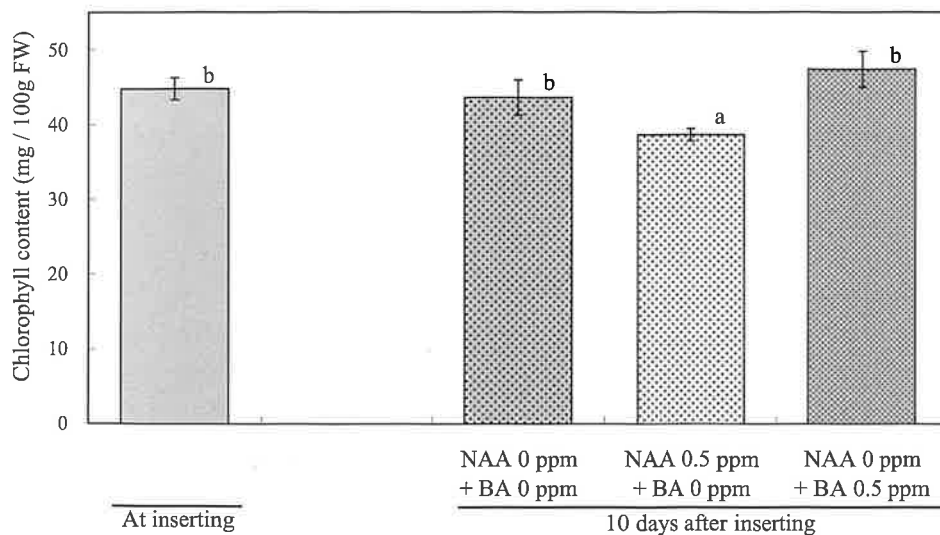


Fig. 3-9. Chlorophyll contents in leaf pieces at inserting and 10 days after inserting in rockwool blocks containing 0.5 ppm NAA, 0.5 ppm BA, or NAA and BA free. Vertical bars indicate standard errors (n=5). Tukey's multiple range test, $P=0.05$.

および75に、葉挿し30日後にはそれぞれ146および278になり、黄化が進んだ。一方、BA添加培地では、黄化指数は30日後も61とやや増加しただけであり、黄化はみられなかった。

総クロロフィル含量は、葉挿し開始時に44.8 mg/100 g FWであったが、10日後には、植物成長調節物質無添加区で43.6 mg/100 g FWに、NAA区では38.6 mg/100 g FWに減少し、BA区では47.4 mg/100 g FWとわずかに増加した（第3-9図）。

2-2. NAA処理による黄化とエチレン生成との関係

材料および方法

挿し穂の母株には約8.5か月齢の実生株を用いた。7月12日に、葉柄を切り離し、葉底と主脈を含んで葉身を2×1.5 cmに切り詰め、挿し穂用の小葉片を作った。ロックウール培地の場合にはエチレンガスがその空隙に吸着するおそれがあるため、ここでは、プラスチックシャーレ（直径9 cm、深さ1.5 cm）に0.7%寒天培地を入れ挿し床とした。0.5

ppm NAA または 0.5 ppm BA を添加, または無添加とした寒天培地に, 小葉片を 40 枚ずつ挿して蓋をし, 23°C, 16 時間日長 ($10 \mu\text{m} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ PPFD) の培養室で管理した. プラスチックシャーレの蓋には径約 2 mm の穴を開け, ミリシールを張った. 葉挿し開始から 31 日後まで経時的に, 小葉片 5 枚について, 色彩色差計 (CR-200, ミノルタ株) により $L^*a^*b^*$ 表色系を用いて向軸面の葉色を測定し, 各処理による葉の黄化指数 ($L^* \cdot b^* \cdot |a^*|^{-1}$) を計算した. さらに, 経時的に生存率を調査するとともにエチレン生成量を測定した. 各区 2 反復した. すなわち, プラスチックシャーレをビニルテープで目張りをし

て 2 時間密封し, その後注射器で 2 ml のガスサンプルを採取し, ガスクロマトグラフィー (Shimazu Gas Chromatograph GC-8A) を用いて, シャーレ内エチレン生成量を測定した. なお, N_2 をキャリアガスとして, 80 ~ 100 メッシュの活性アルミナを充填した直径 2 mm, 50 cm のガラス製カラムを使用した. 検出器には FID を用い, H_2 および空気はいずれも一次圧 6 kg/cm², 二次圧 0.6 kg/cm² とした. キャリアガスの N_2 は一次圧 6 kg/cm², 二次圧 1.2 kg/cm² としてベロー弁により流量を調整しながら流した. カラムオープン 40°C, インジェクションブロック 140°C, デテクターブロック 140°C で分析を行った.

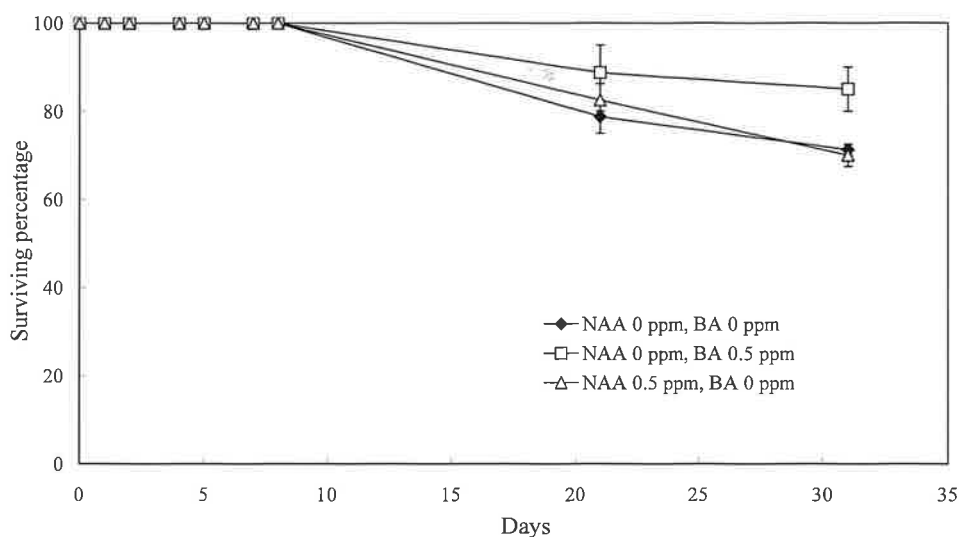


Fig. 3-10. Effects of 0.5 ppm NAA or 0.5 ppm BA on surviving percentage of leaf pieces inserted in agar media. Vertical bars indicate standard errors (n=2).

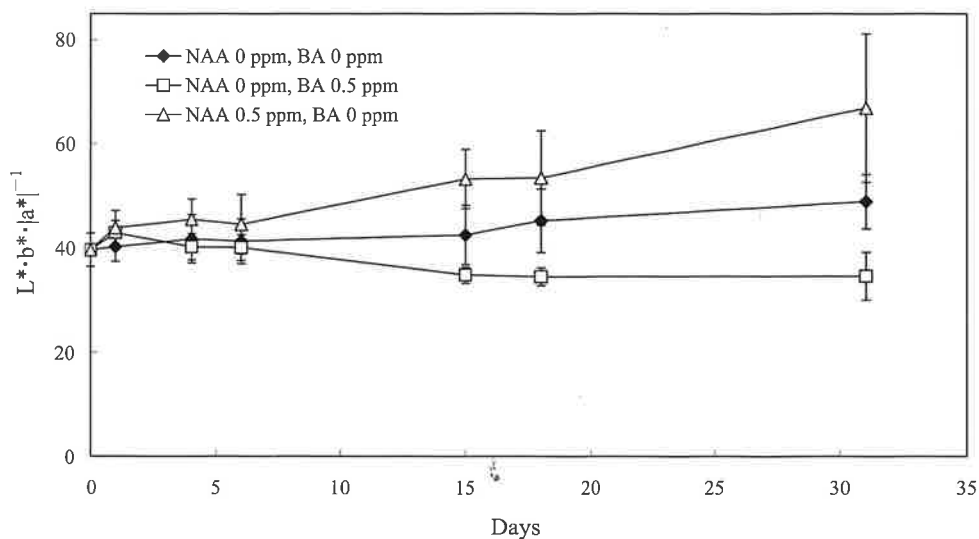


Fig. 3-11. Color changes of leaf pieces inserted in agar media containing 0.5 ppm NAA, 0.5 ppm BA, or NAA and BA free. Vertical bars indicate standard errors (n=5).

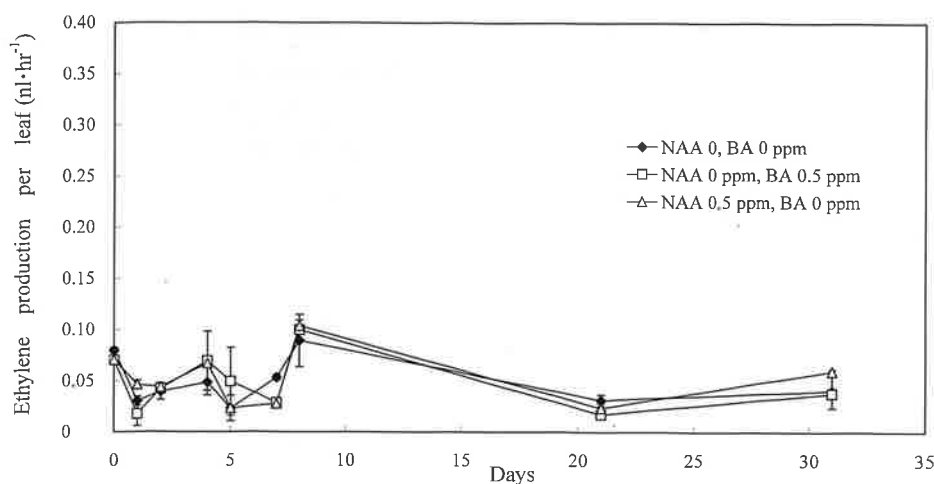


Fig. 3-12. Changes of ethylene production after inserting leaf pieces in agar media containing 0.5 ppm NAA, 0.5 ppm BA, or NAA and BA free. Vertical bars indicate standard errors (n=2).

結 果

生存率は、いずれの培地においても葉挿し 21 日後に若干低下した(第 3-10 図). 31 日後には NAA 培地および無添加培地で約 70% にまで低下したが、それに対し、BA 培地では 85% とより高い値を示した。

葉挿し開始時における小葉片の黄化指数は 40 であった(第 3-11 図). 無添加培地の小葉片では緩やかに黄化がみられ、葉挿し 31 日後には黄化指数が 49 になった。NAA 培地では葉挿し 15 日後から小葉片の黄化が著しく進み、31 日後の黄化指数は 67 と高い値を示した。それに対し、BA 培地では、葉挿し 31 日後の黄化指数は 35 で葉挿し開始時よりも低い値を示し、小葉片の黄化は全くみられず、むしろ小葉片の緑色が濃くなった。

エチレン生成量には植物成長調節物質処理による差がみられず、小葉片に切り分けてから葉挿し期間中に大きなピークはなく、1 葉片あたりのエチレン生成量は 0.1 ml 以下と極微量であった(第 3-12 図)。

2-3. BA 処理とポリフェノール含量との関係

材料および方法

挿し穂の母株には約 2 年 2 か月齢の実生株を用いた。8 月 2 日に、葉柄を切り離し、葉底と主脈を含んで葉身を 2×1.5 cm に切り詰め、挿し穂用の小葉

片を作った。0.5 ppm BA を添加または無添加の培養液(蒸留水)を給水したロックウールミニポットに小葉片を挿し、25/15°C(昼温/夜温)に設定したガラス温室で管理した。葉挿しから 10 日および 25 日後に各区における葉色および総ポリフェノール含量を測定した。葉色については 5 枚の小葉片を供試し、経時的に色彩色差計(CR-200, ミノルタ(株))により $L^*a^*b^*$ 表色系を用いて向軸面の葉色を測定した。総ポリフェノール含量の測定は甲村・渡邊(2005)の処方を準じ、Folin-Denis 法で行った。すなわち、新鮮重 1 g の小葉片を 20 倍量の 80% メタノールを加え、ホモジナイザーで 3 分間磨砕した後、遠心分離機(日立工機(株), himac CR20B3)を用いて、10,000 g, 10°C で 10 分間遠心分離し、ろ紙でろ過して抽出液とした。蒸留水 800 μ l に試料抽出液と Folin 試薬を 50 μ l ずつ加え、3 分後に飽和炭酸ナトリウム溶液 100 μ l を混合して 1 時間静止後、分光光度計(日本分光(株), V-560)で 700 nm の吸光度を測定した。総ポリフェノール含量はクロロゲン酸相当量で算出した。

結 果

BA 無添加培地および BA 培地ともに、葉挿し 10 日後、小葉片の切り口は褐変していた。時間の経過とともに、BA 無添加培地では小葉片の上部から褐変が進行してやがて枯死するものがあったが、BA 培地の小葉片ではその褐変は切り口だけにとどまった。向軸面の葉色について $L^*a^*b^*$ 表色系で示すと、

開始時における L^* 値 (明度) および b^* 値 (黄み) はそれぞれ 35.9 および 14.7 であった (第 3-13 図). 葉挿し 10 日後には, BA 無添加培地の小葉片でそれぞれ 36.2 および 16.2 と, 初期値よりも増加して脱緑が進んだが, BA 培地の小葉片ではそれぞれ 33.0 および 10.2 と初期値よりも低い値を示し, 葉色は濃くなっていた. その後は, 両培地ともに, 小葉片の緑色は薄くなっていったが, BA 培地の小葉片では, 25 日後においても初期値と同等の値を示

し, 葉の緑色が保たれていた.

葉挿し開始時における総ポリフェノール含量は 1.3 mg/g FW であった (第 3-14 図). 葉挿し 10 日後に両培地で約 1 mg/g FW の増加がみられたが, 葉挿し 25 日後には BA 無添加培地で 6.1 mg/g FW , BA 培地で 4.5 mg/g FW になり, 増加量は BA 培地で有意に少なかった.

考 察

NAA の処理濃度を変えて葉挿ししたところ, NAA 濃度が 0.1 ppm 以上のときに小葉片は黄化し, すべてが枯死した. 球根ペゴニアの葉片培養に関する研究報告では, 初代培地に BA と同濃度から $1/5$ の濃度で NAA を添加している例が多くみられたが, 葉挿し繁殖においては, NAA 処理は発根を促す前に葉片の枯死を招き, 悪影響をもたらすことが明らかとなった. また, わずかに生存した葉片は黄化しながらも発根していたが, 葉挿し 6 週以降観察を続けても不定芽を形成することはなかったことから, 球根ペゴニアの場合には, *Peperomia sandersii* のように不定根の発生を促しても, 続いて不定芽形成を誘導する (Harris・Hart, 1964) ことはできないものと考えられた.

Burritt・Leung (1996) は *Begonia* $\times$ *erythrophylla* の葉柄培養において, 植物成長調節物質無添加の培地では 14 日以後にクロロシスを発症することを報告している. 本実験において, 植物成長調節物質無添加培地の場合, 20% 前後の小葉片が脱緑する

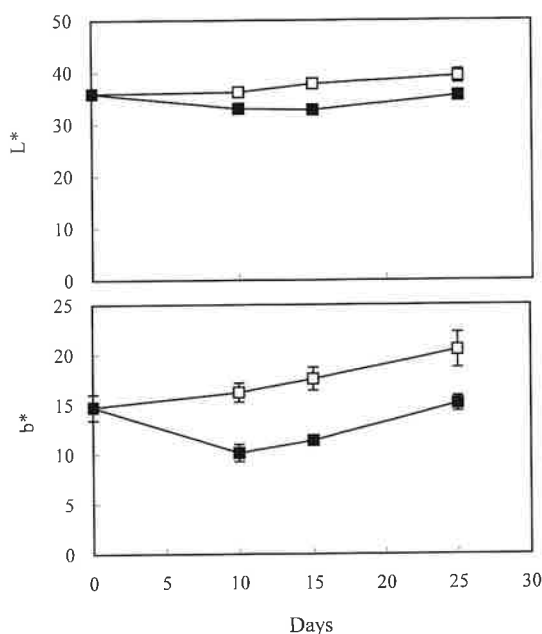


Fig. 3-13. Changes of L^* and b^* values in leaf pieces after inserting in rockwool containing 0.5 ppm BA or free. Vertical bars indicate standard error ($n=5$). BA 0.5 ppm (■), BA 0 ppm (□).

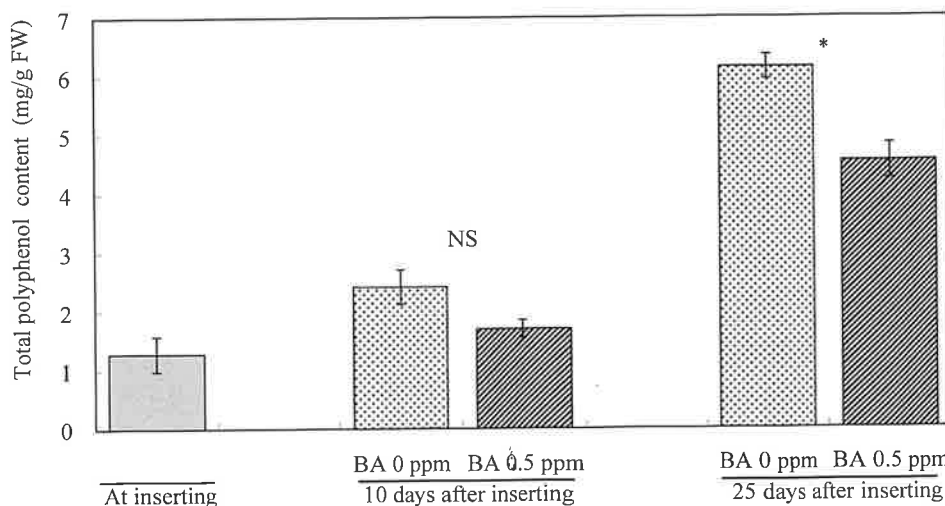


Fig. 3-14. Total polyphenol contents in leaf pieces after inserting in rockwool blocks containing 0.5 ppm BA, or BA free. Vertical bars indicate standard errors ($n=3$). NS and * indicate non-significant and significant, respectively according to the t -test ($P \leq 0.05$).

とともに切り口からの褐変が進み枯死に至った(第3-1表, 第3-2表)。おそらく葉面積に対して切り口が大きく, 酸化しやすいうえ, 微生物汚染を受けやすいことが原因しているのであろう。この小葉片の脱緑および褐変は0.1 ppm以上のBAを添加することで抑制され, 生存率を高めることができた。Beck・Camper (1991)もまた, 外植体の形と大きさを変えた*Petunia*の葉片培養で, 小さい葉片ほど成長せず, クロロシスを起こしやすい傾向にあること, また葉片をBA無添加の培地からBA添加培地へ移植するまでの期間が長くなるほどクロロシスを起こしやすいことを認め, 葉片の生存にはBAの添加が必要であることを述べている。また, 長村・ト部(1976)が行ったエラチオールベゴニアの葉挿しに関する実験データの中にも, BA添加による生存率の向上が示されている。

さらに, 0.25 ppm以上のBAを添加すれば不定芽形成が促されることが分かった。次に, 0.5 ppm BAにNAAを加えれば, 生存率を低下させることなく発根を促進するのではないかと考えたが, NAAの添加はカルス形成を増大させるばかりで不定芽形成を抑制し, さらに発根を促すこともなかった。このことより, 球根ベゴニアの葉挿しにはNAAは不要であり, BAのみが必要であることが明らかになった。このように外生オーキシンの添加が不定芽形成を抑制する例は, *Garcinia mangostana*の葉片培養でもみられ, BAのみの添加が適していることが報告されている(Gohら, 1994; Lakshmananら, 1997)。

不定芽形成に必要なBAの処理期間について検討した結果, BA添加培地に4~8日間置けば, その期間中には不定芽は形成されないものの, 後に不定芽の形成と発達が促進されることが分かった。また, BA連続処理よりも早く発根することが示された。他の植物の不定芽形成については, *Begonia* × *erythrophylla*の葉柄培養(Burritt・Leung, 1996)と*Brassica juncea*の子葉培養で7日間(Sharmaら, 1990), *Petunia*の葉片培養で10日間(Beck・Camper, 1991), *Garcinia mangostana*の葉片培養で6日間(Lakshmananら, 1997)のBA処理期間が必要であることが報告されている。いずれも, この1週間前後という短い期間中には不定芽の分化はみられないが, 芽を分化する方向付けがなされ, 後にBA無添加の条件下で芽が発達するものと考えられた。Lakshmananら(1997)によると, シュート形成過程には3つの発達状態があり, すなわち, 形態形成

能の獲得, シュート形成の方向付け, そして器官分化であるとしている。

第1節より, 0.1 ppm以上の濃度でNAAを培地に添加すると葉片が著しく黄化することが分かったので, 第2節では, 葉身を切断したときに生じる傷害エチレンが引き金となって自己触媒的にエチレン生成を増加させ, クロロフィルの分解を促進しているのではないかと, さらにNAAはエチレン生成を助長し, BAはその生成を抑制しているのではないかと仮説を立て, NAAおよびBAを添加した培地でクロロフィルの含量とエチレン生成量を経時的に測定した。しかし, NAA培地ではすでに葉挿し10日後にクロロフィル含量が減少し黄化が始まっていたが, 葉挿し期間を通してエチレン生成の増加はなく, BA培地との差もなかった。田中ら(1985)はクリスマスベゴニアおよびベゴニア・センパフローレンスの花を50 ppm NAA溶液に浸漬処理した後エチレン生成量を測定したところ, 両者とも無処理と比べてエチレン生成量が増加したことを報告しているが, おそらく花と葉ではエチレン感受性が異なるのであろう。収穫後のダイコン子葉において葉の黄化とエチレン生成量とは一致しないという報告(福島ら, 1993)がある他, ホウレンソウではエチレン処理の有無に関わらずクロロフィルの分解が進むとされており(Yamauchiら, 1985; Baardseth・Von Elbe, 1989), 球根ベゴニア小葉片におけるクロロフィル分解機構と植物成長調節物質との関係については今後検討する必要がある。

BA処理を行うとクロロフィル含量は葉挿し10日後も減少することなく, また黄化指数は30日後においてもほとんど変化がなかった。これはBAがクロロフィル分解を抑制していることを示している。BA処理がクロロフィル分解を抑制, あるいは生成を促進するという例は, 収穫後のブロッコリー小花の老化に関する研究などで確認されており(Clarkeら, 1994; Costaら, 2005), Costaら(2005)によると, BAはクロロフィル分解酵素であるクロロフィラーゼの活性を低下させるという。

BA無添加培地では, 小葉片四辺の切断面が褐変した後, 次第にその褐変が小葉片全体に広がって枯死するものが多くみられた。それに対し, BAを添加すると, 小葉片の褐変が切り口のみにとどまり, 生存率は高まった。そこで, 褐変の基質であるポリフェノール含量の経時的变化について調べたところ, 両培地とも葉挿し後時間の経過とともに増加し

たが、その増加の程度は BA 無添加培地の小葉片よりも BA 培地の方が小さかった。すなわち、BA を添加することで総ポリフェノール含量の増加が抑えられ、褐変を回避できることが明らかになった。なお、酵素的褐変には、リンゴのようにポリフェノールであるクロロゲン酸が酵素ポリフェノールオキシダーゼ (PPO) により酸化されるために起こる場合と、レタスのようにポリフェノール量が少ない植物がカットされるとポリフェノールの生合成系の酵素フェニルアラニンアンモニアリアーゼ (PAL) が誘導され、その結果、ポリフェノールが徐々に合成されて順次酸化されるために褐変が起こる場合とがある (村田・本間, 1998)。球根ベゴニアの小葉片でみられる褐変に対し、PPO または PAL がどのように関っているかは明らかでない。また、BA 自体に

抗酸化作用はないと思われるが、抗酸化物質の生成を促進する、あるいは PPO や PAL の活性の阻害に作用している可能性があり、これらの追求については残された課題となった。

本章より、球根ベゴニアの小葉片挿しにおいて、0.5 ppm BA の添加は、クロロフィル分解を抑制するとともに、ポリフェノールの酸化による褐変を抑制して生存率および不定芽形成率を高めることが明らかになった。さらに NAA はクロロフィルの分解を促進して黄化を招き、生存率を低下させることから培地には不要であること、ならびにクロロフィル分解はエチレン生成により誘導されるものではないことが分かった。また、BA 処理は 4～8 日間で効果があることが示された。

第 4 章 母株栽培時と葉挿し時の日長、小葉片の採取部位および置床方法が不定芽形成に及ぼす影響

周年にわたり安定的に個体再生を図るためには挿し床の環境だけでなく、不定芽形成に適した母株の状態も把握しておく必要がある。母株の生理状態は器官形成の反応に大きな影響を及ぼすからである (Simmonds・Nelson, 1988)。葉挿し繁殖により鉢花生産されているエラチオールベゴニアにおいては、母株栽培時の日長および光源の種類に関する研究が古くから行われ、母株栽培時と葉挿し時の日長をそれぞれ別に操作する方法が紹介されている (Herbert・Moser, 1976a, 1976b; Appलगren, 1985; Simmonds・Nelson, 1988, 1989)。そこで、本章では、母株の状態として、葉の熟度、葉の着生する茎の向きおよび栽培時の日長条件を検討した。

また、前章より、小葉片挿しには BA を添加したロックウール培地を用いるとよいことが分かったが、1 枚の葉身内のどの部位における小葉片を用いても同じ反応を示すかどうかは分かっていない。ここでは、葉身内における各部位での不定芽形成能を調べ、どの部位からでも不定芽を形成させるための方法について検討した。さらに、この方法による遺伝的変異の有無を確認したうえで、他のベゴニア類にも適用できるかどうかを調査した。

用い、各実験に示す種々の形状に切断した。挿し床の培地にはロックウール成形物 (商品名: ロックファイバーミニポット M25S30, 日東紡績株式会社) を用い、これを入れたプラスチック容器 (10 × 15 × 深さ 5 cm) の底面に培養液 250 ml を注いで給水し、完全には密閉しない状態で蓋をした。なお、ロックファイバーミニポットの最大保持水分量は約 91% であった。特に記述がない限り、葉挿し 6 週後に小葉片を培地から引き抜き、生存小葉片数、不定芽、カルスおよび根を形成した小葉片数を調査した。小葉片基部には高さ 3 mm ほどの不定芽を複数形成するものがあったが、その基部には腋芽や小さい芽が多く着生しており、不定芽数を正確に捉えることができなかったため、ここでは不定芽を形成した葉片の割合のみを記録した。母株の栽培および葉挿しは各実験に示す温度設定のガラス温室で行い、メタルハライドランプ (MF400・L-J2/BU-P, 東芝ライテック株式会社, PPFD 約 $150 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) を用いて早朝と夜間に明期を延長し、18 時間日長とした。5 月上旬から 9 月下旬までの晴天時には自然光の 50% 遮光を行った。各区 5 小葉片を供試して 3 反復した。

共通の材料および方法

種子から栽培した球根ベゴニア 'ティネラ・ピンク' を供試し、挿し穂には完全に展開した若い葉を

第 1 節 母株の諸条件と不定芽形成

多くの植物において、若い組織の方が成熟した組織よりも細胞の分裂活性が高く、シュート再生能

力が高いことが知られており (Stamp ら, 1990), 組織培養では外植体に若い組織が用いられることが多い。また, *Malus domestica* の葉片培養において, 柵状組織と海綿状組織をこれから分化しようとしている若い葉が, まだ全く分化を始めていない未展開の葉や完全に展開し終えた葉よりも器官形成能が高いことが報告されている (Welandar, 1988)。そこで, ここでは葉の熟度の違いにより不定芽形成能に差があるかどうかを知ろうとした。

第2章において, 時期を変えて葉挿しを行った結果, 日長は不定芽形成率に影響をしないことを明らかにしたが, 供試した母株および挿し穂はともに同条件で季節の影響を受けていた。本節では, 母株の栽培と葉挿しを別々の日長下で行い, それぞれに対する日長が不定芽形成に及ぼす影響を調べた。

1-1. 母株における葉の熟度および葉の着生状態と不定芽形成との関係

材料および方法

挿し穂の母株には約1年4か月齢の実生株を用いた。茎頂から展葉したばかりの, 葉幅が1.5 cmに

達した葉を第1葉とし, それから下に向かって着生している葉を第2葉, 第3葉と数えた。7月31日に, 第1葉, 第4葉, 第7葉, 第10葉および第13葉を採取して, 葉柄を切り離し, 葉底と主脈を含んで葉身を2×1.5 cmに切り詰め, 挿し穂用の小葉片を作った。その各葉位にある小葉片を, 0.5 ppm BAを添加したロックファイバーミニポット挿し, 25/15°C (昼温/夜温) に設定したガラス温室で管理した。

これとは別に, 母株として約1年3か月齢の実生株を用い, 展開葉が約15枚着生する茎を選んで実験開始までの20日間, 茎を直立状態または下垂状態に保った。下垂状態株は, 直立茎を逆さまに倒して起き上がらないように支柱を使って固定しておいたものを使った。7月6日に, 直立茎と下垂茎における第4展開葉を採取し, 葉柄を切り離し, 葉底と主脈を含んで葉身を2×1.5 cmに切り詰めた小葉片を前述と同様の方法で葉挿しした。

結 果

展開したばかりの若い第1葉小葉片の生存率は13%で, ほとんどが枯死した (第4-1表)。第4～10葉の生存率はほぼ100%となり, ほとんどすべて

Table 4-1. Influence of leaf position on stem on adventitious bud formation of leaf pieces.

Leaf position on stem	Surviving percentage	Percentage of organ formation			
		Adventitious buds	Only calli	Only roots	No change
1	13 a	13 a	0 a	0	0
4	100 c	100 c	0 a	0	0
7	93 bc	93 bc	0 a	0	0
10	93 bc	87 bc	6 a	0	0
13	67 b	67 b	0 a	0	0

Basal 2 × 1.5 cm leaf pieces (n=5) without petioles of various leaf position on stem were inserted in rockwool blocks containing 0.5 ppm BA. Three replicates were used for each treatment. Mean separation within a column followed by Tukey's multiple range test, $P=0.05$.

Table 4-2. Influence of type of stem on adventitious bud formation of leaf pieces.

Type of stem	Surviving percentage	Percentage of organ formation			
		Adventitious buds	Only calli	Only roots	No change
Erect	100 a	93 a	7 a	0	0
Trailing	93 a	93 a	0 a	0	0

Basal 2 × 1.5 cm leaf pieces (n=5) without petioles on erect stem or trailing stem were inserted in rockwool blocks containing 0.5 ppm BA. Three replicates were used for each treatment. Mean separation within a column followed by Tukey's multiple range test, $P=0.05$.

の生存小葉片で不定芽形成が認められた。第13葉の生存率は67%であったが、生存葉片のすべてで不定芽形成が認められた。

次に葉が着生する茎の向きと不定芽形成との関係についてみると、直立茎および下垂茎のいずれの葉においても不定芽が同頻度に形成され、葉の着生状態による不定芽形成への影響はみられなかった(第4-2表)。

1-2. 母株栽培時と葉挿し時の日長が不定芽形成に及ぼす影響

材料および方法

あらかじめ18時間日長下で栽培していた約1年6か月齢の実生株を、10月11日から最低夜温を14°C、日長を18時間(長日)または自然日長(短日)に維持したガラス室に移して6週間栽培し、葉挿しの母株とした。11月23日に各日長下で栽培したその母株から、若い葉を採取した。続いて、葉柄を切り離し、葉底と主脈を含んで葉身を2×1.5 cmに切り詰めて小葉片を作り、0.5 ppm BAを添加したロックファイバーミニポットに挿した。葉挿し後、それらを最低14°C、18時間日長または自然日長に維持したガラス室で管理した。なお、11月23日に18時間日長下にある母株では成長と開花が認められたが、自然条件下にある母株では成長が停止し、開花のない状態にあった。葉挿し6週後に形態形成の様相を調査した。形成された不定芽はその発達状態から、ステージI(芽原基)、II(未展開の葉をもつ芽)、III(展開葉をもつ芽)の3つのステージに分類し記

録した(第3-5図参照)。

結 果

生存率は、18時間日長の長日下(LD)で栽培していた母株から得た小葉片では葉挿し時の日長にかかわらず93%であったが、自然日長下、すなわち短日(SD)に維持した母株から得た小葉片では60~67%にとどまり、枯死するものがあった(第4-3表)。また、長日下で栽培していた母株から得た小葉片の不定芽形成率は93%で、生存した個体のすべてで不定芽形成が認められたのに対し、短日下で栽培していた母株から得た小葉片の不定芽形成率は14%で、大部分がカルスを形成した。また、長日下で栽培した母株の場合、葉挿し時の日長を長日にする、短日のものと比べて不定芽の発達が促され、葉挿し6週後にステージIIIに達したシュートが多く存在した。

第2節 葉底を含まない小葉片における不定芽形成の促進

多くの個体再生を図るためには、1枚の葉身から多くの挿し穂を得ることが必要である。ここではまず、1枚の葉身内で異なる部位から小葉片を採取し、それぞれの不定芽形成能を比較した。次いで、葉底から2 cm離れた位置の小葉片に焦点を当て、不定芽形成を誘導するための方法を検討した。すなわち、外生的に処理する植物成長調節物質の濃度を高める、あるいは内生の植物ホルモンのバランスを変化させる目的で傷つけ処理および置床方向を変えるなどの処理を行った。

Table 4-3. Effects of day length during growing of mother plants and leaf piece cutting on formation and development of adventitious bud.

Day length		Surviving percentage	Percentage of organ formation				Stage of adventitious bud ² (%)		
Mother	Cutting		Adventitious buds	Only calli	Only roots	No change	I	II	III
LD	LD	93 b	93 b	0 a	0 a	0	0	26	67
LD	SD	93 b	93 b	0 a	0 a	0	33	40	20
SD	LD	67 a	14 a	53 b	0 a	0	0	7	7
SD	SD	60 a	14 a	40 b	6 a	0	7	7	0

Basal 2 × 1.5 cm leaf pieces without petioles (n=5) were inserted in rockwool blocks containing 0.5 ppm BA.

² Stage I, bud primordium; II, bud with unexpanded leaves; III, bud with expanded leaves. Three replicates were used for each treatment. Mean separation within a column followed by Tukey's multiple range test, *P*=0.05.

Belaizi ら (1991) は, *Malus domestica* の節間培養で, 器官形成培地にオーキシンを添加しなくてもカルスが常に形成されたことから, 外植体内にオーキシンが高濃度に存在すると推察し, BA に加え, オーキシン輸送阻害剤である TIBA を培地に添加した結果, ダイレクトシュートが得られたことを報告している. 本実験においても, 小葉片におけるオーキシンの存在が問題となったので, TIBA 処理を試みた.

2-1. 1枚の葉における小葉片の採取部位と不定芽形成との関係

材料および方法

挿し穂の母株には約1年4か月齢の実生株を用い

た. 7月20日に, 1枚の葉身において葉底から葉先に向かって0, 1, 1.5および2 cm 離れた位置で主脈を含む 2×1.5 cm の小葉片を切り出し(第4-1図), 0.5 ppm BA を添加したロックファイバーミニポットに挿し, 25/15°C (昼温/夜温) に設定したガラス温室で管理した. またこれとは別に, 各区5葉片を供試して, 小葉片切り口における主脈の太さを測るとともに, 光学顕微鏡下で主脈における維管束の数を測定した(第4-2図).

結 果

葉底における主脈の太さは2.1 mm, 維管束数は5.4本, 一方葉底から2 cm 離れた位置での主脈の太さは1.2 mm, 維管束数は2本であり, 葉底から離

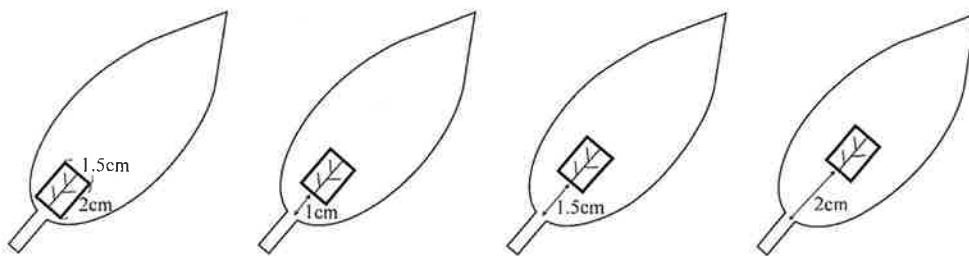


Fig. 4-1. Position of 2×1.5 cm leaf piece.

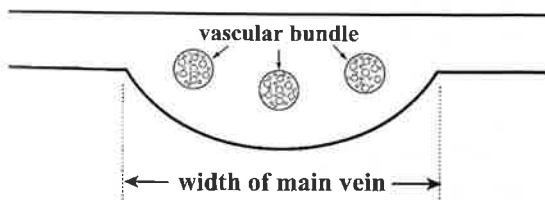


Fig. 4-2. The measurements of width of a main vein.

Table 4-4. Width of a main vein at different distances from the leaf base.

Distance from leaf base (cm)	Width of main vein ^z (mm)	Number of vascular bundles in main vein ^z
0	2.1 ± 0.3	5.4 ± 0.9
1.0	1.4 ± 0.2	3.0 ± 0
1.5	1.3 ± 0.2	3.0 ± 0
2.0	1.2 ± 0.2	2.0 ± 0.7

^z Mean $\pm$ SD (n=5).

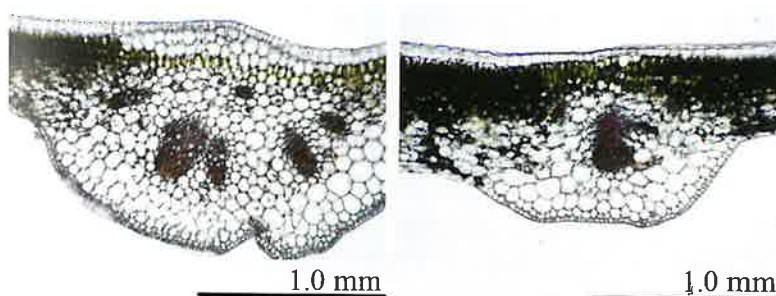


Fig. 4-3. Transverse section through the proximal end of a main vein in the piece. Left, leaf base; right, 2 cm from the leaf base.



Fig. 4-4. Adventitious bud formed on epidermis of leaf base.

Table 4-5. Influence of the section position of leaf pieces on adventitious bud formation.

Distance from leaf base (cm)	Surviving percentage	Percentage of organ formation			
		Adventitious buds	Only calli	Only roots	No change
0	93 a	87 c	6 a	0	0 a
1.0	93 a	33 b	53 b	0	7 a
1.5	100 a	40 b	60 b	0	0 a
2.0	100 a	0 a	73 b	0	27 b

2 × 1.5 cm leaf pieces (n=5) cut at different distances from leaf bases were inserted in rockwool blocks containing 0.5 ppm BA. Three replicates were used for each treatment. Mean separation within a column followed by Tukey's multiple range test, $P=0.05$.

れるにつれて主脈の太さおよび維管束数は減少した(第4-4表, 第4-3図). 特に, 葉底から1 cm 離れると, 主脈の太さおよび維管束数はともに, 葉底におけるそれらと比べて著しく減少した.

生存率はいずれの小葉片においても93%以上であった(第4-5表). 不定芽形成率は, 葉底を含む小葉片で87%と最も高い値を示したが, 葉底から離れるにつれて低下し, 1 cm 離れた小葉片では33%, 1.5 cm 離れると40%, 2 cm 離れると0%となった. 不定芽を形成しなかった小葉片の多くはカルスを形成していたが, 葉底から2 cm 離れた小葉片では根もカルスも形成せず, 変化なしのものが27%でみられた. なお, 第4-4図には葉底を含む小葉片に形成された不定芽を示したが, 主脈基部の切り口にカルスが形成され, その付近の表皮上に不定芽が観察された.

2-2. 高濃度 BA 処理が不定芽形成に及ぼす影響

材料および方法

挿し穂の母株には約10か月齢の実生株を用いた. 9月2日に, 葉底から2 cm 離れた位置で葉先に向かって切り出した主脈を含む2 × 1.5 cmの小葉片(以下では, これを「葉底を含まない2 × 1.5 cm 小葉片」と呼ぶ)を挿し穂とした. それら小葉片を, 0.5, 1, 2および5 ppmのBAを添加したロックファイバーミニポットに挿した.

また, これとは別に, 小葉片基部における主脈上の表裏に0, 1, 10 ppmのBAを含むラノリンペーストを4 mg塗布し, 0.5 ppm BAを添加したロックファイバーミニポットに挿した. 両実験ともに, 葉挿し後は25/15°C(昼温/夜温)に設定したガラス

温室で管理し, 8週後に形態形成の様相を調査した.

結 果

高濃度のBA溶液を給水させた場合, 生存率はいずれの区においても93%以上であったが, 不定芽形成はほとんどなく, カルスを形成するのみであった(第4-6表).

一方, 濃度の異なるBA溶液をラノリンペーストにして塗布した場合, 生存率はいずれの区においても93%以上であった. 不定芽形成は, 0 ppm BA塗布処理では全くみられなかったのに対し, 1 ppm BA塗布処理では20%, 10 ppm BA塗布処理では40%の小葉片で認められた(第4-7表). なお, 不定芽形成がみられなかった小葉片ではカルスを形成した.

2-3. 小葉片への主脈傷つけ処理が不定芽形成に及ぼす影響

材料および方法

挿し穂の母株には約2年1か月齢の実生株を用いた. 7月19日に, 葉底を含まない2 × 1.5 cm小葉片を挿し穂とし, 主脈の真ん中に鋭利な刃物を用いて葉肉を貫通する切り込みを入れた. その小葉片を0.5 ppm BAを添加したロックファイバーミニポットに挿し, 25/15°C(昼温/夜温)に設定したガラス温室で管理して8週後に形態形成の様相を調査した.

結 果

生存率は傷つけ処理の有無にかかわらず93%で

Table 4-6. Effects of concentration BA on adventitious bud formation of leaf pieces cut at 2 cm away from leaf bases.

Concentration of BA (ppm)	Surviving percentage	Percentage of organ formation			
		Adventitious buds	Only calli	Only roots	No change
0.5	93 a	0 a	87 a	0	6 a
1.0	100 a	7 a	93 a	0	0 a
2.0	93 a	0 a	93 a	0	0 a
5.0	100 a	0 a	100 a	0	0 a

2 × 1.5 cm leaf pieces (n=5) were inserted in rockwool blocks containing BA of various concentrations. Three replicates were used for each treatment. Mean separation within a column followed by Tukey's multiple range test, $P=0.05$.

Table 4-7. Effects of lanolin paste treatment containing BA on adventitious bud formation of leaf pieces cut at 2 cm away from leaf bases.

Concentration of BA (ppm)	Surviving percentage	Percentage of organ formation			
		Adventitious buds	Only calli	Only roots	No change
0	100 a	0 a	100 a	0	0
1	93 a	20 b	73 a	0	0
10	93 a	40 c	53 a	0	0

2 × 1.5 cm leaf pieces (n=5) were inserted in rockwool blocks containing 0.5 ppm BA. Three replicates were used for each treatment. Mean separation within a column followed by Tukey's multiple range test, $P=0.05$.

Table 4-8. Effects of wounding in the center of a main vein on adventitious bud formation of leaf pieces cut at 2 cm away from leaf bases.

Wounding	Surviving percentage	Percentage of organ formation			
		Adventitious buds	Only calli	Only roots	No change
—	93 a	0 b	93 a	0	0
+	93 a	20 a	73 a	0	0

2 × 1.5 cm leaf pieces (n=5) were wounded in the center of a main vein and were inserted in rockwool blocks containing 0.5 ppm BA. Three replicates were used for each treatment. Mean separation within a column followed by Tukey's multiple range test, $P=0.05$.

あった (第 4-8 表)。傷つけ処理を行った場合の不定芽形成率は 20% であり、無処理の小葉片と比べてわずかながら有意に高かった。不定芽を形成しなかった小葉片ではすべてカルスを形成した。

2-4. 小葉片の置床方向が不定芽形成に及ぼす影響

材料および方法

挿し穂の母株には約 1 年 4 か月齢の実生株を用いた。8 月 20 日に、葉底を含まない 2 × 1.5 cm 小葉片を挿し穂とし、0.5 ppm BA を添加したロックファイバーミニポットに垂直挿し (基部側下)、水平挿し (背軸面下) および上下逆挿し (基部側上) の 3

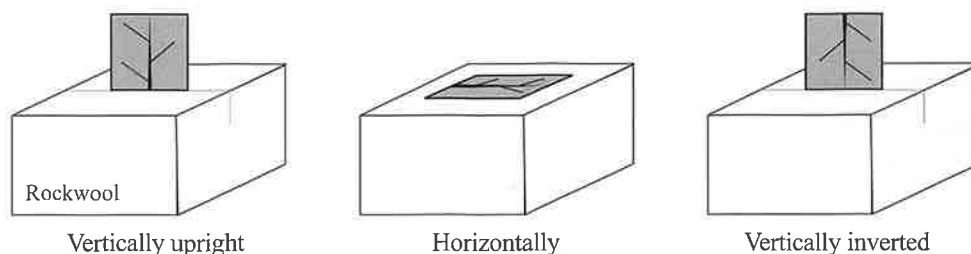


Fig. 4-5. Orientation of leaf piece.

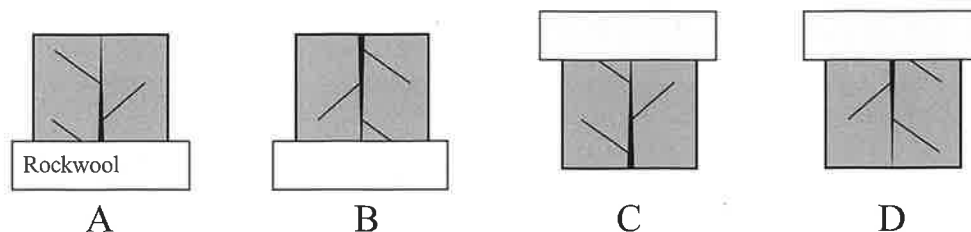


Fig. 4-6. Orientation of leaf piece and position of rockwool block.

通りの方法で葉挿しを行った(第4-5図). 25/15°C(昼温/夜温)に設定したガラス温室で管理し, 8週後に形態形成の様相について調査した.

またこれとは別に, 挿し穂の母株として約1年5か月齢の植物体を用い, 11月23日に, 葉底を含まない2×1.5 cm小葉片を, 0.5 ppm BAを添加したロックファイバーミニポットを用いて第4-6図に示す方法で挿した. すなわち, A区(小葉片の基部側を下), B区(小葉片の基部側を上), C区(小葉片の基部側を下にしてロックウールを上), D区(小葉片の基部側を上にしてロックウールを上)の4通りを設けた. 25/15°C(昼温/夜温)に設定したガラス温室で管理し, 8週後に形態形成の様相を調査した.

結 果

生存率は, 垂直挿しおよび逆挿しでそれぞれ100%, 87%であったが, 水平挿しでは80%とやや低く, 小葉片が水浸状になって褐変, 枯死するものがみられた(第4-9表). 不定芽形成率は, 垂直挿しで0%, 水平挿しで60%, 逆挿しで80%であり, 水平挿しまたは逆挿しにすることによって不定芽形成率が高くなった. なお, 不定芽は, 水平挿しするとき, 小葉片基部側の主脈上に1個, 逆挿しでは小葉片先端側の側脈または葉肉上に複数観察された(第4-7図). 一方, 垂直挿しの場合は, ほとんどがカルスを形成していた.

次に, 小葉片の置床方向と0.5 ppm BAを添加し

Table 4-9. Effects of leaf piece orientation on adventitious bud formation of leaf pieces cut at 2 cm away from leaf bases.

Orientation of leaf piece	Surviving percentage	Percentage of organ formation			
		Adventitious buds (Position of buds)	Only calli	Only roots	No change
Vertically upright	100 b	0 a	73 c	0	27 b
Horizontally	80 a	60 b (Proximal)	20 b	0	0 a
Vertically inverted	87 ab	80 c (Distal)	0 a	0	7 ab

2×1.5 cm leaf pieces (n=5) were placed in rockwool blocks containing 0.5 ppm BA vertically upright, horizontally or vertically inverted as shown in Fig. 4-5. Three replicates were used for each treatment. Mean separation within a column followed by Tukey's multiple range test, $P=0.05$.

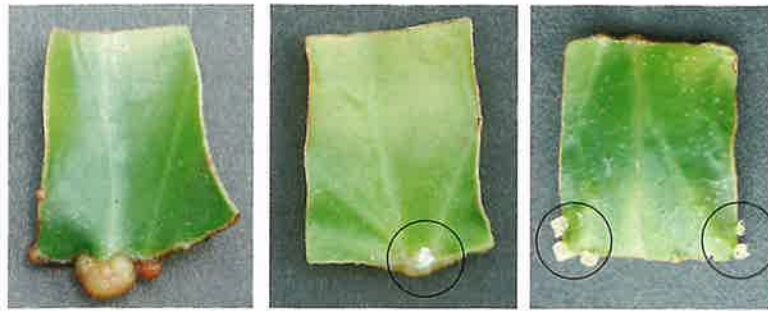


Fig. 4-7. Calli on leaf pieces placed vertically upright (left), adventitious buds on leaf pieces placed horizontally (middle), and vertically inverted (right).

Table 4-10. Effects of orientation of leaf pieces cut at 2 cm leaf bases and position of rockwool blocks on adventitious bud formation.

Orientation of leaf piece and position of rockwool block	Surviving percentage	Percentage of organ formation			
		Adventitious buds (Position of buds)	Only calli	Only roots	No change
A	100 a	0 a	100 b	0	0 a
B	100 a	73 b (Distal)	0 a	0	27 b
C	93 a	67 b (Distal)	0 a	0	27 b
D	100 a	0	100 b	0	0 a

2 × 1.5 cm leaf pieces (n=5) were inserted in rockwool blocks containing 0.5 ppm BA as shown in Fig. 4-6. Three replicates were used for each treatment. Mean separation within a column followed by Tukey's multiple range test, $P=0.05$.

たロックウールの置き方を変えた結果についてみると、小葉片を逆挿しし、BAを含むロックウールを上にしたB区およびBAを含むロックウールを下にしたC区が、それぞれ73%および67%で不定芽を形成した（第4-10表）。一方、小葉片を垂直挿しした場合には、ロックウールの向きにかかわらずいずれもカルスのみを形成した。

2-5. 小葉片逆挿しへのNAA処理が不定芽形成に及ぼす影響

材料および方法

挿し穂の母株には約2年3か月齢の植物体を供試した。9月24日に、葉底を含まない2 × 1.5 cm小葉片を挿し穂とし、0.5 ppm BA、もしくは0.5 ppm BAに0.25 ppm NAAを添加したロックファイバーミニポットに逆挿しした。25/15°C（昼温／夜温）に設定したガラス温室で管理し、8週後に形態形成の様相を調査した。

結 果

生存率は、0.5 ppm BA区および0.5 ppm BA+0.25 ppm NAA区でそれぞれ93%および87%となり、差がみられなかった（第4-11表）。不定芽形成率は、0.5 ppm BA区で80%であったが、0.5 ppm BA+0.25 ppm NAA区では0%と低く、すべてがカルスを形成した（第4-8図）。また、0.5 ppm BA+0.25 ppm NAA区では小葉片の黄化がみられた。

2-6. TIBA処理が不定芽形成に及ぼす影響

材料および方法

挿し穂の母株には約2年3か月齢の実生株を用いた。8月25日に、葉底を含まない2 × 1.5 cm小葉片を挿し穂とし、小葉片基部における主脈上の表裏に0、10および100 ppmのTIBA（2,3,5-triiodobenzoic acid）を含むラノリンペースト4 mgを塗布し、0.5 ppm BAを添加したロックファイバーミニポットに

Table 4-11. Effects of 0.25 ppm NAA added to 0.5 ppm BA on adventitious bud formation of leaf pieces cut at 2 cm away from leaf bases.

Concentration of NAA	Surviving percentage	Percentage of organ formation			
		Adventitious buds	Only calli	Only roots	No change
0	93 a	80 b	0 a	0	13 a
0.25	87 a	0 a	87 b	0	0 a

2 × 1.5 cm leaf pieces (n=5) were inserted vertically inverted in rockwool blocks containing 0.25 ppm NAA with 0.5 ppm BA. Three replicates were used for each treatment. Mean separation within a column followed by Tukey's multiple range test, $P=0.05$.



Fig. 4-8. Calli induced by 0.25 ppm NAA plus 0.5 ppm BA (left); adventitious bud induced by 0.5 ppm BA (right). Those leaf pieces were inserted in rockwool blocks vertically inverted.



Fig. 4-9. Adventitious bud formed on leaf piece to which lanolin paste containing 100 ppm TIBA was applied.

Table 4-12. Effects of TIBA application at various concentration on adventitious bud formation of leaf pieces cut at 2 cm away from leaf bases.

Concentration of TIBA (ppm)	Surviving percentage	Percentage of organ formation			
		Adventitious buds	Only calli	Only roots	No change
0	87 a	0 a	87 b	0	0
10	93 a	13 a	80 b	0	0
100	100 a	73 b	27 a	0	0

2 × 1.5 cm leaf pieces (n=5) were treated with applications of lanolin paste containing TIBA of various concentrations and were inserted vertically upright in rockwool blocks containing 0.5 ppm BA. Three replicates were used for each treatment. Mean separation within a column followed by Tukey's multiple range test, $P=0.05$.

挿した。25/15℃（昼温／夜温）に設定したガラス温室で管理し、8週後に形態形成の様相について調査した。

結 果

TIBA 処理による生存率への悪影響はみられず、不定芽形成は高濃度の TIBA 処理によって促進された（第 4-12 表、第 4-9 図）。すなわち、TIBA 無処

理区では不定芽が全く形成されなかったが、10 ppm 処理区では 13%，100 ppm 処理区では 73% で不定芽が形成された。

第 3 節 小葉片挿しに伴う変異個体の発生調査

不定的な器官形成には、外植体の組織そのものから直接発生する場合と間接的にカルス形成を経由して起こる場合とがあるが、カルス形成を経由する

場合、細胞の脱分化の過程で体細胞突然変異が誘発され、形態的、生理的な変異が生じることがある (Evans・Sharp, 1986). また種々の植物において、カルス誘導して得られた培養細胞の染色体を調べると2倍体の他に多くの倍数体や異数体が観察されることが知られている (Evans・Sharp, 1986). ベゴニア属においては、*Begonia rex* 'Lucille Closon' で継代培養を繰り返し行ったとき、および培養期間が長くなったときにカルスの染色体数が変化したことが (Casselis・Morrish, 1987), エラチオールベゴニアで組織培養による変異系統の作出 (大門ら, 1993) が報告されているが、優良な形質で均一な苗を大量に必要とする本研究の増殖系において、この変異の問題は障害となる。

本節では、まず小葉挿しにより再生した不定芽の発生起源を調査したうえで、母株と繁殖個体における種々の外部形態について比較観察し、さらに染

色体数の算出、核型解析を行い、変異の有無を調査した。

3-1. 不定芽の発生起源の観察

材料および方法

挿し穂の母株には約2年3か月齢の実生株を用いた。4月11日に、葉柄を切り離し、葉底と主脈を含んで葉身を 2×1.5 cm に切り詰め、挿し穂用の小葉片を作った。その小葉片を 0.5 ppm BA を添加したロックファイバーミニポットに挿し、25/15°C (昼温/夜温) に設定したガラス温室で管理した。葉挿し開始時から1週間ごとに、小葉片の基部側における主脈付近の縦断切片をハンドセクションにより作製した。その切片をカルノア氏修正液 (99.5%エタノール:氷酢酸:クロロホルム = 2:1:1) により、5°C で1

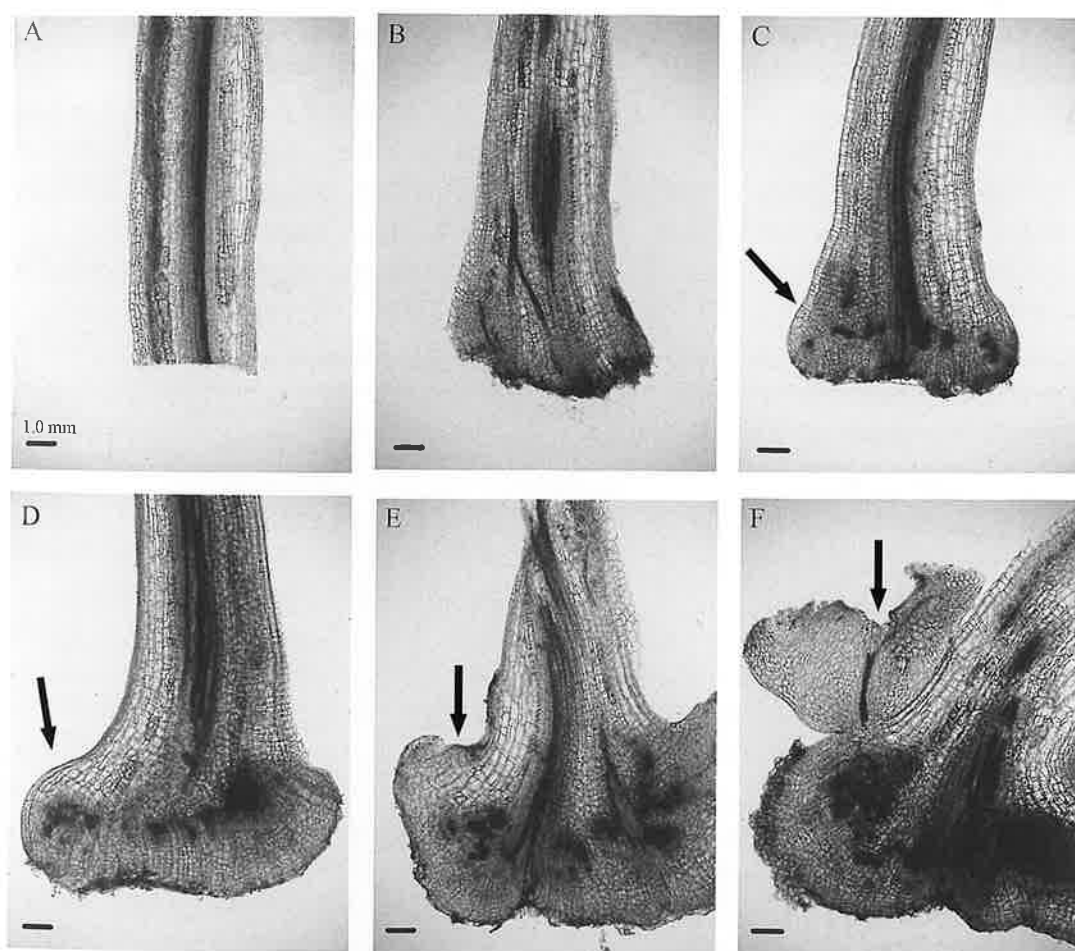


Fig. 4-10. Longitudinal section through the main vein in a leaf piece.

(A) Just after cutting out a leaf piece. (B) Thickness of the proximal end a main vein one week later. (C), (D) Meristemoid formation in epidermal and subepidermal layers two and three weeks later. (E) Adventitious bud primordium in meristemoid four weeks later. (F) Development of adventitious bud five weeks later.

日間以上固定した。その後切片を取り出して45%酢酸に約15分浸漬し、スライドガラスに移して2%酢酸オルセインで1日間染色した。光学顕微鏡による検鏡ならびにデジタルカメラで写真撮影を行った。

結 果

葉底から葉先に向かって約7mmの位置までは多層の表皮細胞をもち、それより上部の組織では1層の表皮細胞をもっていた(第4-10図A)。葉挿し1週後、小葉片の切り口に癒傷組織が形成された(第4-10図B)。2週後、切り口でカルスが肥大し、一方、亜表皮細胞で細胞分裂が盛んに起こった(第4-10図C)。3週後には表皮細胞および亜表皮細胞にできたメリステモイド(meristemoid)が増大した(第4-10図D)。4週後、メリステモイドから不定芽原基が生じ(第4-10図E)、5週後には葉原基が発達した(第4-10図F)。なお、維管束を取り囲む細胞においても盛んに細胞分裂が行われているのが観察されたが、不定芽の形成には関係がなかった。

3-2. 小葉片挿しによる繁殖個体の葉および花器の形態調査

材料および方法

2005年4月に播種し、2006年3月に約11か月齢となった実生株を母株とした。同年3月に若い展開葉を採取して、葉柄を切り離し、葉底と主脈を含む葉身 2×1.5 cmの小葉片を切り出して挿し穂とし、0.5 ppm BAを添加したロックファイバーミニポットに挿した。その後は25/15°C(昼温/夜温)に設定したガラス温室で管理した。5月に小葉片基部から不定芽の形成が認められ、7月に発達したシュートをロックファイバーミニポットから培養土を詰めた直径6 cmのポリポットに移植した。その後は慣行法によって栽培し、5か月後の12月に葉および花器の形状、色など11項目の諸形質について10株を対象に調査し、母株と比較した。母株については1株から葉および花を10個選び、調査に用いた。なお、葉色および花色の調査に当たっては、日本園芸植物標準色票によって評価するとともに、分光測色計(DM500d, ミノルタ株)により $L^*a^*b^*$ 表色系を用いて測定した。さらに、染色体の倍数化が生じるとき、しばしば葉の孔辺細胞が大きくなるという現象がみられる(田中, 1965; 斉藤, 1974)ことから、

Table 4-13. Comparison between mother plant and propagated plants for leaves and flowers.

Parameter investigated	Mother plant (Mean $\pm$ SD) ^z	Propagated plants (Mean $\pm$ SD) ^z	<i>t</i> -test ^y
Length of leaf (cm)	13.9 $\pm$ 0.7	13.6 $\pm$ 0.9	NS
Wide of leaf (cm)	4.4 $\pm$ 0.5	4.1 $\pm$ 0.3	NS
Length of petiole (cm)	3.1 $\pm$ 0.7	2.9 $\pm$ 0.7	NS
Color of leaf (JHS color chart)	3707 (dark green)	3707 (dark green)	NS
Color of leaf ($L^*a^*b^*$)	$L^*=31.8\pm0.7$	$L^*=31.7\pm0.9$	NS
	$a^*=-11.8\pm0.7$	$a^*=-11.6\pm0.9$	NS
	$b^*=12.5\pm1.0$	$b^*=12.3\pm1.5$	NS
Diameter of male flower (cm)	10.5 $\pm$ 0.9	9.6 $\pm$ 0.9	NS
Diameter of female flower (cm)	8.7 $\pm$ 0.5	8.5 $\pm$ 0.7	NS
Number of petals of male flower	70 $\pm$ 9	62 $\pm$ 12	NS
Color of male flower ^z (JHS color chart)	0104 (strong pink)	0104 (strong pink)	NS
	$L^*=56.18\pm0.7$	$L^*=57.9\pm4.0$	NS
Color of male flower ^z ($L^*a^*b^*$)	$a^*=29.8\pm7.2$	$a^*=29.5\pm5.9$	NS
	$b^*=-0.1\pm1.0$	$b^*=0.2\pm1.1$	NS
Length of guard cell (μ m)	47.5 $\pm$ 5.4	47.9 $\pm$ 5.8	NS

One mother plant and ten plants propagated by leaf piece cutting were observed.

^z n=10. ^y NS indicates non-significant.

Mother plant

Propagated plants



Fig. 4-11. Leaves of mother plant and propagated plants.

Mother plant

Propagated plants

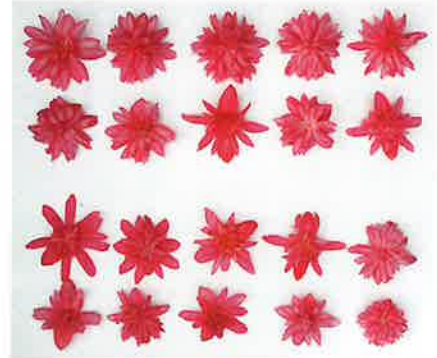


Fig. 4-12. Male flowers of mother plant and propagated plants.

調査項目に孔辺細胞の大きさを加えた。

結 果

繁殖個体の葉は葉長 13.6 cm, 葉幅 4.1 cm, 葉柄長 2.9 cm で, 母株のそれらとほぼ同じであった (第 4-13 表, 第 4-11 図)。葉色は日本園芸植物標準色票により, 両者ともに暗緑と評価され, また $L^*a^*b^*$ 表色系を用いた場合も値は類似していた。

調査時の 12 月に, 繁殖個体は葉挿し後約 10 か月の齢であり, ようやく開花が始まったばかりのステージにあったため, 花卉の重ねがやや乱れるものや花形がいびつになるものが認められ, 加えてばらつきも大きかったが (第 4-12 図), 母株との有意差はすべての項目で認められなかった (第 4-13 表)。花色は日本園芸植物標準色票により, 両者とも鮮桃と評価され, また $L^*a^*b^*$ 表色系を用いた値も類似していた。

葉の孔辺細胞の大きさは, 母株で 47.5 μm , 繁殖個体で 47.9 μm と同程度であり, 有意差はみられなかった。

以上のように, 本実験で調査対象にした形態的特徴 11 項目について, 繁殖個体と母株との間に有意な差異はみられなかった。

3-3. 小葉片挿しによる繁殖個体の染色体の調査

材料および方法

第 3-2 節の実験と同じ母株および繁殖個体を供試した。ベゴニア属の染色体は非常に小さいうえ, オルセインで染まりづらいことが知られており, こ

では Nakata ら (2003) の手法を一部改変, さらに解離と染色を同時に行う Oginuma・Nakata (1988) の手法に準じてプレパラートを作製した。すなわち, よく伸びた根の先端を約 1 cm 切り取り, 14°C の 2 mM 8-hydroxyquinoline に 6 時間浸漬した後, 5°C で 20 時間 Farmer's 固定液 (99.5% エタノール : 氷酢酸 = 3 : 1) を用いて固定した。その後, 根を取り出して数分間水ですすぎ, 1N 塩酸 : 2% 酢酸オルセイン = 1 : 10 の混合液を入れたマイクロチューブに移し, 室温で 20 時間置き, 解離と染色を行った。その後, 実態顕微鏡下でよく染まっている根の先端を長さ約 1 mm に切ってスライドガラスの上に置き, 2% 酢酸オルセインを落としてカバーガラスを掛け, 押しつぶし法により一時プレパラートを作製した。体細胞分裂中期染色体の動原体の位置による分類およびその表現は Levan ら (1964) に従い, 核当たりの特徴を核型として表現する場合は田中 (1980) が定義している用語を用いた。

結 果

母株および繁殖個体ともに, 体細胞分裂中期で $2n=28$ の染色体を算定した (第 4-14 表, 第 4-13 図)。核型については, 腕比により表現すると, 両者ともに中部動原体型の染色体が 26 個, 次中部動原体型の染色体が 2 個存在した。また染色体長により表現すると, 約 2 μm の染色体が 2 個と, それとは明確に区別できる 1 ~ 1.5 μm の範囲で漸变的に推移する小さな染色体が 26 個観察された。これらの結果, 母株および繁殖個体における核型の特徴は一致し, 染色体レベルでの変異はないものとみなされた。

Table 4-14. Karyotype of mother plant and propagated plants.

Plant	Individual number	Chromosome number (2n)	Karyotype according to	
			centromeric position ^z	chromosome length ^y
Mother plant	1	28	26m + 2sm	2L + 26S
Propagated plants	1	28	26m + 2sm	2L + 26S
	2	28	26m + 2sm	2L + 26S
	3	28	26m + 2sm	2L + 26S
	4	28	26m + 2sm	2L + 26S
	5	28	26m + 2sm	2L + 26S
	6	28	26m + 2sm	2L + 26S
	7	28	26m + 2sm	2L + 26S
	8	28	26m + 2sm	2L + 26S
	9	28	26m + 2sm	2L + 26S
	10	28	26m + 2sm	2L + 26S

Five nuclei of one mother plant and ten plants propagated by leaf piece cutting were observed.

^z m, median region; sm, submedian region.

^y L, large chromosome (length $\approx 2 \mu\text{m}$); S, short chromosome ($1 \mu\text{m} < \text{length} < 1.5 \mu\text{m}$).

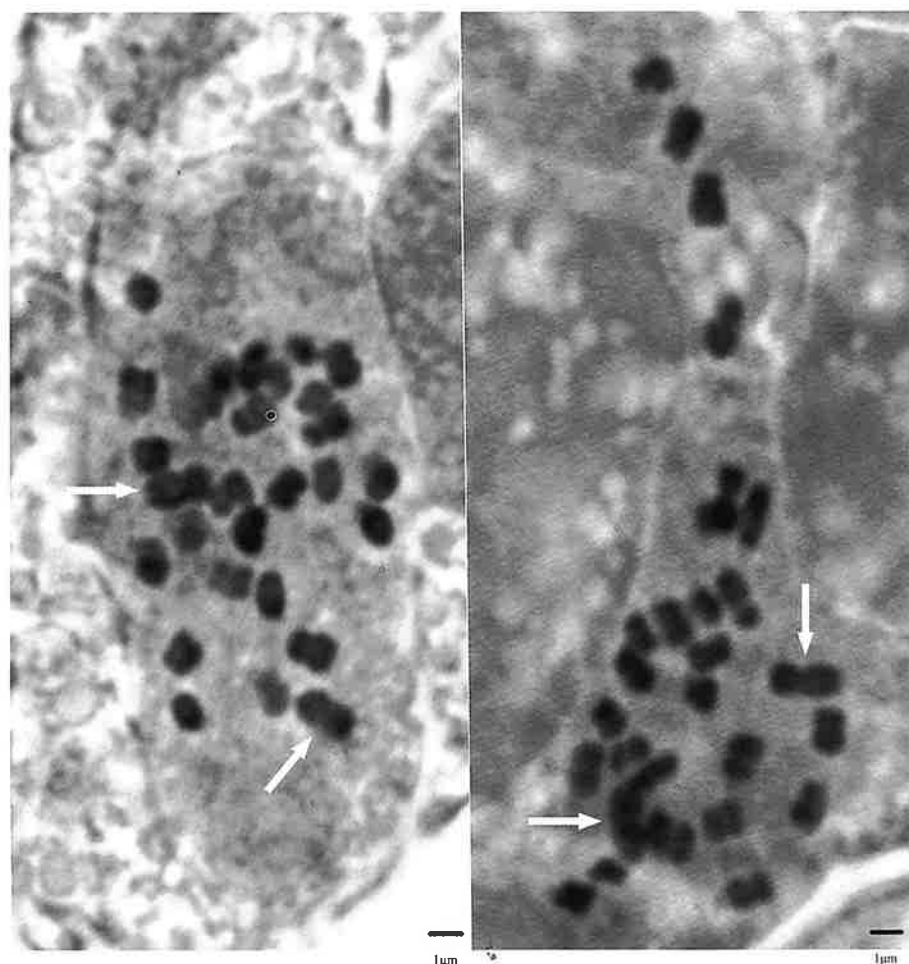


Fig. 4-13. Chromosomes at metaphase of mother plant (left), propagated plant (right). Arrows indicate large chromosomes.

第4節 他のベゴニア類の小葉片挿しにおける不定芽形成

材料および方法

本研究で見出した小葉片挿しの方法を、第1章で繁殖困難とみなされた他の球根性ベゴニアおよび木立性ベゴニアにも適用できるかどうかを検討した。

第1章において不定芽形成率が低かった球根性ベゴニア2種と木立性ベゴニア9種に、球根ベゴニア‘イエロー・スイーティ’および‘パノラマ・オレンジ’を加え、計13種類を供試した。7月6日に若い展開葉を採取して、葉柄を切り離し、葉底と主脈を含んで葉身を2×1.5 cmに切り詰め、挿し穂用の

Table 4-15. The promotion of adventitious bud formation by BA treatment in some tuberous and erect stemmed begonias.

Type of stem	Species or cultivar	BA treatment	Surviving percentage	Percentage of organ formation			
				Adventitious buds	Only calli	Only roots	No change
Tuberous							
	<i>B. 'Panorama Orange'</i>	Yes	93	60	0	0	33
		No (control)	67	0	27	7	33
		Significance ^z	*	**	*	NS	NS
	<i>B. 'Yellow Sweetie'</i>	Yes	93	60	20	0	13
		No (control)	80	0	40	0	40
		Significance	NS	**	**	NS	**
	<i>B. cinnabarina</i>	Yes	87	53	7	0	27
		No (control)	60	0	0	53	7
		Significance	*	**	NS	**	NS
<i>B. pearcei</i>	Yes	87	87	0	0	0	
	No (control)	87	0	0	87	0	
	Significance	NS	**	NS	**	NS	
Erect stemmed							
	<i>B. augustae</i>	Yes	100	100	0	0	0
		No (control)	73	27	0	47	0
		Significance	*	**	NS	**	NS
	<i>B. borneensis</i>	Yes	87	87	0	0	0
		No (control)	73	27	0	47	0
		Significance	NS	**	NS	**	NS
	<i>B. cucullata</i> var. <i>hookeri</i>	Yes	93	93	0	0	0
		No (control)	93	33	0	60	0
		Significance	NS	**	NS	**	NS
	<i>B. dichroa</i>	Yes	100	0	100	0	0
		No (control)	53	0	0	40	13
		Significance	**	NS	**	**	NS
	<i>B. isoptela</i>	Yes	100	100	0	0	0
		No (control)	87	0	0	87	0
		Significance	NS	**	NS	**	NS
	<i>B. maculata</i>	Yes	100	0	100	0	0
		No (control)	47	0	0	40	7
		Significance	**	NS	**	**	**
	<i>B. radicans</i>	Yes	100	80	0	0	20
		No (control)	53	0	0	53	0
		Significance	**	**	NS	**	**
	<i>B. serratifetala</i>	Yes	87	87	0	0	0
		No (control)	93	0	0	93	0
		Significance	NS	**	**	**	**
	<i>B. solananthera</i>	Yes	100	93	0	7	0
		No (control)	53	7	0	47	0
		Significance	**	**	**	*	**

Basal 2 × 1.5 cm leaf pieces (n=5) were inserted vertically upright in rockwool blocks containing 0.5 ppm BA or distilled water (control). Three replicates were used for each species and cultivar. ^z Student's t-test between BA treatment and control. *, ** indicate significant at $P = 0.05, 0.01$, respectively, NS indicates non-significant.

Table 4-16. The promotion of adventitious bud formation by inserting vertically inverted and BA treatment in erect stemmed begonias.

Species	Inserting vertically inverted and BA treatment	Surviving percentage	Percentage of organ formation			
			Adventitious buds	Only calli	Only roots	No change
<i>B. dichroa</i>	Yes	100	93	0	0	7
	No (control)	47	0	0	40	7
	Significance ^z	**	**	NS	**	NS
<i>B. maculata</i>	Yes	100	73	0	0	27
	No (control)	47	0	0	33	14
	Significance	**	**	NS	**	NS

2 × 1.5 cm leaf pieces (n=5) were inserted vertically inverted in rockwool blocks containing 0.5 ppm BA, or vertically upright there containing distilled water (control). Three replicates were used for each species.

^z Student's t-test between treatment and control. *, ** indicate significant at $P=0.05, 0.01$, respectively, NS indicates non-significant.

小葉片を作った。それらの小葉片を 0.5 ppm BA を添加したロックファイバーミニポットに垂直挿しし、25/15°C に設定したガラス温室で管理した。対照として BA 無処理（蒸留水を添加）区を設け、それぞれ 6 週後に形態形成の様相を調査した。

次に、9 月 16 日に、木立性ベゴニア *B. dichroa* Sprague および *B. maculate* Raddi の 2 種を供試し、前述と同様の小葉片を切り出して逆挿しした。8 週後に形態形成の様相を調査した。

結 果

生存率は BA 無処理区で 47 ~ 93 % であったが、BA 処理区では 87 % 以上となり、すべての種および品種で BA 処理区が無処理区を上回った（第 4-15 表）。



Fig. 4-14. Adventitious bud (arrow) formed on leaf piece inserted vertically inverted of *B. dichroa*.

不定芽形成率は、BA 無処理区の場合、球根性ベゴニアのすべてで 0 %、木立性ベゴニアで 0 ~ 33 % であったが、BA 処理区の場合、球根性ベゴニアで 53 % 以上、木立性ベゴニアでは *B. dichroa* および *B. maculata* の 2 品種を除いて 80 % 以上となった。なお、発根率は BA 処理区の小葉片が BA 無添加のものと比べて低かったが、葉挿し 6 週以降、発達した不定芽の基部から発根が認められた。

B. dichroa および *B. maculata* については逆挿しを行った結果、生存率は両者ともに 100 % に、また不定芽形成率はそれぞれ 93 %、73 % となり、無処理区と比べて有意 ($P<0.01$) に高かった（第 4-16 表）。逆挿しにより形成された不定芽の位置は、0.5 ppm BA を含むロックウールに触れた部分の、切り口でない主脈上であった（第 4-14 図）。

考 察

展開したばかり第 1 葉から第 13 葉までを葉挿したところ、第 1 葉は組織が軟弱で枯死する傾向がみられた。不定芽形成率はいずれの葉においても高く、葉の熟度による差はみられなかった。葉間期は約 2 週間であり、第 1 葉が展開してから第 13 葉が展開するまでには約 7 か月を要したが、この範囲であれば不定芽形成能は失われることなく、葉挿し繁殖に利用できることが分かった。エラチオールベゴニアの組織培養において、組織齢および母株齢はともに不定芽形成に影響を及ぼさなかったこと（Simmonds・Nelson, 1988）、*Saintpaulia* の葉片培養

では、古い葉の器官形成能力が低下したが、最も若い葉がシュートを多く形成するとは限らなかったこと (Lo, 1997) が報告されている。また、本実験で直立茎および下垂茎から採取した葉を供試して葉挿しを行ったが、不定芽形成率には両者による差がみられなかった。

次に、母株栽培時の日長が不定芽形成に及ぼす影響について調べた結果、長日下で栽培した母株から採取した小葉片で不定芽形成が促され、短日下で栽培した母株からの小葉片はほとんどがカルスを形成した。短日植物であるクリスマスベゴニアの場合、母株栽培時の日長を短日にすると不定芽形成が促進されることが報告されている (Heide, 1964)。球根ベゴニアは長日植物であり、花芽形成に好適な日長で母株を栽培することが不定芽形成の促進条件であるという点でクリスマスベゴニアの場合と共通している。さらに、Heide・Skoog (1967) は、クリスマスベゴニアについて、母株を短日下で0から16日間と変えて栽培し、それから採取した葉におけるサイトカイニン含量を検討したところ、短日の期間が長いときにサイトカイニン含量が増加することを見出し、Odén・Heide (1989) は長日でオーキシン含量が増加することを指摘した。このように、内生植物ホルモンは日長の影響を受けて変化し、クリスマスベゴニアでは、短日下で内生サイトカイニンの割合が内生オーキシンの割合に対して多く、この場合に不定芽形成が促進され、逆の場合に抑制される (Heide, 1967, 1968)。これらのことから推察すると、球根ベゴニアでは、長日のときに内生サイトカイニンの割合が内生オーキシンの割合に対して多く、不定芽形成に好適な内生ホルモンのバランスとなっているのであろう。

第2章では、葉挿し時の日長は不定芽形成率に影響しないことを述べたが、本章において、長日下で栽培した母株から採取した小葉片を長日あるいは短日下で葉挿ししたところ、不定芽形成率には差がみられなかったものの、形成後のシュートの発達には差が生じ、長日下で挿したもののほうが発達が促されるという結果が示された。球根ベゴニアでは、栄養成長も花芽形成と同じ長日条件で促進されることから、形成されたシュートが長日下でより発達したものと考えられる。

不定芽形成率は1枚の葉身の中で採取する小葉片の位置によって大きく変化した。すなわち、葉底を含む小葉片では高い不定芽形成率を示した

が、葉底から離れるにつれて低くなり、2 cm 離れると不定芽を全く形成しなかった。同様の現象は、*Dianthus caryophyllus* の花卉培養で、花卉を縦に3分割したときに基部の花弁からのみシュート形成がみられたという報告 (Frey・Janick, 1991)、*Pyrus communis* (Hennayake ら, 2003) および *Morus alba* (Oka・Ohyama, 1981) の葉片培養において葉身を上下半分に切った葉片では基部側の葉片の方が先端側の葉片よりも不定芽形成率が高かったという報告、*Malus pumila* の葉片培養で葉柄に近い葉片の方が葉柄から離れた葉片よりも不定芽形成率が高かったという報告 (Welander・Maheswaran, 1992) などにもみられる。本実験で、葉底における主脈の太さと葉底から2 cm 離れた位置における主脈の太さを比較したところ、葉底における主脈の方が太く、維管束数も多かった。Kouider (1984) は、*Malus pumila* の子葉培養で子葉の基部側からのみ不定芽が生じたことについて、発芽中、胚軸に養分を送る役割を果たす維管束が子葉基部に集結していることが不定芽形成にとって有利であると論じている。本実験の場合も、葉底で維管束が多いことは代謝産物や植物ホルモンを不定芽を分化する分裂組織に供給するのに有利であると考えられる。Karam・Al-Majathoub (2000) および Kumar ら (1998) も不定芽形成に対する維管束の存在の重要性を指摘している。また、*Escheveria elegans* の葉は若い時には葉柄がなく、齢が進むと短い葉柄を有し維管束組織が発達するが、若い葉では不定芽よりも根の形成が、成熟した葉では根よりも不定芽の形成が促されると報告されており (Raju・Mann, 1969)、このことも維管束と不定芽形成との深い関係を示唆しているといえよう。一方、Welander (1988) は、*Malus domestica* を供試し、基部葉片の方が先端葉片よりも不定芽形成能が高かったことについて、葉の先端が成熟した後に基部が成熟することを推察し、組織におけるこの熟度の違いを理由に挙げている。球根ベゴニアの場合、第3章第1節において、葉柄つき小葉片をBA培地に挿したときに、葉柄の切り口からだけでなく、葉底にも不定芽の形成を認めたことから (第3-6図)、葉底は不定芽を最も分化しやすい部位であると考えられる。

1枚の葉身からより多くの個体再生を目指すためには、いずれの部位から採取した小葉片においても不定芽形成を促す必要がある。そこで第2節では葉底を含まない小葉片に対し、不定芽形成を促す諸条

件を検討した結果、高濃度の BA 溶液を含むラノリンペーストを主脈基部に塗布したとき、および主脈中央を傷つけ処理したときに、それぞれ 40% および 20% とわずかながら不定芽を形成する葉片を認めた。傷つけ処理の場合、切り口は BA を添加したロックウールに直接接していなかったが、その切り口にカルスが形成されたことから、それより上部の主脈内をオーキシンが求基的に移動し、カルス形成のために消費されたのであろう。その結果、ロックウールに接している小葉片基部の主脈切り口においてオーキシン濃度が変化し、不定芽形成率に影響を及ぼしたのではないかと推察される。

内生の植物ホルモンのバランスを変化させる目的で行った小葉片の置床方向を変えた実験では、好結果が得られた。すなわち、BA 培地に垂直挿ししたとき、不定芽は全く形成されなかったのに対し、水平挿しでは 60%、逆挿しでは 80% で不定芽形成がみられた（第 4-9 表）。さらに、逆挿しした小葉片であれば、BA を含むロックウールを小葉片の上下どちらに施しても、小葉片の先端側、すなわちロックウールに接する側から不定芽が形成されることが示された（第 4-10 表）。

In vitro で外植体の置床方向を変え、シュート形成に及ぼす影響を調べた研究は、*Pryus communis* で茎頂を取り除いたシュートを水平挿しあるいは逆挿ししたときに腋芽形成が促され多芽体を得られたという報告（Lane, 1979）、*Malus pumila* の *in vitro* で得られたシュートを継代培養に用いる際に逆挿しすると腋芽形成数が増大したという報告（Zimmerman・Fordham, 1989）などにみられるが、これらはいずれも頂芽優勢をくずして腋芽形成を促したものであった。不定芽形成に対して葉の置床方向が影響を及ぼした事例は、*Ipomea batatas* の葉柄培養で、葉柄の表面に傷つけ処理した後に水平挿しまたは逆挿し行ったところ、垂直挿しよりも 2 倍近いシュート形成率が得られたという研究報告（Gosukonda ら, 1995）に示されるが、その他には見当たらず、本研究における葉片の逆挿し例は大変興味深い。Gosukonda ら（1995）は、この *Ipomea batatas* 葉柄の現象について、シュートと根の形成に関する極性はオーキシンの求基的移動に支配されており、外植体に傷つけ処理を行って逆挿しすることより、オーキシンの求基的移動が妨げられ、オーキシンが消耗したのではないかと考察している。

オーキシンが柔細胞中を求基的に極性移動し、カ

ルス形成を促進することは一般によく知られている（飯野, 1994）。本実験において、小葉片を逆挿ししてその先端側を下にしたとき（第 4-7 図 B 区）は、オーキシンの求基的移動が妨げられて小葉片の先端側でオーキシン濃度が低くなり、また小葉片を逆挿ししてその先端側を上にしたとき（第 4-7 図 C 区）は、オーキシンが求基的に移動するために小葉片の先端側でオーキシン濃度が低くなったのではないかと推察された。さらに、逆挿しで形成された不定芽は、主脈ではなく側脈の切り口、あるいは切り口ではない表皮上にカルスを作らずに形成されていた。このこともまた、オーキシンの求基的移動が妨げられていることを裏付けている。以上の結果、逆挿しにより内生オーキシンの移動を阻害することと培地への BA 処理により、葉底を含まない小葉片においても不定芽形成に好適な内生ホルモンバランスの状態がもたらされ、不定芽形成が誘導されたと考えられよう。

葉底を含まない小葉片を逆挿しした場合に、培地を 0.5 ppm BA + 0.25 ppm NAA の組成にすると不定芽の形成はみられなかった。これはオーキシンが過剰になり、内生ホルモンのバランスが不定芽形成に不適当な状態になったものと考えられる。一方、オーキシン輸送阻害剤である TIBA 溶液（100 ppm）を含むラノリンペーストを主脈基部に塗布すると、0.5 ppm BA 培地に垂直挿しを行っても不定芽の形成がみられた。このこともまた、内生オーキシンの求基的移動を阻害したことが不定芽形成に好適なホルモンバランスをもたらした結果であると考えられる。以上、第 2 節より、葉底を含まない小葉片で不定芽形成率が低下するのは分裂組織が存在しないからではなく、小葉片内のオーキシンとサイトカイニンのバランスが不定芽形成に適当でないことが原因していると考えられ、小葉片を逆挿しするかまたは TIBA 処理を施し、そのホルモンバランスを変化させることにより不定芽形成率を高められることが明らかになった。

第 3 節において不定芽の発生起源を組織学的に観察したところ、小葉片切り口でカルス形成が起こったが、その位置から離れた、もとの組織の表皮細胞および亜表皮細胞からメリステモイドが発達し、不定芽が形成されることを確認した。*Begonia* × *erythrophylla* の葉柄培養においても、表皮細胞付近で細胞分裂が始まり、不定芽が形成されることが観察されている（Burritt・Leung, 1996）他、レックスベゴニア（Chlyah・Tran Thanh Van, 1975, 1984）お

よびエラチオールベゴニア (Welander, 1981) において、表皮と数層の厚角組織だけ切り離して外植体とした場合も同様のパターンで器官分化したことが報告されており、ベゴニア属では表皮および亜表皮組織で脱分化のための分裂活性が高いのではないかと推察される。なお、Burritt・Leung (1996) および Chlyah・Tran Thanh Van (1975, 1984) は、表皮にある腺毛の基部付近の細胞で分裂が起こることを認めているが、本実験で供試した球根ベゴニアの葉には腺毛がまばらに散在しており、腺毛の存在とは関係なく分裂が起こった。また、Burritt・Leung (1996) は、*B. × erythrophylla* の葉柄培養において、シュートを誘導するためにはシュート誘導培地に最低 7 日間置く必要があること、培養 7 日目には表皮細胞で発生した分裂組織がドーム状に膨張していたことを観察している。球根ベゴニアの場合、第 3 章で不定芽形成誘導に必要な BA 処理の期間は 4～8 日間であることを示した。本章の組織観察より、葉挿し 7 日後にはまだ表皮細胞付近で変化が現れていないものの、このとき、細胞分裂に先立って不定芽形成能を獲得していることが示唆された。

小葉片挿しで得られた個体の葉および花器の形態的特徴について母株と比較した結果、形態的変異を示す個体は全くみられなかった。飯田ら (1986) が行った球根ベゴニアの葉片培養では、葉に白斑が生じる変異が認められたことが報告されているが、これはカルスを経由した再分化であったことが原因しているのではないかと推察される。さらに、染色体の数および核型の特徴にも変異がみられなかったことから、小葉片挿しによる変異出現はないものとみ

なされた。

第 4 節において、本研究で見出した小葉片挿しを第 1 章で不定芽形成能の低かった他のベゴニア類にも適用したところ、すべてで良好な結果を得た。緒言でも述べたように、木立性ベゴニアの鉢花生産現場では、一般に茎挿しが行われているが、多花性品種の場合、腋芽のある節が乏しく、挿し穂が多く得られないことが営利生産上問題となっており、不定芽形成を促す葉挿し繁殖方法の適用はこの生産の拡大に大きく貢献するであろう。加えて、これまで一部のベゴニア類で慣行的に行われてきた葉挿し繁殖方法は、全葉挿し、楔形に切った分割葉片挿しあるいは葉柄挿しなどが中心であったが、*ex vitro* でも小葉片挿しが可能になったことはさらに繁殖効率が高く、実用的であると考えられる。

本章より、母株栽培時の日長は小葉片からの不定芽形成に影響を及ぼし、不定芽形成は長日により促進されること、また葉挿し時の日長は不定芽形成率そのものには影響しなかったが、不定芽の発達を促すことが分かった。また、葉底に近い小葉片ほど不定芽形成能は高く、葉底から離れるにつれてその能力は低下したが、葉底から離れたところの小葉片については逆挿しまたは TIBA 処理を行うことによって不定芽形成を促せることを見出した。さらに、不定芽はカルスを経由せずに表皮細胞および亜表皮細胞が分裂を開始して器官分化したものであることを明らかにした。小葉片挿しによって得られた個体は変異がなく、この技術は繁殖困難な他の球根性ベゴニアおよび木立性ベゴニアにも適用できることを明らかにした。

総 括

「球根ベゴニア」は、南米アンデス山脈の高地に自生する球根性ベゴニアの原種をもとに改良された園芸品種群の総称で、大輪の花が美しく、鉢花としての普及が期待されている。ベゴニア類には茎挿しや葉挿しなどによって増殖可能な種・品種もあるが、球根ベゴニアではそれらによる繁殖が難しく、加えて地下に形成される塊茎が全く分球しないことから、増殖は種子繁殖に頼らざるをえない状況にある。しかし、種子から育った個体は、遺伝的にヘテロであるため、優良個体の保存および大量増殖が不可能であり、効率的な栄養繁殖法の確立が求められている。なお、組織培養による増殖については、これま

で研究されてきているが、内生菌汚染のために実用化に至っていない。

本研究では、球根ベゴニアの小葉片から *ex vitro* で不定芽を形成させるための諸条件について検討し、効率的な増殖法の開発を行った。以下に得られた結果について概括し、結びとする。

第 1 章では、球根ベゴニアの葉挿し繁殖が難しいのは交配親に依存するのではないかと考え、球根性ベゴニア 4 種について、葉身全体を挿し穂とし、水挿しによる不定芽形成能を木立性ベゴニア 15 種、根茎性ベゴニア 23 種と比較した。不定芽形成は根

茎性ペゴニアで優れ、球根性ペゴニアおよび木立性ペゴニアでは極めて劣ることが確認された。なお、原産地、葉の大きさ、葉の厚さおよび葉脈の太さと不定芽形成との間に一定の関係はなく、葉脈の形状（掌状または羽状）および多細胞毛の程度との間には何らかの関連性があるものと考えられた。

第2章では、球根ペゴニアの葉挿しにおける不定芽形成を誘導するために、挿し床および挿し穂の諸条件について検討した。ここでは、若い展開葉を採取し、葉底から放射状に4分割した葉片を挿し穂として用いた。第1節において、挿し床の培地の種類が不定芽形成に及ぼす影響を知るため、パーライト、鹿沼土、パーミキュライト、ロックウール粒状綿およびロックウール成形物の5種類の培地に挿し、不定芽形成の様相を比較した。不定芽形成率は、パーライト、鹿沼土、パーミキュライトおよびロックウール粒状綿で20%以下であったのに対し、ロックウール成形物では50%であり、ロックウール成形物が他の培地よりも不定芽形成に適していることが示された。また、葉挿し時期を4月8日、5月20日、7月29日および10月13日と変えたところ、不定芽形成率は4月と10月では60%以上であったが、7月では13%で低く、不定芽形成は高温によって抑制されることが示唆された。次に、葉挿し時の温度を15、20、25および30°Cと変えたところ、不定芽形成のための適温は15～20°C付近にあることが明らかになった。

第2節において、球根ペゴニア‘ティネラ’を供試し、葉柄5mmをつけて葉身全体を切り取った葉柄つき全葉、その全葉の葉身部を5×4cmあるいは2×1.5cmに切り詰めた葉柄つき小葉片、葉柄を切り離して葉身を2×1.5cmに切り詰めた小葉片、および葉底から2cm離れた位置で葉先に向かって切り出した2×1.5cm小葉片の5種類の挿し穂を用意し、挿し穂の部位および大きさが不定芽形成に及ぼす影響について検討した。葉挿しの培地には、ロックウール成形物と同じ材質で小型のロックファイバーミニポット（商品名）を用い、これをプラスチック容器に入れて底面から給水した。その結果、全葉挿しでは73%の挿し穂で不定芽形成が認められたが、他の挿し穂では発根はみられたものの、不定芽形成は全く認められず、挿し穂が小さいと採取部位にかかわらず、不定芽を形成しないことが示された。さらに、球根ペゴニアの他品種においても、小葉片挿しでは不定芽を全く形成しないことが分かった。

第3章では、小葉片挿しで不定芽形成を促すことを目的とし、植物成長調節物質処理の効果について検討した。第1節において、NAA(0, 0.01, 0.1, 0.25, 0.5 ppm)またはBA(0, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 ppm)溶液を単独で添加したロックファイバーミニポットに2×1.5cmの小葉片を挿したところ、植物成長調節物質無添加区では20%前後の小葉片が褐変、枯死し、生存葉片においても不定芽を形成するものは全くみられなかった。これに対してNAAを添加すると、0.1 ppm以上の濃度ですべての小葉片が黄化して枯死した。一方、BAを添加すると、0.25 ppm以上の濃度で小葉片の褐変が抑制され、80%の小葉片が不定芽を形成した。また、0.5 ppm BAの存在下で0.1～0.5 ppm NAAを添加した場合には、黄化することなく高い生存率を維持したが、カルス形成が促されて不定芽形成の開始が遅れた。

この葉挿し中に発生した小葉片の黄化と褐変現象に関与する要因については第2節において検討した。まず、0.5 ppm NAA添加、0.5 ppm BA添加あるいは無添加の小葉片について、葉挿し中の総クロロフィル含量およびエチレン生成量を比較した。葉挿し10日後の総クロロフィル含量は、黄化が著しかったNAA区において葉挿し開始時よりも8.8 mg/100 g FW減少した。エチレン生成量はNAAおよびBAの添加に関係なく葉挿し中を通じて低い値を示した。また、褐変のみられなかったBA添加区と褐変の著しかった無添加区の小葉片における総ポリフェノール含量の経時変化を調べたところ、両区とも葉挿し後の日数経過とともに増加したが、その程度はBA区よりも無添加区で大きかった。これらの結果、小葉片の黄化は培地へのNAA添加により引き起こされるが、このクロロフィルの分解はエチレン生成によって誘導されるものではないこと、またBA添加は小葉片の切り出しに伴って起こるポリフェノール含量の増加を抑制し、褐変を回避することが分かった。

第4章第1節では、不定芽形成に母株栽培時の日長が不定芽形成に及ぼす影響について知ろうとした。あらかじめ18時間日長下で栽培していた母株を、10月11日に最低夜温を14°C、日長を18時間（長日）または自然日長（短日）に維持したガラス室に移して栽培した。43日後の11月23日に各日長下で栽培していた母株から、挿し穂として2×1.5cmの小葉片を切り出し、0.5 ppm BAを添加したロックファイバーミニポットに挿した。葉挿し後、それ

らを最低 14°C, 18 時間日長または自然日長に維持したガラス室で管理した。その結果, 長日下で栽培した母株からの小葉片では葉挿し時の日長に関係なく高い不定芽形成率を示したが, 短日下で栽培した母株からの小葉片では生存率そのものが低く, 不定芽を形成したのはわずか 14%にとどまった。また, 長日下で栽培した母株の場合, 葉挿し時の日長を長日にすると短日のものと比べて, 不定芽の発達が促された。

第 2 節においては, 1 枚の葉身内のどの部位における小葉片を用いても同様に不定芽形成するかどうかを知るため, 葉底から葉先に向かって 0, 1, 1.5 および 2 cm 離れた位置で 2 × 1.5 cm の小葉片を切り出し, 0.5 ppm BA を添加したロックファイバーミニポットに挿して不定芽形成を比較した。不定芽形成率は, 葉底を含む小葉片で 87%と高かったが, 葉底から離れるにつれて低下し, 2 cm 離れた位置の小葉片では 0%であった。

多くの個体再生を図るためには, 1 枚の葉身から多くの挿し穂をとることが必要である。そこで, 先の実験で不定芽形成率が 0%であった, 葉底から 2 cm 離れた位置の小葉片に焦点を当て, 不定芽形成を誘導するための方法として, 垂直挿し(基部側下), 水平挿し(背軸面下)および上下逆挿し(基部側上)の 3 通りの方法で葉挿しを行った。不定芽形成は, 垂直挿しでは全くみられなかったが, 水平挿しでは 60%, 逆挿しでは 80%で認められた。なお, 同小葉片を 0.5 ppm BA と 0.25 ppm NAA を添加したロックファイバーミニポットに逆挿しすると不定芽形成は抑制された。一方, 小葉片基部の主脈の表裏に 100 ppm TIBA を含むラノリンペーストを塗布し, 0.5 ppm BA を添加したロックファイバーミニポットに垂直挿ししたところ, 73%の小葉片で不定芽形成がみられた。これらの結果から, 葉底から離れるにつれて不定芽形成率が低下するのは, 分裂組織が存在しないからではなく, 小葉片内のオーキシンと

サイトカイニンのバランスが不定芽形成に適していないことによるものと考えられた。すなわち, 葉底を含まない小葉片においても, 逆挿しするかまたは TIBA 処理を施してそのホルモンバランスを変化させれば, 不定芽形成を促せることが明らかになった。

本研究で取り扱った小葉片挿しにより再生した個体について, 遺伝的変異の可能性を第 3 節で調査した。まず, 不定芽の発生起源についての組織観察を行ったところ, 不定芽はカルスを経由せずに表皮細胞および垂表皮細胞が分裂を開始して器官分化したものであることが明らかになった。次に, 小葉片挿しによって得られた 10 個体について 11 項目の形態的特徴を母株と比較したところ, すべての項目において類似していることが確かめられた。さらに, 体細胞の染色体数を比較したところ, $2n=28$ で一致するとともに核型の特徴も共通しており, 染色体レベルでの変異はないものとみなされた。

最後に, ここまでで得られた方法が, 第 1 章において葉挿し繁殖が困難であった他のベゴニア類にも適用できるかどうかを第 4 節で検討した。すなわち, 球根性ベゴニアおよび木立性ベゴニア計 13 種について, 葉底を含む 2 × 1.5 cm の小葉片を, 0.5 ppm BA を添加したロックファイバーミニポットに垂直挿ししたところ, 木立性ベゴニアの 2 種を除き, 高い割合で不定芽形成がみられた。不定芽形成のみられなかった木立性ベゴニアの 2 種については, 逆挿しを行うことによって不定芽形成率を 93%および 73%まで高めることができた。

以上, 本研究では, 優良形質の保存および増殖ができずに栄養繁殖方法の確立が待たれていた球根ベゴニアについて, 不定芽形成を誘導する諸要因を明らかにし, 効率的な小葉片挿しの方法を見出した。この *in vitro* に頼らない小葉片挿しの技術は実用的であり, 鉢花生産の拡大に大いに貢献するものと期待できる。

謝 辞

本研究の遂行および取りまとめにあたり, 終始懇切なご指導とご討論を賜りました大阪府立大学大学院生命環境科学研究科 教授 森源治郎博士に謹んで感謝の意を表します。また, 本論文の取りまとめにあたり, 有益なご助言を賜りました大阪府立大学大学院生命環境科学研究科 教授 小田雅行博士, 同教

授 池田英男博士に対し, 心より感謝申し上げます。

また, クロロフィル含量, エチレン生成量およびポリフェノール含量の測定に当たっては, 大阪府立大学大学院生命環境科学研究科 講師 今堀義洋博士に懇切なご指導をいただきました。併せて, 広島県立農業技術センターの施設を利用させていただき,

生物工学研究部長 長久逸氏, 環境資源研究部長 若山譲氏, 花卉部長 勝谷範敏博士および生物工学研究部研究員 古田貴音氏に多大なご協力を賜りました。さらに鈴峯女子短期大学の施設も利用させていただき, 教授 榊井秀雄博士には丁寧なご指導とご便宜を賜りました。ここに謹んで感謝の意を表します。

本研究の多くは広島市植物公園において実施され, その遂行にあたっては同公園職員の方々のご理解とご協力を賜りました。特に, 植物公園長 石田

源次郎博士, 栽培・展示課長補佐 世羅徹哉博士には適切なご助言と暖かい励ましの言葉をいただきました。また技師 尾崎健司氏, 元技術員 大寄忠氏には多大なご援助をいただきました。ここに深く感謝の意を表します。

最後に, 多大なご助力をいただきました大阪府立大学大学院生命環境科学研究科植物繁殖工学研究室の諸氏と, いつも変わらず支えて下さった私の家族に心より感謝いたします。

引用文献

- Appelgren, M. 1985. Effect of supplementary light to mother plants on adventitious shoot formation in flower peduncle segments of *Begonia* × *hiemalis* Fotsch *in vitro*. Sci. Hortic. 25: 77-83.
- Arnold, S. and E. Tillberg. 1987. The influence of cytokinin pulse treatments on adventitious bud formation on vegetative buds of *Picea abies*. Plant Cell, Tiss. Org. Cult. 9: 253-261.
- Baardseth, P. and J. H. Von Elbe. 1989. Effect of ethylene, free fatty acid, and some enzyme systems on chlorophyll degradation. J. Food. Sci. 54: 1361-1363.
- Beck, M. J. and N. D. Camper. 1991. Shoot regeneration from petunia leaf discs as a function of explant size, configuration and benzyladenine exposure. Plant Cell, Tiss. Org. Cult. 26: 101-106.
- Belaizi, M., H. Paul, R. S. Sangwan and B. S. Sangwan-Norreel. 1991. Direct organogenesis from internodal segments of *in vitro* grown shoots of apple cv. Golden delicious. Plant Cell Rep. 9: 471-474.
- Beyer, E. M. Jr. and P. W. Morgan. 1970. Effect of ethylene on the uptake, distribution, and metabolism of indoleacetic acid-1-¹⁴C and -2-¹⁴C and naphthaleneacetic acid-1-¹⁴C¹. Plant Physiol. 46: 157-162.
- Burritt, D. J. and D. W. M. Leung. 1996. Organogenesis in cultured petiole explants of *Begonia* × *erythrophylla*: the timing and specificity of the inductive stimuli. J. Exp. Bot. 47: 557-567.
- Cassels, A. C. and F. M. Morrish. 1987. Variation in adventitious regenerants of *Begonia rex* Putz. 'Lucille Closon' as a consequence of cell ontogeny, callus ageing and frequency of callus subculture. Sci. Hortic. 32: 135-143.
- Chlyah, A. and M. Tran Thanh Van. 1975. Differential reactivity in epidermal cells of *Begonia rex* excised and grown *in vitro*. Physiol. Plant. 35: 16-20.
- Chlyah, A. and M. Tran Thanh Van. 1984. Histological changes in epidermal and subepidermal cell layers of *Begonia rex* induced to form de novo unicellular hairs, buds and, roots. Bot. Gaz. 145: 55-59.
- Clarke, S. F., P. E. Jameson, and C. Downs. 1994. The influence of 6-benzylaminopurine on post-harvest senescence of floral tissues of broccoli (*Brassica oleracea* var. *Italica*). Plant Growth Regul. 14: 21-27.
- Cook, D., M. Rasche and W. Eisinger. 1985. Regulation of ethylene biosynthesis and action in cut carnation flower senescence by cytokinins. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 110: 24-27.
- Costa, M. L., P. M. Civello, A. R. Chaves and G. A. Martinez. 2005. Effect of ethephon and 6-benzylaminopurine on chlorophyll degrading enzymes and a peroxidase-linked chlorophyll bleaching during post-harvest senescence of broccoli (*Brassica oleracea* L.) at 20°C. Postharvest Biol. Technol. 35: 191-199.
- 大門弘幸・関 栄一・伊藤靖之・藤家 梓・遠藤宗男. 1993. エラチオール・ベゴニアの組織培養による優良変異系統 'ローズエルフ' の作出. 千葉農試研報. 34: 63-68.
- 土井 環・谷口研至・近藤勝彦・橋本清美. 1992. 苗条原基法を用いた球根ベゴニアの組織培養. 広島市植物公園紀要 14: 51-59.
- Djurhuus, R. 1985. The effect of photoperiod and temperature on growth and development of *Begonia*

- × *tuberhybrida* 'Karelsk Jomfru'. Sci. Hortic. 27: 123-131.
- Doorenbos, J., M. S. M. Sosef, and J. J. F. E. de Wilde. 1998. The sections of *Begonia*, including descriptions, keys and species lists. (Studies in Begoniaceae VI). Wageningen Agr. Univ. papers 98-2: 1-266.
- Evans, D. A. and W. R. Sharp. 1986. Somaclonal and gemetoclonal variation. p. 97-132. In: Evans, D. A. and W. R. Sharp and P. V. Ammirato (eds.). Handbook of plant cell culture. Volume 4. Macmillan publishing company, New York.
- Fonnesbech, M. 1974. Temperature effects on shoot and root development from *Begonia* × *cheimanthus* petiole segments grown *in vitro*. Physiol. Plant. 32: 282-286.
- Fonteno, W. C. and R. A. Larson. 1982. Photoperiod and temperature effects on nonstop tuberous begonias. HortScience 17: 899-901.
- Frey L. and J. Janick. 1991. Organogenesis in carnation. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 116: 1108-1112.
- 富士原健三. 1968. 栄養繁殖の基本問題. p. 1-27. 藤井利重 編著. 園芸植物の栄養繁殖. 誠文堂新光社. 東京.
- 福嶋忠昭・村上秀樹・加藤千明. 1993. ダイコンの抽台が収穫後の葉の黄化に及ぼす影響. 園学雑. 61: 933-939.
- Goh, C.-J., P. Lakshmanan, C.-S. Loh. 1994. High frequency direct shoot bud regeneration from excised leaves of mangosteen (*Garcinia mangostana* L.). Plant Sci. 101: 173-180.
- Gosukonda, R. M., C. S. Prakash, and A. P. Dessai. 1995. Shoot regeneration *in vitro* from diverse genotypes of sweetpotato and multiple shoot production per explant. HortScience 30: 1074-1077.
- Haegeman, J. 1979. Tuberous begonias: origin and development. J. Cramer, Berlin.
- Haegeman, J. 1993. *Begonia*-tuberous hybrids. p. 227-238. In: A. A. De Hertogh and Le Nard (eds.). Physiology of flower bulbs. Elsevier. Amsterdam, The Netherlands.
- Hansen, C. E., C. Kopperud and O. M. Heide. 1988. Identity of cytokinins in *Begonia* leaves and their variation in relation to photoperiod and temperature. Physiol. Plant. 73: 387-391.
- Harris, G. P. and E. M. H. Hart. 1964. Regeneration from leaf squares of *Peperomia sandersii* A. DC: a relationship between rooting and budding. Annals of Botany 28: 509-526.
- Hartman, H. T., D. E. Kester, F. T. Davies Jr. and R. L. Geneve. 1997. Plant propagation: Principles and practices. Sixth edition. Prentice hall, Upper Saddle River.
- 林 角郎・室谷優一・安井公一. 1989. ベゴニア属. p. 310-336. 塚本洋太郎 監修. 園芸植物大辞典 4. 小学館. 東京.
- 林 孝洋. 1997. 挿し木苗生産システム. p. 46-49. 今西英雄・田中道男 編著. 園芸種苗生産学. 朝倉書店. 東京.
- Heide, O. M. 1962. Interaction of night temperature and daylength in flowering of *Begonia* × *cheimanthus* Everett. Physiol. Plant. 15: 729-735.
- Heide, O. M. 1964. Effects of light and temperature on the regeneration ability of *Begonia* leaf cuttings. Physiol. Plant. 17: 789-804.
- Heide, O. M. 1965a. Photoperiodic effects on the regeneration ability of *Begonia* leaf cuttings. Physiol. Plant. 18: 185-190.
- Heide, O. M. 1965b. Interaction of temperature, auxin, and kinins in the regeneration ability of *Begonia* leaf cuttings. Physiol. Plant. 18: 891-920.
- Heide, O. M. 1967. The auxin level of *Begonia* leaves in relation to their regeneration ability. Physiol. Plant. 20: 886-902.
- Heide, O. M. 1968. Auxin level and regeneration of *Begonia* leaves. Planta 81: 153-159.
- Heide, O. M. 1969a. Non-reversibility of gibberellin-induced inhibition of regeneration in *Begonia* leaves. Physiol. Plant. 22: 671-679.
- Heide, O. M. 1969b. Interaction of growth retardants and temperature in growth, flowering, regeneration, and auxin activity of *Begonia* × *cheimanthus* Everett. Physiol. Plant. 22: 1001-1012.
- Heide, O. M. and F. Skoog. 1967. Cytokinin activity in *Begonia* and *Bryophyllum*. Physiol. Plant. 20: 771-780.
- Heide, O. M. and W. Rünger. 1985. *Begonia*. p. 4-14. In: A. H. Halevy (ed.). Handbook of Flowering. Volume II. CRC Press Inc, Boca Raton, Florida.
- Hennayake, C. K., K. Dissanayake, N. Matsuda, T. Takasaki and T. Nakanishi. 2003. An Efficient and reproducible *in vitro* plant regeneration from leaf

- discs in pear cultivars (*Pyrus* spp.). Plant Biotechnol. 20: 283-289.
- Herbert, A. C. and B. C. Moser. 1976a. Effect of photoperiodic manipulation on seasonal variation in bud and shoot regeneration of Rieger begonia leaf cuttings. HortScience 11: 376-377.
- Herbert, A. C. and B. C. Moser. 1976b. Environmental control of shoot initiation by Rieger begonia leaf cuttings. HortScience 11: 378-379.
- Hilding, A. and T. Welander. 1976. Effects of some factors on propagation of *Begonia* $\times$ *hiemalis* *in vitro*. Swedish J. agric. Res. 6: 191-199.
- 細木高志. 1997. マイクロプロパゲーション. p. 82-91. 今西英雄・田中道男 編著. 園芸種苗生産学. 朝倉書店. 東京.
- 兵藤 宏. 1994. エチレン. p. 161-201. 高橋信孝・増田芳雄 共編. 植物ホルモハンドブック「下」. 培風館. 東京.
- 飯田孝則・矢部和則・鷺田純彦・桜井雍三. 1986. 球根ベゴニアの組織培養による増殖. 愛知農総試研報. 18: 186-190.
- 飯野盛利. 1994. オーキシシン. 相関と屈性. p. 464-490. 高橋信孝・増田芳雄 共編. 植物ホルモハンドブック「上」. 培風館. 東京.
- 飯塚宗夫. 1979. 内在汚染菌類と培養. p. 221. 竹内正幸・中島哲夫・古谷 力 編. 新植物組織培養. 朝倉書店. 東京.
- Ingles, J. J. 1990. Buxton check list. Revised edition. American begonia society.
- Ingles, J. J. 1997. Addendum to revised edition of the Buxton check list. American begonia society.
- Inskip, W. P. and P. R. Bloom. 1985. Extinction coefficients of chlorophyll *a* and *b* in N, N-dimethylformamide and 80% acetone. Plant Physiol. 77: 483-485.
- Jain, R. K., J. B. Chowdhury, D. R. Sharma and W. Friedt. 1988. Genotypic and media effects on plant regeneration from cotyledon explant cultures of some *Brassica* species. Plant Cell, Tiss. Org. Cult. 14: 197-206.
- 狩野 敦・深澤幸教・青野 守・大川 清. 1992. 挿し穂の齡, 挿し床の種類および挿し木方法が *Stephanotis floribunda* Brongn. の発根に及ぼす影響. 園学雑 61: 619-624.
- Karam, N. S. and M. Al-Majathoub. 2000. Direct shoot regeneration and microtuberization in wild *Cyclamen persicum* Mill. using seedling tissue. Sci. Hortic. 86: 235-246.
- Kiew, R. 2005. Begonias of peninsular Malaysia. Natural history publications (Borneo) Sdn. Bhd, and Singapore botanic gardens, Kota Kinabalu.
- 小泉 力. 1974a. 球根ベゴニアの栽培に関する研究. 第1報. 日長および光中断の照度が生育に及ぼす影響. 千葉農試研報. 14: 75-86.
- 小泉 力. 1974b. 球根ベゴニアの電照栽培. 農と園 29(11): 204-206.
- 小泉 力. 1975. 球根ベゴニアの電照栽培. 農と園 30(10): 140-142.
- 小泉 力. 1977. 球根ベゴニアの生理生態と作型. 農と園 32(11): 136-141.
- Kouider, M., S. S. Korban, R. M. Skirvin, and M. C. Chu. 1984. Influence of embryonic dominance and polarity on adventitious shoot formation from apple cotyledons *in vitro*. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 109: 381-385.
- 甲村浩之・渡邊弥生. 2005. 紫アスパラガス 'パープル・パッション' の全期立茎栽培における生育・収量特性と食味・ポリフェノール含量評価. 近畿中国四国農研. 6: 50-56.
- Kumar, P. P., C. D. Rao, and C.-J. Goh. 1998. Influence of petiole and lamina on adventitious shoot initiation from leaf explants of *Paulownia fortunei*. Plant Cell Rep. 17: 886-890.
- Lakshmanan, P., S. K. Ng, C. -S. Loh and C. -J. Goh. 1997. Auxin, cytokinin and ethylene differentially regulate specific developmental states associated with shoot bud morphogenesis in leaf tissues of mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) cultured *in vitro*. Plant Cell Physiol. 38: 59-64.
- Lane, W. D. 1979. Regeneration of pear plants from shoot meristem-tips. Plant Sci. Lett. 16: 337-342.
- Legro, R. A. H. and J. F. V. Haegeman. 1971. Chromosome numbers of hybrid tuberous begonias. Euphytica 20: 1-13.
- Levan, A., K. Fredga and A. A. Sandberg. 1964. Nomenclature for centromeric position of chromosomes. Hereditas 52: 201-220.
- Lewis, C. A. 1951. Some effects of daylength on tuberization, flowering, and vegetative growth of tuberous-rooted Begonias. Proc. Am. Soc. Hort. Sci.

- 57: 376-378.
- Lo, K. H. 1997. Factors affecting shoot organogenesis in leaf disc culture of African violet. *Sci. Hortic.* 72: 49-57.
- Makhlouf, J., C. Willemot, J. Arul, F. Castaigne, and J. P. Emond. 1989. Regulation of ethylene biosynthesis in broccoli flower buds in controlled atmospheres. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 114: 955-958.
- Mikkelsen, E. P. and K. C. Sink. 1978. *In vitro* propagation of Rieger elatior begonias. *Hortscience* 13: 242-244.
- Mor, Y., H. Spiegelstein and A. H. Halevy. 1983. Inhibition of ethylene biosynthesis in carnation petals by cytokinin. *Plant Physiol.* 71: 541-546.
- 村田容常・本間清一. 1998. ポリフェノールオキシダーゼと褐変制御—最新の研究動向—. *日食工誌* 45: 177-185.
- 長村智司・ト部昇治. 1976. ベゴニア類の葉ざしにおけるタルク法による 6-benzylaminopurine と auxin の効果について. *奈良県農業試験場研究報告* 7: 24-30.
- Nakano, M., Y. Niimi, D. Kobayashi and A. Watanabe. 1999. Adventitious shoot regeneration and micropropagation of hybrid tuberous begonia (*Begonia* × *tuberhybrida* Voss). *Sci. Hortic.* 79: 245-251.
- Nakata, M., K. Guan, T. Godo, Y. Lu and J. Li. 2003. Cytological studies on Chinese *Begonia* (*Begoniaceae*) I. Chromosome numbers of 17 taxa of *Beognia* collected in 2001 field studies in Yunnan. *Bull. Bot. Gard. Toyama* 8: 1-16.
- Nehra, N. S., C. Stushnoff and K. K. Kartha. 1989. Direct shoot regeneration from Strawberry leaf disks. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 114: 1014-1018.
- Niederwieser, J. G. and J. van Staden. 1990. The relationship between genotype, tissue age and endogenous cytokinin levels on adventitious bud formation on leaves of *Lachenalia*. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 22: 223-228.
- Odén, P. C. and O. M. Heide. 1989. Quantitation of gibberellins and indoleacetic acid in *Begonia* leaves: Relationship with environment, regeneration and flowering. *Physiol. Plant.* 76: 500-506.
- Oginuma, K. and M. Nakata. 1988. Cytological studies on phanerogams in Southern Peru, I. Karyotype of *Acaena ovalifolia*. *Bull. Natn. Sci. Mus., Tokyo, Ser. B*, 14: 53-56.
- Oka S. and K. Ohyama. 1981. *In vitro* initiation of adventitious buds and its modification by high concentration of benzyladenine in leaf tissues of mulberry (*Morus alba*). *Can. J. Bot.* 59: 68-74.
- Oloomi, H. and R. N. Payne. 1982. Effects of photoperiod and pinching on development of *Begonia* × *tuberhybrida*. *HortScience* 17: 337-338.
- 大宮あけみ・土師 岳. 2001. モモ果肉ディスクにおけるオーキシン誘導エチレン. *園学雑.* 70 別 2: 111.
- Peck, D. E. and B. G. Cumming. 1984. *In vitro* propagation of *Begonia* × *tuberhybrida* from leaf sections. *HortScience* 19: 395-397.
- Powell, M. C. and A. C. Bunt. 1980. The appearance and development of buds on leaf cuttings of *Begonia* × *hiemalis* in long and short days. *Sci. Hortic.* 12: 377-384.
- Raju, M. V. S. and H. E. Mann. 1970. Regenerative studies on the detached leaves of *Escheveria elegans*. Anatomy and regeneration of leaves in sterile culture. *Can. J. Bot.* 48: 1887-1891.
- Ringe, F. and J. P. Nitsch. 1968. Conditions leading to flower formation on excised *Begonia* fragments cultured *in vitro*. *Plant & Cell Physiol.* 9: 639-652.
- 斉藤 清. 1974. 倍数性育種法. p. 658-662. 育種ハンドブック. 松尾幸嶺 監修. 養賢堂. 東京.
- Sharma K. K., S. S. Bhojwani and T. A. Thorpe. 1990. Factors affecting high frequency differentiation on shoots and roots from cotyledon explants of *Brassica juncea* (L.) Czern. *Plant. Sci.* 66: 247-253.
- 島田有紀子・大嵯 忠・橋本清美. 1999. 球根ベゴニアの組織培養における発根方法の改善. *広島市植物公園紀要* 18: 67-70.
- Simmonds, J. A. and S. D. Nelson. 1988. Adventitious bud production on explants of *Begonia* × *hiemalis* depends on the developmental state of the donor plant. *Physiol. Plant.* 73: 360-367.
- Simmonds, J. A. and S. D. Nelson. 1989. Improved micropropagation of *Begonia* × *hiemalis* by maintaining donor plants in long-day conditions. *Hortscience.* 24: 831-832.
- Simmonds, J. A. and T. Werry. 1987. Liquid-shake culture for improved micropropagation of *Begonia* ×

- hiemalis*. Hortscience 22: 122-124.
- Smith, D. L. 1989. 栽培培地としてのロックウール. p. 2-13. 野菜・花きのロックウール栽培 (池田英男・篠原 温 共訳). 誠文堂新光社. 東京.
- Stamp, J. A., S. M. Colby, and C. P. Meredith. 1990. Improved shoot organogenesis from leaves of Grape. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 115: 1038-1042.
- Stichel, E. 1959. Gleichzeitig Induktion von Sprossen und Wurzeln an *in vitro* kultivierten Gewebestücken von *Cyclamen persicum*. Planta 53: 293-317.
- Taiz, L. and E. Zeiger. 2004. 植物生理学 (西谷和彦・島崎研一郎 監訳). 第3版. 培風館. 東京.
- Takayama, S. and M. Misawa. 1981. Mass propagation of *Begonia* $\times$ *hiemalis* plantlets by shake culture. Plant & Cell Physiol. 22: 461-467.
- Takayama, S. and M. Misawa. 1982. Factors affecting differentiation and growth *in vitro*, and a mass-propagation scheme for *Begonia* $\times$ *hiemalis*. Sci. Hortic. 16: 65-75.
- 田中 宏・伝法谷一仁・橋本 徹. 1985. 生長調節剤及びSTS処理による花き類の落花とエチレン生成との関係. 玉川大学農学部研究報告 25: 72-82.
- 田中隆荘. 1965. アケボノシユスランにおける種内倍数性. 染色体 60: 1945-1950.
- 田中隆荘. 1980. 核型. p. 335-358. 植物遺伝学 I. 細胞分裂と細胞遺伝. 木原 均 監修. 裳華房. 東京.
- Thompson, M. L. and E. J. Thompson. 1981. Begonias. The complete reference guide. Times Books. New York.
- Tian, M. S., C. G. Downs, R. E. Lill, and G. A. King. 1994. A role for ethylene in the yellowing of broccoli after harvest. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 119: 276-281.
- 角田昌一・萩原信義. 1986. ベゴニアの花および花弁からの不定芽形成について. 千葉県農業大学校研究紀要 2: 1-6.
- Vicentini, F., S. Hortensteiner, M. Schellenberg, H. Thomas, and P. Matile. 1995. Chlorophyll breakdown in senescent leaves: Identification of the biochemical lesion in a stay-green genotype of *Festuca pratensis* Huds. New Phytol. 129: 247-252.
- Viseur, J. and C. Lievens. 1987. *In vitro* propagation and regeneration of plants from calluses of *Begonia* $\times$ *tuberhybrida*. Acta Hort. 212: 705-709.
- Welander, T. 1977. *In vitro* organogenesis in explants from different cultivars of *Begonia* $\times$ *hiemalis*. Physiol. Plant. 41: 142-145.
- Welander, T. 1979. Influence of medium composition on organ formation in explants of *Begonia* $\times$ *hiemalis* *in vitro*. Swedish J. Agric. Res. 9: 163-138.
- Welander, T. 1981. Effect of polarity on and origin of *in vitro* formed organs in explants of *Begonia elatior* hybr. Swedish J. Agric. Res. 11: 77-83.
- Welander, M. 1988. Plant regeneration from leaf and stem segments of shoots raised *in vitro* from mature apple trees. J. Plant Physiol. 132: 738-744.
- Welander, M. and G. Maheswaran. 1992. Shoot regeneration from leaf explants of dwarfing apple rootstocks. J. Plant Physiol. 140: 223-228.
- Yamane, K., E. Kuchii, N. Fujishige, N. Minegishi and R. Ogata. 1997. Effects of BA pretreatment on vase life, ethylene production, and soluble sugar contents in cut florets of four members of the *Cattleya* Alliance. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 65: 801-807.
- Yamauchi, N. and A. E. Watada. 1998. Chlorophyll and xanthophyll changes in broccoli florets stored under elevated CO₂ or ethylene-containing atmosphere. HortScience 33: 114-117.
- Yamauchi, N., S. Iida, T. Minamide and T. Iwata. 1985. Foliage yellowing by peroxides in stored spinach. (Mechanism of chlorophyll degradation in harvested leaf vegetables. Part II). J. Japn. Soc. Food Sci. & Technol. 32: 814-817 (In Japanese summary).
- 吉江清朗. 1980. 球根ベゴニア. 新花卉 105: 28-32.
- Zieslin, N., C. Kopperud, O. M. Heide and R. Moe. 1984. Effects of temperature and gibberellin on the activity of endogenous cytokinin-like substances in leafves of *Begonia* $\times$ *cheimanthus*. Physiol. Plant. 60: 92-97.
- Zimmerman, R. H. and I. Fordham. 1989. Explant orientation affects axillary shoot proliferation of apple cultivars *in vitro*. HortScience 24: 351-352.