

十字花科作物の交雑不適合性に  
関する雑育遺伝学的研究

猪俣伸道

— 1972 —

1

十字花科作物の交雑不適合性に関  
する雑種育種学的研究

目 次

I	緒 言	-----	4
II	実験材料	-----	21
III	実験方法および結果	-----	27
A.	2倍体 <u>Brassica campestris</u> L. ssp. <u>chinensis</u> (L.) Makino と同属4倍体 <u>Brassica campestris</u> L. ssp. <u>pekinensis</u> (Lour.) Olsson の交雑不 適合性に関する研究		
(1)	胚発生学的研究	-----	27
(i)	自然条件における胚発生	-----	28
(ii)	胚珠の人工培養に伴う胚 発生	-----	48
(iii)	子房の人工培養に伴う胚 発生	-----	58
(2)	器官の人工培養による雑種植物		

の育成	-----	100
(i) 自然状態による交雑結果	-----	100
(ii) 胚培養	-----	106
(iii) 胚珠の人工培養	----	114
(iv) 子房の人工培養	----	121
(v) 子房の人工培養による新 型+プスの育成	----	181
(3) 交雑不和合性の生理学的研究	-----	226
(i) 子房の培養条件の検討	-----	227
(ii) 2倍体 <u>Brassica campestris</u> L. ssp. <u>chinensis</u> (L.) Makino と 同質4倍体 <u>Brassica</u> <u>campestris</u> L. ssp. <u>pekinensis</u> (Lour.) Olsson の間の交雑不 和合性における遊離アミ ノ酸の消長	-----	248
(4) 考察および論議	-----	259

- (i) 胚発生学的研究 ---- 259
- (ii) 器室の人工培養による雑  
種植物の育成 ---- 274
- (iii) 交雑不適合性の生理学的  
研究 ----- 300

B. Raphanus sativus L. の 2 倍体とその同質 4  
倍体の交雑不適合性に関する研究  
----- 309

- (1) 胚発生学的研究 ----- 309
- (2) 子房の人工培養 ----- 327
- (3) 考察および論議 ----- 335

IV 摘 要	-----	341
謝 辞	-----	350
引用文献	-----	351
英文摘要	-----	362



## I 緒 言

重複受精は被子植物特有の受精様式である。胚嚢に花粉管が到達すると、2個の精核がそれぞれ卵核および極核と合体する現象で、卵核と精核の合体を生殖受精、極核ともう1つの精核との合体を栄養受精と"、両者を合わせて重複受精と呼んでいる。被子植物にあるのは、この重複受精の過程において、他の生物にみられない特有の現象が起つてくる。その1つに不稔の現象がみられる。

高等植物における不稔の現象は(1)花粉が雌蕊の上で全く発芽しない場合、(2)発芽はするが花粉管が花柱の中を或る程度までしか伸びずに止つてしまう場合、(3)花粉の発芽と花粉管の伸長は正常にみられるが、精核が胚嚢に入れないで受精が行なわれない場合、(4)受精は行なわれるが、胚珠の発達が途中で止まつてしまう場合、(5)種子は形成されるが、それが発芽しない場合、等に分けて考へることが出来る。これら

の不稔現象は「すべての場合でも植物体間の遺伝的又は生理的作用の支配を受けらるゝことが多し」。

不稔現象を大きく5つに分けて存在かぞ、特に重複受精と密接な関係にあるものは、(4)の受精は行なわれるが、胚珠の発達が途中で止まってしまう場合がある。こののは受精後胚や胚乳の初期の発達は正常にみられるが、胚と胚乳との遺伝的な不均衡のために、やがて胚嚢の崩壊が起さるゝのが認められるからである。この現象は種属間交雑、倍數性の異なる間の交雑の両方又は1方の組合せにおいて頻繁にみられるものである。

種属間交雑では、胚・胚乳・胚珠の組織との間の関係は異質のものとの結合であるが、2倍体個体ととの同質4倍体個体との間の正逆交雑を行つたとき、胚・胚乳・胚珠の組織との間には、同一ゲノムの倍數性の関係が生じてくる(表1)。2x x 2x 或いは 4x x 4x の交配では、胚・胚乳と胚珠の間のゲノムには2:

3 : 2 の比例関係が成り立つ。このように関係が成立する倍數体間の交配であつては稔性のある種子が形成される。一ネ  $2x \times 4x$  では胚乳・胚珠の  $4/4$  構成の比例関係は 3 : 4 : 2 となり、 $4x \times 2x$  では 3 : 5 : 4 となる。このように胚・胚乳・胚珠の  $4/4$  構成の比が 2 : 3 : 2 からずれてくると、種子形成は異常をきたしてくるのである。

更にこの関係を吟味してみると、 $2x \times 4x$  の胚では 1  $4/4$  を母ネから、2  $4/4$  を父ネから受け取つて 3 倍体を形成する。一ネ  $4x \times 2x$  では 2  $4/4$  を母ネから、1  $4/4$  を父ネからもらつて 3 倍体を形成する。両者共に同一  $4/4$  をもつて 2 倍体と同質 4 倍体との交雑であれば、どちらを母ネにしてもらへる 3 倍体雜種の胚は遺伝的に内容の同じ 3 倍体になる。ところが胚乳の形成を考えると、 $2x \times 4x$  では 2  $4/4$  を母ネから、2  $4/4$  を父ネから受けることになるが、 $4x \times 2x$  では 4  $4/4$  を母ネから、1  $4/4$  を父ネからもら

Table 1. Genome relationships among embryo, endosperm, and ovule in reciprocal crosses between  $2x$  and  $4x$

Cross	No. of Genomes in embryo		Total no. of genomes in embryo	No. of genomes in endosperm		Total no. of genomes in endosperm	No. of Genomes in ovule
	From female	From male		From female	From male		
$2x \times 2x$	1	1	2	2	1	3	2
$2x \times 4x$	1	2	3	2	2	4	2
$4x \times 4x$	2	2	4	4	2	6	4
$4x \times 2x$	2	1	3	4	1	5	4

うニとに存つてくる。このように胚乳の関係はどちらを母ネにしたかでゲノム構成が異なるので、交雑して種子形成がうまくいかないのは、胚自体の問題のほか、このような胚乳のより複雑な関係に起因してゐる場合が多い。特に同価倍数体同士の間交雑において一ネの親と母ネにしたときに稔性のあつた種子が得られるが、他ネを母ネにしたときには不稔に存するという場合には、明らかに上述し得る如く胚乳にその原因があると考へてよいであらう。

ニニでは受精と初期の胚発生は正常に起るが、以後稔性の異常と引き起して不稔種子を形成する現象を交雑不適合性と定義して種々の角度から論究してみたい。

ニニで述べる交雑不適合性の研究を行う材料は Brassica 属の數種類と Raphanus 属の4種類である。

アブラナ属 (Brassica) に属する作物は、日本人の食生活には欠かせない重要なもので、

Table 2. Relationship among several species of genus Brassica as to their chromosome number and genome constitution

Species	Chromosome number ( $2n$ )	Genome formula ( $2n$ )	Reference
<u>B. campestris</u> L.	20	aa	Karpechenko, 1922
<u>B. nigra</u> Koch	16	bb	Karpechenko, 1922
<u>B. oleracea</u> L.	18	cc	Karpechenko, 1922
<u>B. juncea</u> Coss.	36	aabb	Shimotomai, 1925
<u>B. napus</u> L.	38	aaacc	Morinaga and Fukushima, 1930 Nagai and Sasaoka, 1930
<u>B. carinata</u> Braun	34	bbcc	Morinaga and Fukushima, 1930 Nagai and Sasaoka, 1930

表2に示されるように6群に大別することは出来(細田1961)(表2)。これによつて明らかになるように、B. juncea は B. nigra と B. campestris との異質倍数体であり、B. napus は B. oleracea と B. campestris との異質倍数体であり、また B. carinata は B. nigra と B. oleracea との異質倍数体である。B. oleracea群の形態的多様性は著しく、多数の栽培品種に分化している。おもな栽培種と摘記してみると、次のようである。

<u>B. oleracea</u> L. var. <u>acephala</u> DC.	釋葉甘藍, 羽衣甘藍
" " <u>botrys</u> L.	花椰菜
" " <u>bullata</u> DC.	縮緬甘藍
" " <u>capitata</u> L.	(結球)甘藍
" " <u>gongylodes</u> L.	球莖甘藍
" " <u>gemmifera</u> Zenker	子持甘藍

(細田 1961)

また B. campestris群の種にも、これまた多数の栽培品種があり、次のように分類される。

B. campestris L. 油料作物のアブラナ

B. rapa L. 食用または飼料用根菜のカ  
ブ

B. pekinensis Rupr. 葉菜のハクサイ

B. chinensis L. タイナの類

B. nipposinica Bailey ミズナ

B. narinosa Bailey ヒサゴナ

しかしながら、これらを種として独立させるよりは亜種または変種として一括しなおが好ましいということから、最近 Olsson (1954) は B. campestris 群を次のように分類した。

B. campestris L. ssp. eu-campestris (L.) Olsson

野生種

" " oleifera (Metzg) Sinsk.

アブラナ

" " rapifera (Metzg) Sinsk.

カブ

" " chinensis (L.) Makino

タイナ

" " pekinensis (Lour.) Olsson



ハクサイ

B. campestris L. ssp. narinosa (Bailey) Olsson

ヒサゴナ

" " nipposinica (Bailey) Olsson

ミズナ

" " dichotoma (Boxb.) Olsson Toria" " trilocularis (Boxb.) Olsson Sarson

このうち、ssp. eu-campestris (野生種)、ssp. dichotoma (Toria) および ssp. trilocularis (Sarson) の 3 亜種は、本邦にはほとんどみられなく (細田 1961)。

Brassica 属の場合は大きく 3 つの項目について研究を行なった。即ち (1) 胚発生学的研究、(2) 器官の人工培養による雑種植物の育成、(3) 交雑不適合性の生理学的研究、である。一方 Raphanus 属においては、胚発生学的研究と子房の人工培養、との 2 項目について研究を行なった。

高等植物における交雑不適合性の現象は種間交雑や倍数性の異なる植物の間での交雑で

は良くみられることである。種間交雑や正逆交雑の一方或は両方におこるみられる不稔の現象は、Galeopsis (Müntzing 1930, 1933), Avena (Kihara and Nishiyama 1932), Triticum (Watkins 1932, Wakakuwa 1934, Boyes and Thompson 1937), Medicago (Brink and Cooper 1939, Ledingham 1940), Nicotiana (Cooper and Brink 1940), Hordeum x Secale (Brink et al. 1944, Cooper and Brink 1944), Datura (Satina et al. 1950), Solanum (Beamish 1955, Lee and Cooper 1958), Amaracea (Stokes 1955), Gossypium (Weaver 1957, 1958), Aegilops and Triticum (Nishikawa 1959), Primula (Woodel 1960a, b), Melilotus (Jaranowski 1962a), Lupinus (Jaranowski 1962b, c), Lotus (Jaranowski and Wojciechowska 1963), Brassica (Moue and Murakami 1965), 等に見られ、2倍体と同級4倍体との正逆交雑では、Brassica (Howard 1939), Datura (Sansome et al. 1942), Lycopersicon (Cooper and Brink 1945), Secale (Håkansson and Ellerström 1950), Zea mays (Cooper 1951), Raphanus (Nishiyama 1952a), Brassica (Nishiyama and Inamori 1952, 1953), Hordeum (Håkansson 1953), 等におこる観察されたりする。

胚発生学的な立場からは、Brassica campestris 群の倍數性の異なる個体間の正交交雑における、交雑不和合の胚発生の組織学的な研究がなされた。この研究は高等植物の重複受精の立場から重要であると思われた。また胚珠または子房の人工培養による途中の発育段階における胚発生の研究も重要であると考え、これ等の研究を行なった。

器官の人工培養による雜種植物の育成については、大きく3つに分けた。(1)胚培養 (2)胚珠の人工培養、(3)子房の人工培養である。

胚培養は2つの面において重要である。その1つは育種の面において、有用な雜種を作成してゆく方法として重要性があり、他方は胚の形態形成の過程において、種々の養分に対する要求等はその作用を生理学的に明らかにする目的の実験方法としての重要性である。

Datura stramonium の成熟した胚は生長素の面からは完全に独立で、無機物と砂糖を含む単純

在培地で十分に生育するが、発達初期の胚を胚珠から取り去して培養する場合には生長素が要求される。生長素としてはココナットミルクが非常に有効であるが、その成分は主として3つに分けることが出来る。1つは"embryo factor"として細胞分裂を起しさせるものであり、2つは根の生長を阻害するに十分な量が存在するオーキシンであり、3つ目のものは"leaf growth factor"として子葉の生育を助長するものである。これ等一連の研究は Van Overbeek およびその共同研究者 (Van Overbeek et al. 1941, 1942, Van Overbeek 1942) によつてなされた。その後幼胚の成育に有効な物質の研究は数多くの研究者によつて多種類の植物に及ぼされてきた。例之は Datura (Sanders and Burkholder 1948, Solomon 1950, Rietsema et al. 1953, Matsubara 1962), Cattleya (Spoerl 1948), Hordeum (Ziebur and Brink 1951, Norstog 1961), Cucumis と Cucurbita (Nakajima 1962), 等に於てみられるのである。またこれ等一連の研究による "embryo factor" の発見によ

り、胚珠から取り出した胚の人工培養が可能になると、有用な植物体を育成する研究にも取り入れられるべきだ。Laibach (1925, 1929)によれば、Linum perenne x L. austriacum では果実は正常に発育するが、種子は萎縮してしまい、その胚は正常に発達して種子の約 $\frac{1}{2}$ しかなく、しかしながらその胚を取り出して湿度のある濾紙上に置けば、発芽して植物体をつくる。その正逆交雑のL. austriacum x L. perenne では正常種子の約 $\frac{1}{3}$ の胚しかなく、胚を取り出して発芽することはなく、ところが交配後2週間頃に胚を切り出して10~15%の砂糖水を含む綿の上に置けば生長を続け、やがて植物体にまで生育する。Hordeum jubatum x Secale cereale の間の交配においては、受精は交配後4時間後に起こるが、雑種胚は生育せずに崩壊する。しかしながら交配後9-12日目の胚を取り出して人工培地上に置床すれば、成育して植物体を形成する (Brink et al. 1944)。これらのことから、胚発生が途中で止まると

しまりのは遺伝的な要因による。また生理的な異常が原因に存つてゐることが明らかになつた。これ等の研究に基づいて、新しい雑種個体を育成する研究が多く存せられてきた。例えば Frumus と Lilium (Skirm 1942), Datura (Blakeslee and Satina 1944, McLean 1945, 1946, Sanders 1948, 1950, Sachat 1948), Lycopersicon esculentum と L. peruvianum (Smith 1944), Hordeum (Konzak et al. 1951), Chrysanthemum (Kaneko 1957), Oryza (Nakajima and Morishima 1958), Brassica (Nishi et al. 1959), 等である。

胚珠或は子房の人工培養は、胚培養或は植物の組織培養の研究の発展に伴つて、Nitsch (1951) が Lycopersicon と Cucumis の子房の人工培養を試み、生育可能な種子を得てから、胚珠或は子房の人工培養が Maheshwari (1958) や Maheshwari and Lal (1961) によつて受け継がれ、この種の研究が活発になつてきた。そして胚珠或は子房の人工培養は、生殖生理学の立場と胚培養の困難なものからの雑種個体を育成する場合に有効であると思われれる。今まで行なわれた胚

珠或は子房の場合は、ほとんどが生理学的な  
 仕事で、用いられる主な基本培地は Lycopersicon,  
Cucumis (Nitsch 1951), Papaver (Maheshwari 1958), Citrus  
 (Ranja Swamy 1959), Zephyranthes (Sachar and Kapoor 1959),  
Gynandropsis と Impatiens (Chopra and Sabaharwal 1963),  
Allium (Guha and Jonri 1966), Petunia (Shivanna 1965, 中尾 博  
 1969), Trifolium (Nakajima et al. 1969), 等の培養では  
 Nitsch (1951) があり, Hordeum (LaCroi et al. 1962),  
Anethum (Jori and Sehgal 1963), Allium (Guha and Jori 1966)  
Citrus (Sabaharwal 1963), 等は White (1963), Allium  
 (Guha and Jori 1966) 等は Heller (1953), Nicotiana (Dulieu  
 1966) 等は Murashige and Skoog (1962) であつた。

胚培養は胚発生の立場から異常生育をして  
 胚乳や内珠皮の組織を除いて培養すること  
 あるが、胚珠或は子房の培養は胚珠全体を培  
 養することであるから、交雑不融合の現象と  
 考え合わせると、異常が起こってくる胚乳や  
 内珠皮の組織を、正常に生育させようとする試みで  
 ある。受精した極く初期の胚は、胚培養によ

つて雑種個体を作ることは困難である。Datura stramonium x D. mentel においては、受精卵は2回或は3回の分裂後は退化してしまふ (Satina and Blekeslee 1935), また D. prunosa x D. mentel では接合体は分裂せず、胚乳が数回分裂するだけであり、D. menteloides x D. discolor と D. ceratocaulis x D. menteloides の組合では、胚珠は受精し、胚も胚乳も1回目の分裂は正常に行なわれる。胚が球形になつたときに胚乳は崩壊を始め、胚嚢細胞の異常増殖があるため、生育可能な種子を得ることは出来な (Sachet 1948)。これらのものには胚珠或は子房の人工培養を試みることによつて、雑種個体を作り出す可能性がある。

胚珠或は子房の人工培養の生理学的な立場の研究は、胚の或る発育段階のものに培養し得るものが多し。用いた培地の検討も糖濃度、光の条件等によつてこの研究も余りみられな。それ等の研究を行ふことは、今後の胚珠或は子房の人工培養を進展させるためには



必要なことであろう。

不稔現象に関する研究は花粉が柱頭上で発芽、花柱への侵入、伸長の阻害の面の研究、或は不和合遺伝子型による不稔現象の研究等が多い。ここで述べる受精後の胚発生の異常については組織学的研究や交配組合せについての研究は多くの報告がある (Brink and Cooper 1947, Nishiyama and Inomata 1966)。しかしながらこの交雑不和合性に関する生理学的研究は余りなされてない。 Datura の交雑不和合性について、その崩壊した種子の抽出液を正常に発達して同じ Datura の期の4つのうちの1つに注入すると、注入された部位の期の種子が不稔になり、この物質は核酸類似物質であると報告された (Rappaport et al. 1950)。それ以外に蛋白質、アミノ酸等は糖類についての研究はほとんど見当らない。種子形成と遊離アミノ酸の研究は Zea mays の胚乳の発達過程で、時間的变化を追った研究があり (Duvick 1952)、雄性不稔と起る花粉の遊離アミノ酸の消長が調

はらわさる程度である (Fukasawa 1954)。交雑不  
 和合に関する研究のうち、その交雑不和合を  
 克服する研究と合わせ、組織学的な研究と  
 結び付くほどのような物質の変化が胚珠内に  
 起こっているかと研究することは大切である  
 と考えた。

## II 実験材料

本研究に用いた材料は Brassica 属の数種と  
Raphanus sativus 4 種類である。Brassica 属と  
Raphanus の同属 4 倍体は 1951 年西山がコルヒチ  
 ン処理で作った以来、京都大学農学部遺  
 伝学研究室で系統保存してきたもの、東北教育  
 大学農学部植物育種学研究室で作って保存して  
 きたもの、岐阜農業試験場で保存してきたも  
 のである。それ等を表 3 にまとめ示す(表  
 3)。それと同時に本実験に供試した品種名、  
 染色体数、ゲノム構成、および供試種子の由  
 来も記した。

Table 3. Materials used in the experiment

Species	Horticultural variety	No. of chromosomes (2n)	Genome formula (2n)	Origin
<u>Brassica campestris</u> L.	Nikanme-taina Seppaku-taina "	20 20 40	aa aa aaaa	1 1 2
	Nozaki-hakusai No. 2	20	aa	1
	Chifu-hakusai	20	aa	1
	Kyoto-hakusai	20	aa	1
<u>Brassica oleracea</u> L.	Chifu-hakusai	20	aa	1
	Nozaki-hakusai	40	aaaa	2
	Kanamachi-kokabu	20	aa	1
	Wase-komatsuna	20	aa	1
<u>Raphanus sativus</u> L.	Hatana	20	aa	1
	Nozaki-wase	18	cc	1
	Nozaki-chusei	18	cc	1
<u>Raphanus sativus</u> L.	Succession	18	cc	1
	Nakano-wase	18	cc	1
	Mino-wase	18	RR	4
<u>Raphanus sativus</u> L.	Mino-yon	36	RRRR	4
	Shogoin	18	RR	2
	"	36	RRRR	2

- 1: Takii Seed Co.
- 2: Lab. of Genet. Kyoto Univ.
- 3: Lab. of Plant Breed. Pokyo Univ. of Education
- 4: Exp. Stat. of Agric. Gifu Pref.

表3からも明らかなるように2倍体の B. campestris ssp. chinensis と2倍体 B. campestris ssp. pekinensis, B. campestris ssp. rapifera, B. campestris ssp. oleifera は同じゲノム式  $aa$  を持つこととは Morinaga (1934) によつて報告されてゐる。なお Brassica 属には表2に記したように B. oleracea ( $cc$ ) と B. nigra ( $bb$ ) を基本のゲノム型とし、B. juncea Hemsl. ( $2n=36, aabb$ ), B. carinata Braun ( $2n=34, bbcc$ ) と B. napus L. ( $2n=38, aacc$ ) 等の複倍体が成立した。これ等は人間にとつて非常に利用価値の高いものばかりである。

B. campestris ssp. chinensis, ssp. pekinensis, ssp. rapifera, ssp. oleifera は同じゲノム式  $aa$  を持つが、これ等の形態的な差異は明瞭でこれらの間に合成される雑種の識別は容易である。ここでは2倍体 B. campestris ssp. chinensis と同復4倍体 B. campestris ssp. pekinensis の交雑において、胚・胚乳の発生学的な研究を行つたが、これに先立つて同じゲノム構成を持つ B. campestris ssp. chinensis と B. campestris ssp. pekinensis との間

どの  $2x \times 2x$  対には  $4x \times 4x$  の交雑率を調査した。  
その結果を表4に示す(表4)。

表4に示した通り、2倍体同士或は4倍体  
同士の交雑であれば、同じゲノム式  $aa$  を持つ  
もの間では高い種子稔性と発芽率がみられ  
ることが分かった。 $4x \times 4x$  の組合では種子稔  
性は余り高くなかったが、これは雪白体菜の  
4倍体の生育が良く、花粉の発達も余り良くな  
りたためであると思われたが、得た種子の発芽  
率は  $2x \times 2x$  の場合と同様に高かった。

実験にあつては、その材料である B.  
oleracea 群を8月中旬に木箱に播種し、10月初  
めに第一回目の移植を、翌年1月に2回目の  
移植を行ない、屋外に置き、3月終りからガ  
ラス室内に入れ実験に使用した。またその他  
の Brassica 類と Raphanus 類とは10月末から11月初  
めに木箱に播種し、ガラス室内で発芽させ、  
翌年1月の中に第一回目の移植を植木鉢に行  
ない、2月中から末にかけて2回目の移植と  
行ない、屋外に3月終りまで置き、3月末か

Table 4. Results of crossing experiments of 2x and 4x in Brassica campestris L.

Cross	Ploidy	No. of capsules examined	Av. capsule length (mm)	No. of seeds obtained	Seed set (%)	Seed Germination (%)
Nikanme-taina x Nozaki-hakusai No. 2	2x 2x	10	56.5	196	86.3	79.6
Nozaki-hakusai No. 2 x Nikanme-taina	2x 2x	7	59.9	142	85.5	97.9
Seppaku-taina x Nozaki-hakusai	4x 4x	23	48.4	56	15.8	96.8
Nozaki-hakusai x Seppaku-taina	4x 4x	20	50.3	107	19.3	100

らガウス室内に移して、実験に供した。

交雑の方法は、開花2日前と思われる蕾を  
除雄し、硫酸紙の袋で覆い、2日後に開花し  
た花の花物を午前の9時から11時の間に授粉  
に供した。Brassica類では大体1花序当り10花  
を除雄し、当日咲いた花を5花から8花用い、  
他は取り除いた。Raphanus類では1日に咲く花  
の数が少なく5花から6花を除雄し、当日咲  
いた平均の花を用いた。交雑後4日から6日  
まではこれらの花序を硫酸紙の袋で包み、他  
の花との自由な授粉を避けるように注意した。

新型ナプスの育成と子房の培養条件の検討  
以外の実験はBrassica属の場合の交雑は

B. campestris ssp. chinensis ( $2n=20$ ) と B. campestris ssp.

pekinensis ( $2n=40$ ) について次のように行なった。

ssp. chinensis ( $2n=20$ ) x ssp. chinensis ( $2n=20$ )

ssp. chinensis ( $2n=20$ ) x ssp. pekinensis ( $2n=40$ )

ssp. pekinensis ( $2n=40$ ) x ssp. pekinensis ( $2n=40$ )

ssp. pekinensis ( $2n=40$ ) x ssp. chinensis ( $2n=20$ )

なお Raphanus 属の交雑は次のように行なった。

R. sativus ( $2n=18$ ) x R. sativus ( $2n=18$ )

R. sativus ( $2n=18$ ) x R. sativus ( $2n=36$ )

R. sativus ( $2n=36$ ) x R. sativus ( $2n=36$ )

R. sativus ( $2n=36$ ) x R. sativus ( $2n=18$ )

なお植物個体の倍数性の確認は酢酸カーミンの押潰し法で花粉母細胞の中期の染色体を観察して行なった。またハクサイとキャベツの交雑より得た植物体の染色体数の調査は、植物体の根端で行なった。根端は氷水 ( $0^{\circ}\text{C}$ ) で24時間前処理後、アセティックアルコール (氷酢酸1:95%エタールアルコール3) で固定し、フォイルゲン反応で、染色体数を確認した。

### III 実験方法および結果

A. 2倍体 Brassica campestris L. ssp. chinensis

(L.) Makino と同質4倍体 B. campestris L. ssp.

pekinensis (Lour.) Olsson の交雑不適合性に関する研究

(1) 胚発生学的研究



## ( i ) 自然条件下における胚発生

Raphanus sativus (Nishiyama 1952a, b) では  $2x(\sigma) \times 4x(\sigma)$  の交雑において交雑種子が得られたが,  $4x(\sigma) \times 2x(\sigma)$  では小さい交雑種子が得られている。また Brassica 属で同じゲノム構成を有する B. pekinensis, B. chinensis と B. campestris (= B. rapa) では 2 倍種とそれ等の同属 4 倍種の交雑で発芽する種子はほとんど得られたか (Nishiyama and Inamori 1953)。Håkansson (1956) は B. oleracea と B. campestris (= B. rapa) の 2 倍体と同属 4 倍体との正逆交雑を試みた結果, 通常これらの正逆交雑においては, 正常な胚珠の形成があるため発芽する種子は得られたか。また B. oleracea と B. campestris との間の種間交雑においては胚の発達はみられるが, 胚・胚乳の退化が発達初期に起こり, 正常な発芽種子は得られなかった。

これにおいては, 自然条件下における 2 倍体 B. campestris L. ssp. chinensis (L.) Makino と同属 4 倍体の B. campestris L. ssp. pekinensis (Lour.) Olsson

との正逆交雑における胚発生の異常に伴う崩壊と発生学並びに組織学的に観察した。

### 材料および方法

2倍体 = 貧目体菜と同種4倍体個一 → 白菜  
を用いて、 $2x \times 2x$ 、 $2x \times 4x$ 、 $4x \times 4x$  と  $4x \times 2x$  の  
交配を降雄後2日目にはガラス室内で行なつた。

子房は交配後1日、3日、6日、9日、12日、15日、18日と21日目にそれぞれカルノワ液で約10分間固定し、フブツマブアニ氏液で24時間再固定を行なつた。なおブアニ氏液で固定するときには減圧し、固定液が組織の内部によく浸透するように注意した。固定した材料はブタノールニリーズを用いてパラフィンに埋藏し、11~15ミクロンの厚さでパラフィン切片を造り、ハイデンハイニ鉄ミヨハニイマトキシリン染色法によつて染色した。組織中の澱粉粒の観察にはヨード飽和の抱水クロウール液を用いた。

組織切片の観察には顕微鏡を用い、ステックにはカールナグを使用した。

得られた雑種個体については、形態的な観察と併せて染色体数を調査した。

## 結 果

### 2x と 4x の 互 逆 交 雑 と その F<sub>1</sub> 雑 種

各交雑の結果率（得られた種子数 / 全胚産数 × 100）を成熟した莢で調べた（表5）。

Table 5. Results of crossing experiments

Cross	Year	No. of flowers pollinated	No. of capsules examined	No. of seeds obtained	Seed set (%)	Av. capsule length (mm)
2x x 2x	1961	58	57	169	19.8	25.3
	1962	124	89	161	10.1	31.2
2x x 4x	1961	72	72	2*	0.14	34.7
	1962	53	47	0	0.0	41.3
4x x 4x	1961	33	33	275	35.3	57.0
	1962	117	80	591	29.2	41.2
4x x 2x	1961	85	84	27**	1.7	55.0
	1962	122	114	11***	0.4	52.3

\* Both seeds were diploid.

\*\* Out of 27 seeds 24 germinated and gave rise to triploid hybrids.

\*\*\* All 11 seeds were triploid.

$2x \times 2x$  と  $4x \times 4x$  の個体の着粒率はかなり低かったが、これは他殖性作物が系統保存のため自殖せしめるに よる 有 害 存 初 果 と 思 わ れ る。

$2x \times 4x$  の交雑に おいて、多くの胚珠は多少発達の徴候を示したが、胚珠の発達の初期に崩壊してしまつた。  $4x \times 2x$  に おいて も ほとんどの胚珠の発達の早い時期に崩壊してしまつたが、僅かに存からる倍性の交雑種子が得られた。

$2x \times 4x$  の交雑に おいて、2粒の良き種子が得られ発芽した後が、これらより得られた植物は形態的に全く母親の性質のみを示し、また花蕾の細胞に おいて も  $2n=20$  を示したのぞ、自殖にききものと考えられた。  $4x \times 2x$  から得られた倍体の  $F_1$  個体を形態的に観察すると、葉の先端は白菜 ( $2x$ )、葉の厚さと種子の大きさは白菜 ( $4x$ ) 型、着蕾状態は中間型であつた (表 6, 7)。

### 交雑種子の胚発生

胚珠の種の段階で各交配組合せの組織学



Table 7. Morphology of 4x x 2x hybrid plants (1963)

Plant No.	Shape of leaf tip		Leaf thickness		Shape of inflorescence		Seed size		Ploidy
	Notched	Round	Thick	Thin	Compact	Interme- diate	Large	Small	
4	*		*		*		*		4x
2		*		*		*		*	2x
3-1		*	*			*	*	*	3x
3-2		*	*			*	*	*	3x
3-3		*	*			*	*	*	3x
3-4		*	*			*	*	*	3x
3-5		*	*			*	*	*	3x
3-6		*	*			*	*	*	3x
3-7		*	*			*	*	*	3x
3-8		*	*			*	*	*	3x
3-9		*	*			*	*	*	3x
3-10	*		*			*	*	*	3x
3-11	*		*			*	*	*	3x

2: diploid parent, 4: tetraploid parent.

的な観察を行なった。図1には受精した胚珠が正常に発達して、交配後9日目に至ったものの縦断面をスケッチによつて示した(図1)。

I.  $2x \times 2x$  と  $4x \times 4x$  : 交配後1日目では  $2x \times 2x$  にはおいては9個の子房を観察したが、受精したと思われる胚珠はなく、  $4x \times 4x$  では10個の子房のうち僅かに2個の胚珠の受精が認められた。3日目の胚珠では、幼胚は1から2細胞で、その時の胚乳核の数は  $2x \times 2x$  では12から100、  $4x \times 4x$  では20から200であった。 $2x \times 2x$  の胚乳には小さな澱粉粒が数からみられたが、  $4x \times 4x$  では、大きく丸いのをばっきりと観察した。

6日目には、幼胚の細胞数はいずれも2から8細胞で、胚乳核の数は  $2x \times 2x$  で約90から800、  $4x \times 4x$  では100から600であった。胚の周囲の胚乳はかなり密な状態を示した(図4a)。  $2x \times 2x$  よりも  $4x \times 4x$  の方に澱粉粒が多く観察された。

9日目では、胚珠の大きさが大きくなり、

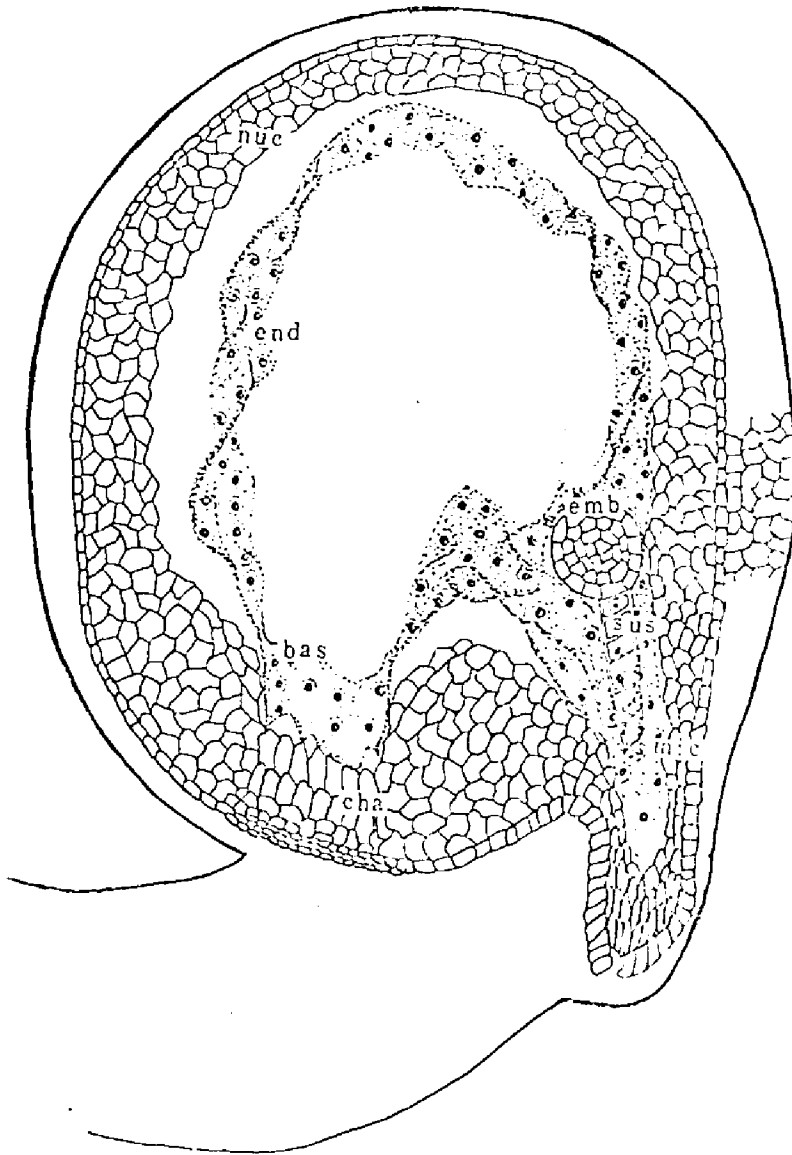


Fig. 1. The transverse section of the whole part of a fertilized ovule. bas: basal endosperm, cha: charazal part, emb: embryo, end: endosperm, mic: micropylar part, nuc: nucellus cells, sus: suspensor.



胚は球型を示した。これ以後の胚の発達は  $2x \times 2x$  よりも  $4x \times 4x$  の方が早く進むことがみられた。胚乳細胞も増加して、胚の回りは相当に密な状態を示したが、また膜形成は認められなかった (図4b)。

12日目になると、胚は球型から "heart" 型に変形し、胚乳の膜形成も胚付近から始まり始めるのがみられた (図4c)。しかし "basal endosperm" はなおも発達を続け、膜形成は起こさなかった。

15日目には、胚の発達は初期から後期の "torpedo" 型まで観察された。胚乳は "basal endosperm" を除くことには膜形成がみられた。"basal endosperm" と胚乳中の澱粉粒は胚の発達がよくなる程減少していきることがみられた。

18日目と21日目、胚は "torpedo" 型から "up-turned U" 型を示し、ほとんど成熟期に達した。胚の発達段階に関しては、"basal endosperm" の量的な差異がかなりみられ、よく発達した胚珠ではほとんど存在しなかった。

II.  $2x \times 4x$  と  $4x \times 2x$  : 顕微鏡観察の結果,  
交配後 1 日目では  $2x \times 4x$  では 10 莖中の 198 粒  
の胚珠で僅かに 20 粒,  $4x \times 2x$  では同じ 10 莖中の  
239 粒の胚珠中に 43 粒の受精した胚珠がみら  
れた。

3 日目では, 正逆交雑とも 1 細胞から 2 細  
胞の幼胚が観察され, いずれの交配でも 10 か  
ら 150 の胚乳核を数えた。澱粉粒は  $2x \times 4x$  では  
 $4x \times 4x$  の交配と同程度で  $F_2$  が,  $4x \times 2x$  では  
特に多く観察された。

6 日目になると, 幼胚の細胞数は 1 細胞か  
ら 15 細胞まで数えられるが, 胚の発達は正逆  
交雑と, 互の両親の交配との間に差異はみら  
れたなかった (表 9, 図 2)。この時期の胚乳  
核は  $2x \times 4x$  では 180 から 1000 で, 対照区 ( $2x$   
 $\times 2x$  と  $4x \times 4x$ ) と較べると, 胚乳の発達は良  
くなつてゐることが分かつたが, 膜形成はまだ  
観察されなかつた。一方  $4x \times 2x$  では, 1 つ  
の胚珠中に約 50 から 350 の胚乳核が観察され  
た。これはいずれの交配よりも核分裂が非常

に遷れさせざることを示してゐる。しかし  
 或る胚珠の胚の周辺の胚乳では膜形成が起さ  
 りてゐるのが観察された(図4m)。また  
 "basal endosperm"の増進も余りみられな  
 が、特別に異常の観察された胚珠は存  
 在した。穀粉粒は $4x \times 4x$ よりも少な  
 が、 $2x \times 2x$ や $2x \times 4x$   
 よりも多く存在した。

交配後9日目、幼胚は球型を呈し対照に  
 ( $2x \times 2x$ ,  $4x \times 4x$ ) と之の互逆交雑との著し  
 き差はみられなかった(表9, 図2)。 $2x \times 4x$   
 の胚乳核の増進の程度は $2x \times 2x$ と $4x \times 4x$ との  
 中間に位置してゐた。 $2x \times 4x$ の胚珠の  
 中には、胚の周りの胚乳に退化現象の初期の  
 ものと思われる小点を、多数の、或は比較的  
 大きな皇胞がみられた(図4d)。 $4x \times 2x$ では  
 全面的に膜形成を起してゐる胚乳がみら  
 れたが、胚の周辺ばかりでなく、胚珠全体に  
 わたり胚乳は非常に少なかった(図4n)。  
 胚乳核の増進は6日目以後ほとんど止ま  
 るようになり(図3)。またこの時期

に、膜形成を起して胚乳が消失して、胚は  
一枚つて萎縮してゐる胚珠を観察された。

12月日には、 $2x \times 4x$  の胚の発達状態は依然  
として球型で、9日目以後  $4x \times 2x$  又は対照区  
( $2x$  と  $4x$ ) と較べて遅れてゐるようには思われ  
た(図2, 表9)。  $4x \times 2x$  の少数の胚は"heart"  
型の段階まで達するものもみられたが、大抵  
のものには球型のままで留まつてゐて、胚柄が  
胚から離れて崩壊してゐるのが観察された(40, 4p)。  
しかし、 $2x \times 4x$  よりもよい発達を  
示してゐた(表5, 図2)。  $2x \times 4x$  の交雑で  
は、胚乳の空腔が胚の周辺部(図4e)のみを  
ならず、胚乳の各部に(図4f)みられた。とし  
て特に胚の周辺(図4g), 或は胚嚢に添つた  
部位(図4h)の胚乳に著し"崩壊が始まつて  
くるのが観察された。"basal endosperm"はほとん  
ど発達してゐることを除けば対照区のもの  
と同じであつた。この時期には、胚乳の  
膜形成はみられなかつた。  $4x \times 2x$  の胚乳の退  
行現象は、この時期には存ると大巾に違ひ、或

る胚珠では種皮が萎縮してしまつて、胚乳が全く観察されなゝものもあり、また他の胚珠ではヘマトキシリンで黄褐色を呈する成分不明の顆粒を含む細胞質が、部分の胚珠の内部に満してゐるもの(圖4p)がみられた。

"basal endosperm"には澱粉粒が認められなかつた。

15日目では、 $2x \times 4x$ の胚は太極は依然として球型を示し、亦亦よと $2x \times 2x$ や $4x \times 4x$ の交配後12日目のものに対応してゐた。観察した胚のうち2, 3の胚珠では胚が"heart"型に達するものもみられたが、胚乳の膜形成はこれらのものでも起こらなかつた。太極の胚乳には巨大核や、多数分散した核殻或は染色物質が観察された。 $4x \times 2x$ の多くの胚珠は胚や胚乳の存在がみられずに、空に存り萎縮してしまつてゐた。

18日目と21日目、 $2x \times 4x$ の胚の発達状態は15日目のものと変わりがなく、胚が既に胚珠から脱落してしまつたと思われるものが多くみられた。この時期になつても胚乳の膜形成

はみらぬが、若し「崩壊」をまぬがれば胚乳の中には、胚乳の周辺に胚乳核が寄つてしまふもの(図4c)や、多くの染色体顆粒を含む巨大核の出現するものが観察される(図4d)。更に崩壊が進行すると、胚乳および胚乳核の崩壊が胚乳全面に起つてくるのがみられる(4e)。また「basal endosperm」も次第に崩壊して来ているのが観察される(図4f)。4x x 2xの交雑では、この時期に存ると胚珠の中味はなくなり、種皮は落しく萎縮してしまつてゐる。

各交雑における胚乳の発達段階の変化を大きくまとめると表8のようになる(表8)。

### 正逆交雑とその両親の交配の胚と胚乳の発達段階の比較

正逆交雑とその両親(2xと4x)の種々の段階での胚の発達状態を、胚の細胞数と大きさで測定した(図2, 表9)。また大きさを測

Table 8 . Endosperm development in 5-21 days after pollination in reciprocal crosses and their parents ( $2x$  and  $4x$ )

Cross	Days after pollination					
	3	6	9	12	15	18 and 21
$2x \times 2x$	developing endosperm			initiating cell wall formation	cell wall formation in whole part	digested
$4x \times 4x$	developing endosperm			initiating cell wall formation	cell wall formation in whole part	digested
$2x \times 4x$	developing endosperm		Many abnormal vacuoles	beginning collapse	abnormalities of nuclei and cytoplasm	
$4x \times 2x$	developing endosperm	initiating cell wall formation	cell wall formation in whole part	beginning degeneration	disintegrated	

Table 9. Comparison of embryo development in reciprocal crosses and their parents  
(2x and 4x)

Cross	Days after pollination						15 Shape	18 and 21 Shape
	3 Range	6 Range (Av.)	9 Range (Av.)	12 Range (Av.)	12 Shape	15 Shape		
2x x 2x	E: 1-2	E: 1-8 (4.44 ± 0.76) S: 3-7 (4.42 ± 0.81)	T: 2-8 (6.14 ± 0.49) L: 2-7 (5.07 ± 0.38) S: 5-7 (6.33 ± 0.18)	T: 10-17 (15.10 ± 0.67) L: 8-18 (14.70 ± 0.89) S: 6-9 (7.67 ± 0.49)	globular-early heart-shape	early "torpedo"- "torpedo"	"torpedo"- "upturned U"	
4x x 4x	E: 1-2	E: 2-8 (4.75 ± 0.72) S: 4-7 (5.12 ± 0.35)	T: 3-12 (6.68 ± 0.42) L: 3-11 (5.92 ± 0.37) S: 6-10 (7.86 ± 0.29)	T: 10-20 (14.10 ± 1.09) L: 9-20 (13.60 ± 1.08) S: 5-10 (7.33 ± 1.76)	globular- heart-shape	"torpedo"- "late torpedo"	"late torpedo"- "upturned U"	
2x x 4x	E: 1	E: 1-15 (5.40 ± 0.53) S: 2-7 (4.61 ± 0.27)	T: 4-8 (5.55 ± 0.25) L: 3-7 (4.60 ± 0.26) S: 6-11 (7.53 ± 0.28)	T: 9-12 (10.00 ± 0.24) L: 5-8 (7.33 ± 0.49) S: 5-8 (7.00 ± 0.65)	globular	globular- "flat top"	globular- "flat top"	
4x x 2x	E: 1-4	E: 2-12 (4.49 ± 0.38) S: 2-8 (4.44 ± 0.35)	T: 4-8 (5.55 ± 0.25) L: 3-7 (4.60 ± 0.26) S: 6-11 (7.53 ± 0.28)	T: 6-18 (12.13 ± 0.88) L: 6-18 (11.42 ± 0.99) S: collapse	globular	globular	disintegrate	

E: Total number of cells in the whole embryo.  
T: Number of cells along the transverse section at central axis of the main body of embryo.  
L: Number of cells along the longitudinal section at central axis of the main body of embryo.  
S: Total number of cells in suspensor.



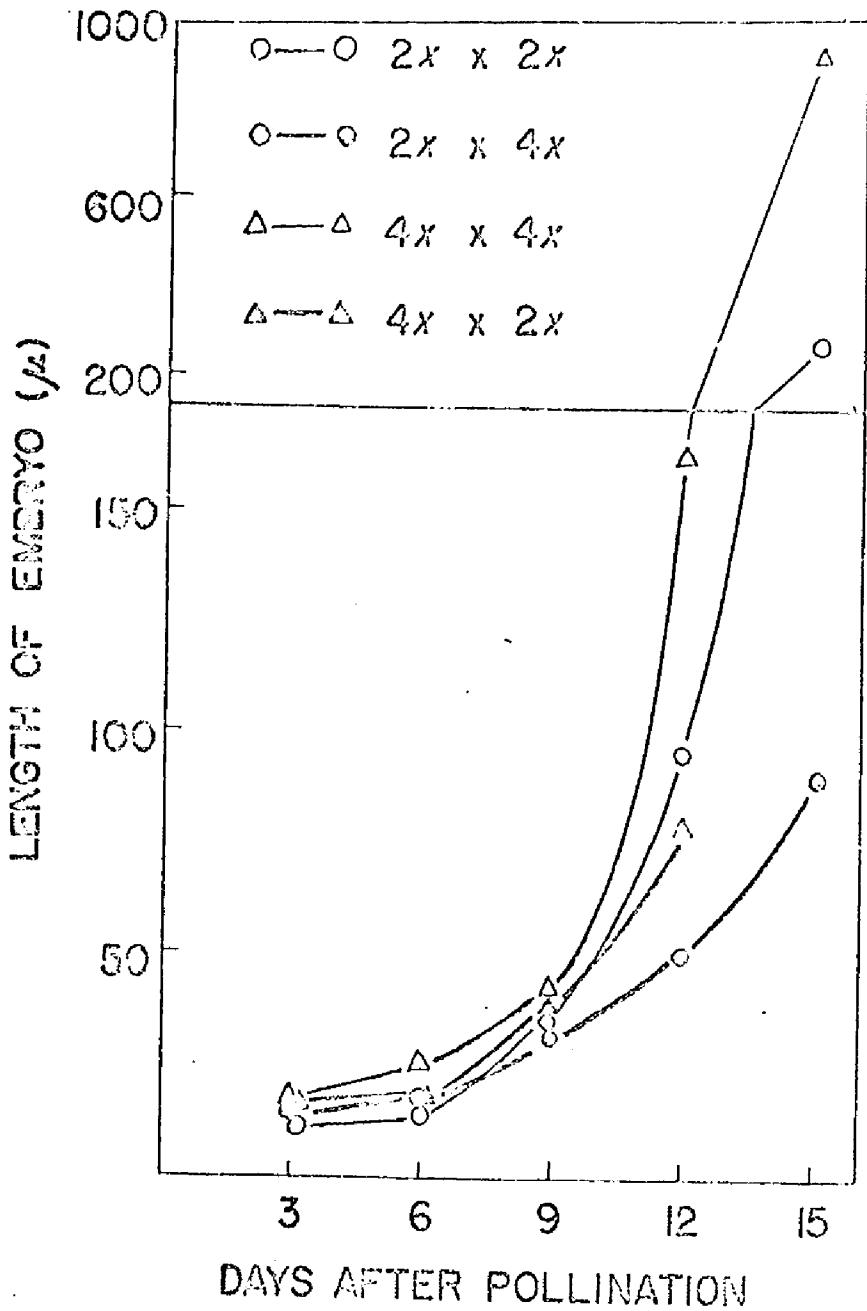


Fig. 2. Growth rate of embryos in reciprocal crosses between diploid *Brassica campestris* (2x) and its autotetraploid (4x).

定し胚珠の数を表10に示した(表10)。表

Table 10. Number of ovules used for measuring the growth rate of embryo

Cross	Days after pollination				
	3	6	9	12	15
$2x \times 2x$	2	5	10	12	7
$2x \times 4x$	5	12	10	9	7
$4x \times 4x$	2	7	10	9	5
$4x \times 2x$	9	10	10	10	-

9の結果のよう  
に、交配後3日  
目から6日目ま  
では、胚の全細  
胞数を調査した  
が、9日目とさ

れ以後では、胚の主軸の縦と横の細胞数のみ  
を調べた。また胚柄の細胞数も合せ測定した。  
9日目の幼胚の細胞数によると、両親ととの  
正逆交雑の間の生育の割合は、大体同程度で  
あるが、12日目には両親の胚は球型から"heart"  
型への変化を示すのに対し、雑種の胚は少し  
発達が遅れ球型のままだ。15日目にな  
ると $4x \times 2x$ では、大概の胚珠が空になつてし  
まうのが観察された。2x x 4xの15日目では、  
僅かの胚は"flat top"型まで発達したが、大概  
のものは球型のままだが発達が非常に遅れるか、  
或はほとんど止まつてしまった。胚柄の長さ  
は特に観察されなかったが、 $4x \times 2x$ にあつて

のみ崩壊して胚から離脱するものが観察された。

交配後1日目から9日目までの胚乳核の数を測定し、その平均値を図3に示した。またこれを用いて胚珠の数を表11に挙げた(図3, 表11)。

交配後1日目から3日目までは、胚乳核の平均値の差はほとんどこの交配の間でもみられなかった。6日目には胚乳核の最も多い組合せは $2x \times 4x$ で、最も少ないものは $4x \times 2x$ であった。両親の $2x \times 2x$ と $4x \times 4x$ は大体同じで、互に交雑の中間の値を示した。しかしながら9日目になると $2x \times 2x$ の胚乳核の数は $2x \times 4x$ と $4x \times 4x$ よりも多くなるのが分かった。胚乳核の発達の差は2倍性と4倍性とによって特徴づけられるといえる。交配後6日目という初期の発達段階では、花粉親に用いた個体が、母親に使用された個体よりも多い染色体数( $2x \times 4x$ )を持つときは、胚乳の発達速度は増加する。また母親に用いた個体よりも花粉親に用いた個体の染色体数が少ないとき( $4x \times$

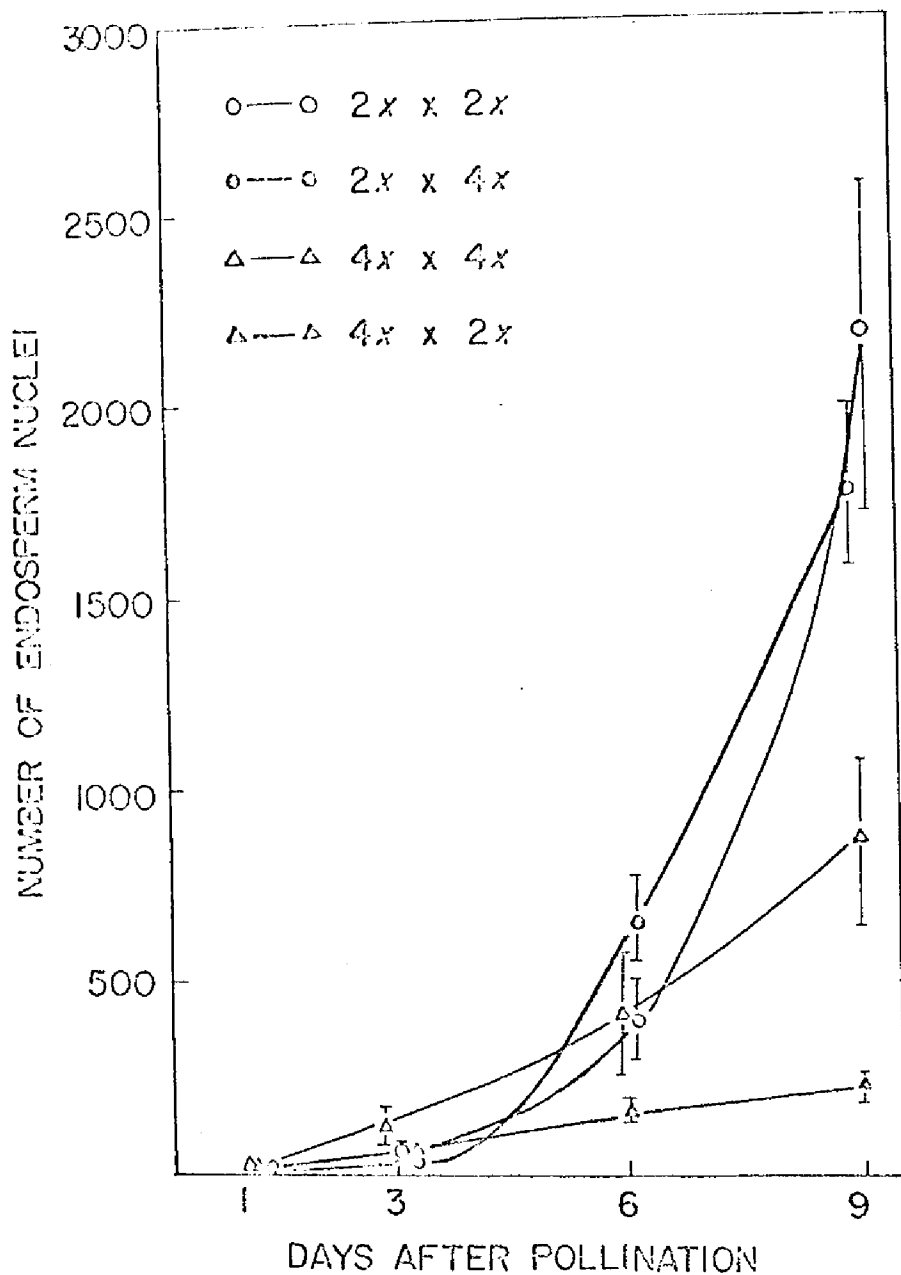


Fig. 3. Average number of endosperm nuclei in reciprocal crosses between diploid *Brassica campestris* ( $2x$ ) and its autotetraploid ( $4x$ ),  $\pm$  show 95% fiducial intervals.

Table 11. Number of ovules used for counting the number of cells of endosperm

Cross	Days after pollination			
	1	3	6	9
$2x \times 2x$	-	8	50	28
$2x \times 4x$	20	59	57	23
$4x \times 4x$	2	10	12	17
$4x \times 2x$	43	45	66	35

$2x$ )は胚乳核の発達  
は抑えられる。  
しかしこれ以後  
の発達段階では  
 $2x \times 4x$ で胚乳の  
正常な発達がおこ

れることが観察された。また $4x \times 2x$ では膜形成は初期に起るが、以後胚乳全体の発達が盛くなってしまう。しかしここには正交交配とも生育可能な種子を付けることがなかつた。

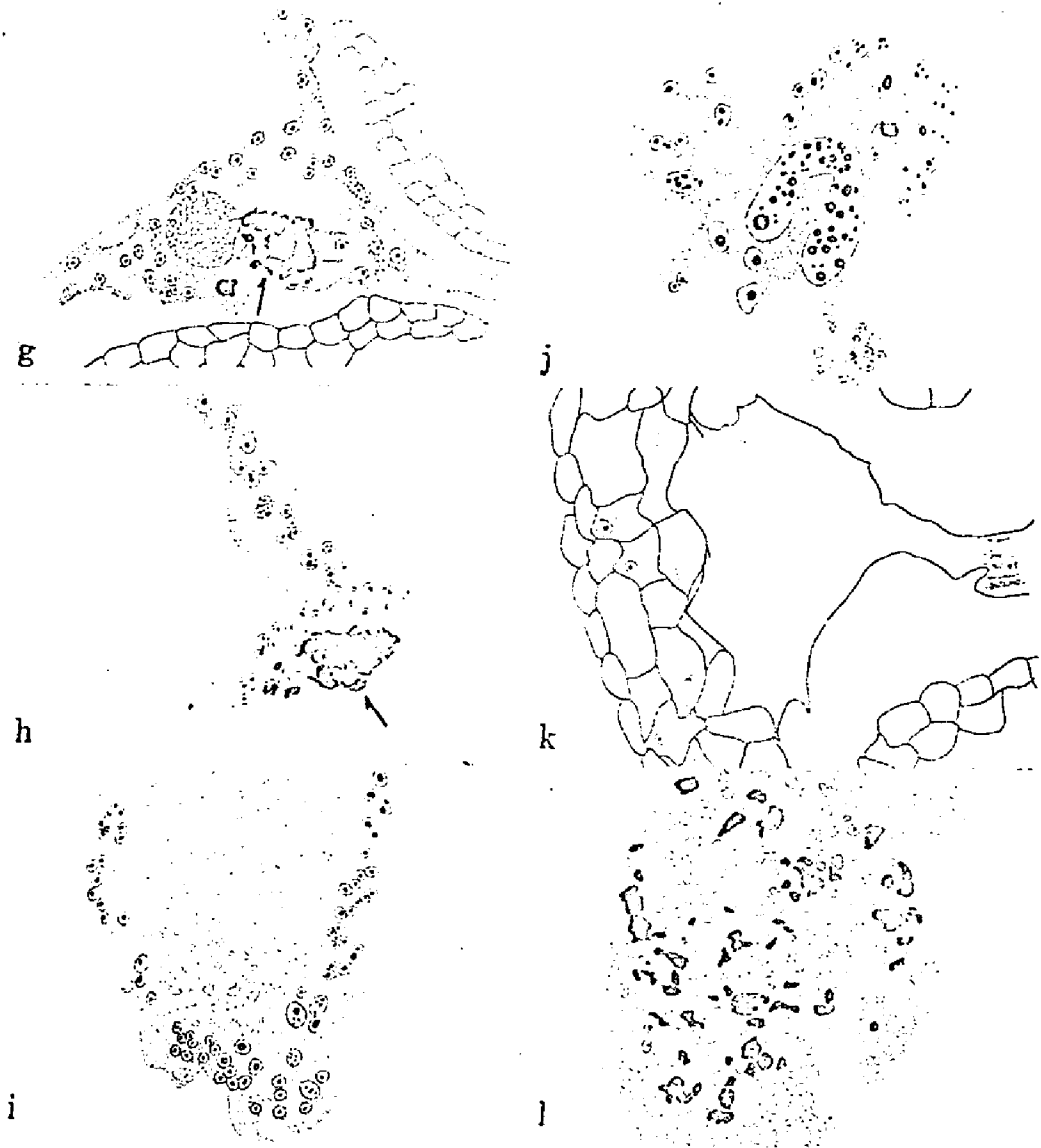
## (ii) 胚珠の人工培養に伴う胚発生

Papaver (Maheshwari 1958)に於いて、胚珠の植込込まれた時期は2細胞の幼胚の時期であり、植込込んだから9日目に膜形成の起る胚乳と球型の胚の発達がおこり、生育可能な種子が得られたが、生育期間は自然条件の場合よりも長期にわたった。同じ材料のPapaverを用いた試験管内受精を行なうと、胚珠内の胚が

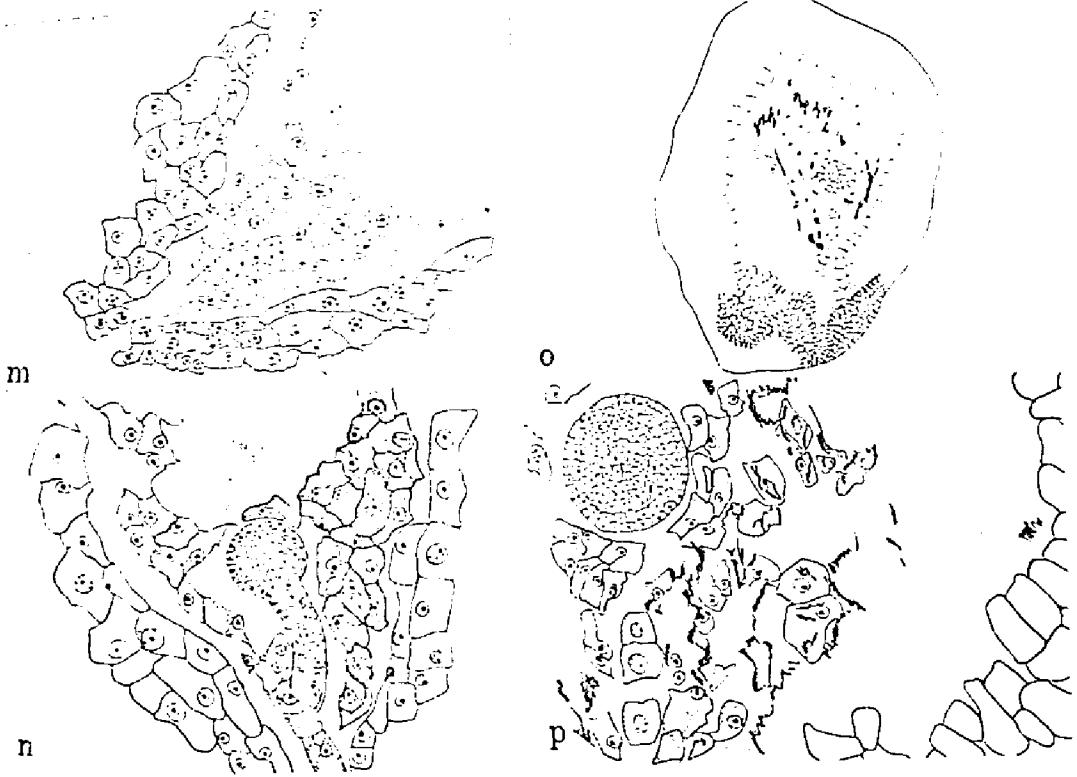


Fig. 4. Embryo and endosperm in various developmental stages.

- a.  $2x \times 2x$ , 6 days after pollination. Four or five-celled proembryo.
- b.  $2x \times 2x$ , 9 days after pollination. The endosperm was dense near the embryo.
- c.  $2x \times 2x$ , 12 days after pollination. Cell wall formation occurred in the endosperm near the embryo.
- d.  $2x \times 4x$ , 9 days after pollination. Vacuoles in the endosperm near the embryo.
- e. and f.  $2x \times 4x$ , 12 days after pollination. Conspicuous vacuolization in the endosperm. No cell wall formation in the endosperm.



- g.  $2\times \times 4\times$ , 12 days after pollination. Endosperm collapse (arrow) near the embryo.
- h.  $2\times \times 4\times$ , 12 days after pollination. Endosperm collapse (arrow), especially showing giant nuclear masses.
- i.  $2\times \times 4\times$ , 18 days after pollination. Numerous nuclei congregated at peripheral side of endosperm.
- j.  $2\times \times 4\times$ , 18 days after pollination. Giant nucleus containing many chromatin particles.
- k.  $2\times \times 4\times$ , 18 days after pollination. Degenerating stage of the basal endosperm.
- l.  $2\times \times 4\times$ , 21 days after pollination. Collapse of nuclei in the endosperm.



- m.  $4\times \times 2\times$ , 6 days after pollination. 4-celled proembryo and cell wall formation was initiated in the endosperm.
- n.  $4\times \times 2\times$ , 9 days after pollination. Poor endosperm development near the embryo. Cell wall was formed.
- o.  $4\times \times 2\times$ , 12 days after pollination. Collapse of endosperm and an embryo.
- p.  $4\times \times 2\times$ , 12 days after pollination. The similar collapse, and unidentified yellow-stained granular cytoplasm were observed.



榮達は自然条件下のそれよりも良かった

(Kanta and Maheshwari 1963)

ここでは、2倍体のニ曹目体菜と同質4倍体の4-つ白菜の交配後の胚珠を人工培養し、in vitroでの胚・胚乳と胚珠の榮達過程を研究した。

## 方 法

胚珠の培養に用いた基本培地は Nitsch (1951) の培地で、これにビタミン、アミノ酸類として、サイアミン  $0.5\text{mg}$ 、ピリドキシン  $0.5\text{mg}$ 、ナイアシン  $2.5\text{mg}$ 、グリシン  $15\text{mg}$  をそれぞれ1当たりにつき添加した。そして必要に応じてこの基本培地に IAA, カイネチン, ジベレリン等を添加した。また栄養物質としてトマトジュースやイースト抽出物を添加した。IAA, カイネチン, ジベレリン等の添加の濃度と方法を表12に示す(表12)。トマトジュースは無添加のものを対照区(T-1)として15%(T-2)と25%(T-3),

Table 12. The concentration of IAA, kinetin and gibberellin in different media (mg/l)

Medium	IAA	Kinetin	GA. <sup>1)</sup>
K-1	0	0	-
K-2	1	0	-
K-3	5	0	-
K-4	0	0.1	-
K-5	1	0.1	-
K-6	5	0.1	-
K-7	0	0.5	-
K-8	1	0.5	-
K-9	5	0.5	-
G-1	0	-	0
G-2	1	-	0
G-3	5	-	0
G-4	0	-	1
G-5	1	-	1
G-6	5	-	1
G-7	0	-	5
G-8	1	-	5
G-9	5	-	5

1): Gibberellin.

1-2ト抽出物は  
2g/l (Y-1) の割合

合でこれこれ  
基本培地に添  
加した。

試験管内に  
無菌的に植之  
てん胚珠は  
2倍体の=食  
目体菜および、  
4-7白菜の  
周便4倍体で、

$2x \times 2x$ ,  $4x \times 4x$ ,

$2x \times 4x$ と  $4x \times 2x$  の交配を、除雄後2日目に行  
なつた。

先に述べた組織学的観察結果から、交配後  
の胚の発達は9日目までは対照及 ( $2x \times 2x$ と  
 $4x \times 4x$ ) ととの正逆交雑とでは差異がなく  
(表9, 図2), 胚乳の発達状態とみても若し  
"異常がみだらぬ" また、更に3日後の

12日目になると胚乳の崩壊が著しくなることが分ったので、上記のように交配後9日目の胚珠を本実験の人工培養に用いた。

植之込んば胚珠の胚・胚乳の発達を自然条件下でのものと比較する目的で、交配後15日目（移植後6日目）に各試験管から1〜4粒の胚珠を取り出し、固定しその発達状態をパラフィン切片法によつて作製し（ポリマーコートを用いて、顕微鏡的に観察した。

## 結 果

自然条件下では交配後9日目の胚は球型で、15日目に存ると"late torpedo"型にまで発達する。この時期の胚乳は"basal endosperm"を除いて全面的に膨形成がみられる。

IAA とカイネチンを添加した培地で人工培養した胚珠では、植之込んば当初（交配後9日目）から少しも発達したと思われな"胚が  $2x \times 2x$  (K-4, K-6, K-9) ,  $4x \times 4x$  (K-3, K-4, K-9) 亦

$4x \times 2x$  ( $K-1$ ) で観察した。また中には胚が消失して見当らな胚珠も多くの区で見られた。特に  $2x \times 4x$  と  $4x \times 2x$  には、 $K-1$  を除く総々の培養基組織の区で胚の存在する胚珠は観察も未だなかった。 $4x \times 4x$  の  $K-5$  の区には、胚珠の中の胚全体の発育はほとんど認められなにも拘らず、胚を構成する各細胞が異常にふくれ、胚形成の機能を失って、腫瘍状を呈してゐるものが見られた(図5b)。 $2x \times 2x$  の  $K-9$  の区では、球型の胚の胚柄の各細胞が肥大してゐるものが見られた(図5c)。胚乳は胚珠に全く存在しなものの、消失寸前のもの、膜形成を起してゐるが僅かしか存在しなものの存どが認められた。胚の発育や分化が認められな胚珠の胚乳が膜形成を起してゐるものもあつた。 $2x \times 4x$  と  $4x \times 2x$  では胚珠のほとんどすべてが萎縮してゐた。胚珠中には胚も胚乳も見られなにも拘らず、胚珠全体の形が丸なものもあつたが、内皮が発達して胚嚢を押し潰してしまつてゐるものも

観察された。

IAA とジベレリンとを添加した培地での胚の発育状態は、植えてから当初（発根後9日目）から余り発育してゐないと思られる球型のものが、 $2x \times 2x$  では G-1, G-2, G-4, G-7 で、 $2x \times 4x$  では G-2 で、 $4x \times 4x$  では G-1, G-5 の各段で観察され、"early heart" 型のものが  $2x \times 2x$  の G-5 区で見られた。それ以外の胚球では、胚球中には胚の存在が確認されなかった。存在する胚は未発育と、う以外は異常が認められなかったが、しばしば胚柄の異常がみられた。この異常は胚柄細胞が肥大するもので、 $2x \times 2x$  の G-4 と G-7 にもあつて観察され、 $2x \times 2x$  の K-9 に見られる異常と同種であつた（図5c）。胚乳の状態は、膜形成を起して僅かに存在するものが、 $2x \times 2x$  の G-1, G-6, G-7 と、 $2x \times 4x$  の G-1 に見られただけで、他は總して胚乳の存在が確認できなかった。胚の存在する胚球でも胚乳の存在するものがみられ、胚珠の形は萎縮してゐた。胚乳だけ存在して、胚の見当りな

存「胚珠は存く、胚珠の内皮の細胞が部分的に肥大して「るものもみられた。

トマトジューズとイースト抽出物を基本培地に添加した培地では、胚の発達は "heart" 型 ( $2x \times 2x$  の T-3) から、植え込んだ当初から少しも発達して「存「と思われける胚 ( $4x \times 2x$  の T-1, Y-1,  $2x \times 2x$  の T-2,  $4x \times 4x$  の T-3) まで観察された。発達した胚の中には細胞分裂のみが起こって、胚の分化を伴わずな「ものも  $4x \times 4x$  の T-3 と  $4x \times 2x$  の T-1, Y-1 と「みられた (図 5d)。  $4x \times 4x$  の T-3 区の胚珠では、別の型の胚柄の異常がみられた (図 5d)。一般的に Brassica の胚の発達は、胚柄は通常 1 つの細胞が垂直な方向から 8 細胞で形成されて「る (図 5a) が、ここでは 1 つの細胞が軸に直角の方向に分裂して 2 つの細胞が横に並んで「る胚柄を持ったものもみられた。胚乳は胚の発達の如何を問はず、ほとんど存在しな「か、全く存在しな「かであった。種皮が丸く発達して「るものでも、胚も胚乳も存在し

な胚珠が多数みられた。特に  $2x \times 4x$  では、  
 いずれの区においても胚、胚乳がみつからず、  
 15日目では観察可能な胚珠がなかった。また  
 内皮細胞の肥大が胚珠を認められた。

以上の結果をまとめ、表13に示す。この表  
 では4つの異なった交配組合せをまとめ、示し  
 た(表13)。

### (iii) 子房の人工培養に伴う胚発 生

未熟種子の崩壊と云うことは、高等植物に  
 おいては頻繁に起る現象で、Brassica  
campestris L. の群の  $2x$  と  $4x$  の正逆交雑におい  
 ては、通常どちらの組合せにおいても交雑種子  
 は得られない。これは胚珠の成熟初期の異常  
 による(Nishiyama and Inomata 1966)。Raphanus sativus  
 においても、 $4x \times 2x$  の交配の時には  $2x \times 2x$  区  
 は  $4x \times 4x$  の種子よりも小粒の3倍体種子が得

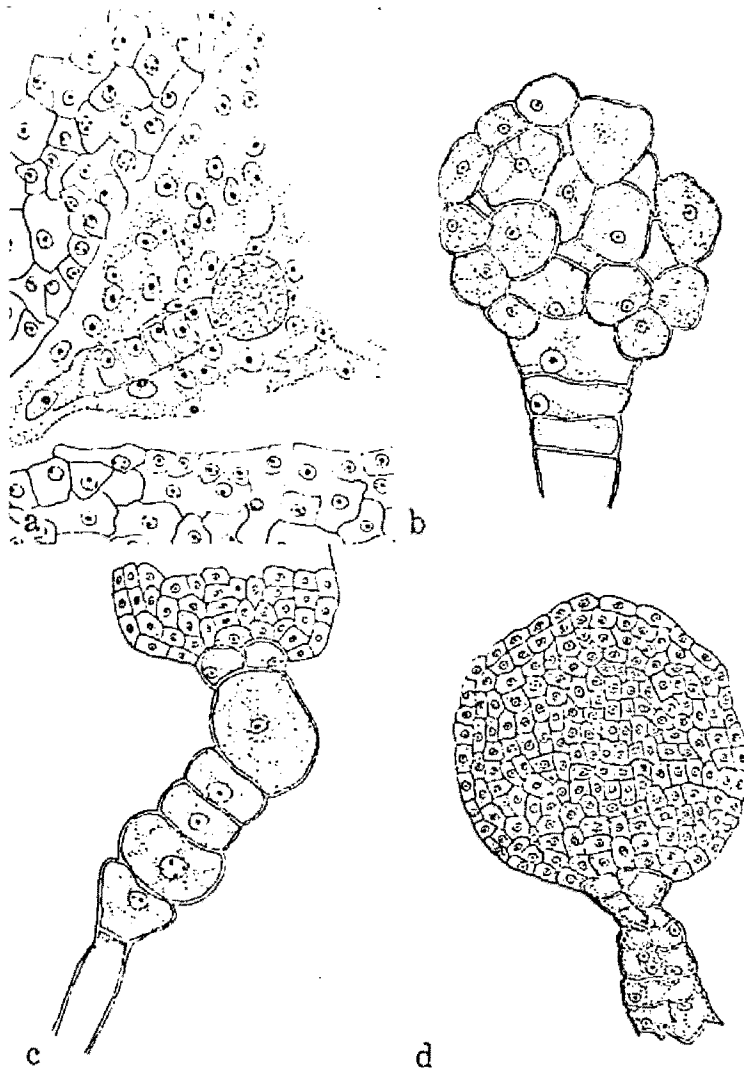


Fig. 5. Embryo in cultured ovule.

- a. Normally developed "embryo, embryo, suspensor and endosperm, in nine days after pollination.
- b. All cells of embryo swelled anomalously (in  $4\underline{x} \times 4\underline{x}$ ).
- c. Anomalously swelled suspensor (in  $2\underline{x} \times 2\underline{x}$ ).
- d. Undifferentiated embryo and another type of anomalous suspensor (in  $4\underline{x} \times 4\underline{x}$ ).



Table 13. Embryological observations in four cross combinations of cultured ovules in the various media

1) Medium	No. of ovules examined	Developmental stages of embryo	Condition of endosperm	Shape of ovule
K-1	6	no~globular	not existed	shrivelled~round
K-2	9	not existed	no~very poor	"
K-3	10	no~globular	no~poor	"
K-4	8	"	not existed	"
K-5	13	"	no~poor	"
K-6	6	"	not existed	shrivelled
K-7	9	not existed	"	shrivelled~round
K-8	8	"	"	"
K-9	9	no~globular	no~poor	"
G-1	8	no~globular	no~poor	shrivelled~round
G-2	8	"	not existed	"
G-3	10	not existed	"	shrivelled
G-4	11	no~globular	"	shrivelled~round
G-5	13	no~flat top	"	"
G-6	12	not existed	no~very poor	"
G-7	11	no~globular	"	"
G-8	11	not existed	not existed	"
G-9	8	"	"	"
T-1	10	no~globular	no~very poor	shrivelled~round
T-2	7	"	"	"
T-3	11	no~heart	not existed	"
Y-1	13	no~globular	no~very poor	shrivelled~round

T-1: Basal medium only (=K-1, G-1).

T-2 and T-3: Tomato juice added 15% and 25% respectively.

Y-1: Yeast extract 2g/l.

1): Refer to Table 12.

られるが、逆交雑の  $2x \times 4x$  では生育可能な種子が得られない。この場合も発露初期において胚乳の組織学的な異常が観察される。種子発露の過程における崩壊の第一の原因は胚に無く、胚乳の異常にあることは確かである (Inomata 1970)。

胚乳の異常に伴って発露初期の種子の崩壊がみられることから、胚珠の発露の或る時期に胚のみを取り出して、胚培養を行って雑種個体を得ることが可能であろう。この他に、胚・胚乳とそれと包む内皮とを含む、胚珠全体の問題として研究する必要があると思われる。

ここでは子房と種々の組織の培養基に植之じみ、発露の途中の段階を固定し、その組織学的観察を行なった。そしてこれらの胚・胚乳の発露状態を自然のものと比較研究した。

## 方 法

2倍体のニ管目体菜と同量4倍体の4-フ

白菜を実験に提供し、 $2x \times 2x$ 、 $4x \times 4x$ 、 $2x \times 4x$ と $4x \times 2x$ の交配を行なつた。

交配にあつたのは、材料互がうす室に移し、除雄した蕾を硫酸殺菌で被つて消毒し、除菌後2日目には開花当日の花粉を人工的に授粉した。子房の培養に適當な発露時期は、胚・胚乳の発生学的研究のデータに基づいて決定した(図2と3)。交配後4日目までは、 $2x \times 4x$ と $4x \times 2x$ の胚・胚乳の発露は対照区( $2x \times 2x$ と $4x \times 4x$ )と同じである。この時期は植物体から子房を切り取り殺菌後(2(IV)参考)あらかじめ用意した培地に植えこんだ。

用いた基本培地はNitsch (1951)の培地はグリニと15mg, ナイアミン(ニコチン酸)2.5mg, ピリドキミン0.5mg, サイアミン0.5mg, サツカロース50g, 養分9gを各々1リットル当りに添加したものである。また必要に応じて生長調整物質や他の栄養分を加えた。用いたものは、IAA, カイネチン, ジベレリチン, トコトジユース, イースト抽出物, カゼイン酸分

解物とココナツトミルクである。これらを種々に組合せて調整した培養基の名称と組成を表14と表15に示す(表14, 15)。表14と表15

Table 14. The concentration of IAA, kinetin and gibberellin in different media (mg/l)

Medium	IAA	Kinetin	GA. <sup>1)</sup>
K-1	0	0	-
K-2	1	0	-
K-3	5	0	-
K-4	0	0.1	-
K-5	1	0.1	-
K-6	5	0.1	-
K-7	0	0.5	-
K-8	1	0.5	-
K-9	5	0.5	-
G-1	0	-	0
G-2	1	-	0
G-3	5	-	0
G-4	0	-	1
G-5	1	-	1
G-6	5	-	1
G-7	0	-	5
G-8	1	-	5
G-9	5	-	5

1): Gibberellin.

以外はトクト

ジユース 15%

(T-2)と25%(T-3),

イースト抽出

物(2g/l)を添加

した培地も

使用した。培

地の pH は高圧

滅菌前には 1N-KOH

又は 1N-HCl を

用いて 6.0 に調

整した。高圧

滅菌は  $1.2\text{kg/cm}^2$

で 10 分間行なった。用いた試験管は  $18 \times 180\text{mm}$  のもので各試験管に 10 cc ずつ培養基を注入した。用いた IAA は西徳メルク社, カイネチンはアメリカのシグマ社, ジベレリンは日本ギ

Table 15. Composition of enriched media for culturing excised ovaries

	None	IAA	K	GA	T
BM	NO	NI	NK	NG	NT
BM-TJ	TJO	TJI	TJK	TJG	TJT
BM-YE	YEO	YEI	YEK	YEG	YET
BM-Ch	ChO	ChI	ChK	ChG	ChT
BM-CM	CMO	CMI	CMK	CMG	CMT
BM-CM-Ch	CMChO	CMChI	CMChK	CMChG	CMChT

IAA: 1mg, K: kinetin 0.1mg, GA: gibberellin 1mg, T: IAA+K+GA, BM: basal only, TJ: tomato juice (15%), YE: yeast extract (2g/l), Ch: casein hydrolysate (300mg/l), CM: coconut milk (10%), CMCh: casein hydrolysate+coconut milk.

ベレリと協会, イースト抽出物は武田薬品, カゼインと酸分解物は日本製薬の製品である。きびとトマトジュースは市場から求めた完熟トマトを砕き, 綿布でこして  $1.2\text{kg}/\text{cm}^2$  で10分高圧滅菌を行なった保存したとき, 実験のときには濾液物とろ化して用いた。ココナットミルクも市場から求めたとき, ココヤシの果実から得たミルクを  $1.2\text{kg}/\text{cm}^2$  で10分間高圧滅菌して冷蔵庫に保存したものを供した。

植之込んば子房は  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  で, 300-500 ムクス

遠鏡照射の蛍光燈のもとに静置した。胚・胚乳等の組織学的研究にあつては、植え込み後11日目（交配後15日目）に果腹胚1胚に於いて1個体の子房を固定し、パラフィン切片と作製して顕微鏡観察に供した（1(i) 参考）。

## 結 果

### 胚乳の組織学的研究

トマトジューズ (15%と25%) とイースト抽出物 (2g/l) を添加した培地に植え込んだ子房の胚・胚乳・胚珠の発育を調べた。その結果の概略を表16および表17に示す。表16には  $2x \times 2x$  と  $4x \times 4x$  の結果を、表17には  $2x \times 4x$  と  $4x \times 2x$  の結果を示した（表16, 17）。

トマトジューズを培地に添加した場合には、 $2x \times 2x$  にあつては胚が胚珠中に存在し存"ものから、"torpedo"型に発達したもののま"る"るの段階のものがみられた。"Torpedo"型の胚

Table 16. Developmental condition of embryo, endosperm and seed coat in the crosses of  $2\bar{X} \times 2\bar{X}$  and  $4\bar{X} \times 4\bar{X}$  in the medium added with tomato juice and yeast extract

Medium <sup>1)</sup>	No. of ovules examined	Developmental condition of embryo 2)	Developmental condition of endosperm	Seed coat
T-1	8	not existed (5)~ "upturned U" (1)	not existed~ normal	shriveled~ round
T-2	7	not existed (4)~ late "torpedo" (1)	not existed~ poor	shriveled
T-3	13	not existed (10)~ "flat top" (1)	not existed~ poor	shriveled
Y-1	2	"flat top" (1)~ "torpedo" (1)	poor ~ normal	round

- 1): T-1, basal medium only. T-2, basal medium added 15% tomato juice. T-3, basal medium added 25% tomato juice. Y-1, basal medium added yeast extract (2g/l).
- 2): number of observed ovules shown in the parenthesis.

Table 17. Developmental condition of embryo, endosperm and seed coat in the crosses of 2x x 4x and 4x x 2x in the medium added with tomato juice and yeast extract

Medium	No. of ovules examined	Developmental condition of embryo 2)	Developmental condition of endosperm	Seed coat
T-1	14	not existed (4)~ heart shaped (2)	not existed~ poor	shrivelled~ round
T-2	10	not existed (7)~ globular (3)	not existed	shrivelled
T-3	16	not existed (11)~ globular (5)	not existed	shrivelled
Y-1	15	not existed (14) globular (1)	not existed~ poor	shrivelled~ round

1): T-1, basal medium only. T-2, basal medium added 15% tomato juice. T-3, basal medium added 25% tomato juice.  
 Y-1, basal medium added yeast extract (2g/l).

2): Number of observed ovules shown in the parenthesis.



を持つ胚珠にあつては、その胚乳は臃形を呈  
 示したが、量的には僅かしか存在せず、胚珠  
 全体が萎縮してゐた(図6a)。胚が存在して  
 も胚乳の存する胚珠もみられず。4x x 4x の交配  
 には、"upturned U" 型の胚がみられ、ほと  
 んど成熟種子に達してゐた。これは自然条件  
 下の胚珠の発達の後半のもののものに相  
 当してゐた。臃形を呈した胚乳はほとんど残  
 つてゐた。"torpedo" 型または"late torpedo"  
 型の胚を持つ胚珠では、臃形を呈した胚乳がみ  
 られたが、発達状態が良好で存するもので、胚珠  
 全体の形は萎縮してしまつてゐた(図6b)。  
 25%のトコトジューズを添加した区には、  
 "flat top" の胚が観察されたが、その胚乳は  
 既に消失してあり、僅かに基部胚乳(basal endo-  
 sperm)を残すだけであつた。

2x x 4x の交配の場合には、多数の胚珠を観  
 察したにも拘らず、どの培養区にも、  
 胚・胚乳共に胚珠中に存在しなかつた。

4x x 2x の交配では、胚の発達は球型から

"heart"型までみられたが、そのほとんどが球型を呈してゐた。分化をせず"球型のまま胚が生長してゐるものもみられた(図6b)。胚柄の異常な発達のみみられた(図6c)が、これは胚珠の培養に於いてみられたものがある(図6d)。  
 "heart"型の胚を持つ胚珠以外はこの胚珠にも胚乳がなく、観察された胚珠は總じては"萎縮してゐた"。

イースト抽之物を培地に添加したものは、 $2x \times 2x$  は"torpedo"型に、 $4x \times 4x$  は"flat top"型にまで発達したものがみられた。前者の"torpedo"型は自然条件下での胚の発達は約18日目に相当するものがあり、  
 且して胚珠の胚乳の発達もよく、自然条件下のそれと同等であった。後者の"flat top"型は自然条件下での交配後約12日目に相当し、その胚乳は図6eのように中心部に於いて崩壊してしまつた。  
 $2x \times 4x$ の交配に於いては、  
 11日目の胚珠中にも、胚と胚乳の存在がみとめられた。且して胚珠の著しい萎縮

がみられず。  $4x \times 2x$  の交配には  $11$  は、変形した胚がみられ、その胚乳の腔形成は胚の周辺と胚嚢に添った胚乳のみみられず、"basal endosperm" はみられず、中心部位には  $11$  は胚乳は完全に崩壊して  $11$  在 (図 6e)。

IAA とカイネチンとの相互作用を調べた結果を表 18 と表 19 に示す。表 18 は  $2x \times 2x$  と  $4x \times 4x$ 、表 19 は  $2x \times 4x$  と  $4x \times 2x$  について  $11$  の結果を概略的に示したものである (表 18, 19)。  $2x \times 2x$  の交配には  $11$  は、胚が存在しない  $11$  で、胚珠が萎縮してしまつてしまふもののみみられたが、最も良く発達した胚の状態をみると、培養液組成に加えた IAA の濃度が高まるに従つて (即ち K-3, K-6 と K-9) 良くなり、自然条件下での胚の発達と較べた場合、最も良く発達したものは約 1 週間発育が早くなり、ほとんど高熱  $11$  状態を示した。"Heart" 型や "torpedo" 型の胚も観察されたが、これらの胚珠の胚乳はほとんど存在せず、腔形成は認められたが、腔は完全に萎縮して  $11$  在 図 6a の如き様子を呈し

Table 18. Developmental condition of embryo, endosperm and seed coat in the crosses of 2x x 2x and 4x x 4x in the medium added with IAA and kinetin

Medium <sup>1)</sup>	No. of ovules examined	Developmental condition of embryo 2)	Developmental condition of endosperm	Seed coat
K-1	8	not existed (3)~ "upturned U" (2)	not existed~ normal	shrivelled~ round
K-2	10	not existed (4)~ "upturned U" (3)	not existed~ normal	shrivelled~ round
K-3	5	"torpedo" (2)~ "upturned U" (2)	poor~ normal	shrivelled~ round
K-4	10	not existed (7)~ heart shaped (1)	not existed~ poor	round
K-5	2	late "torpedo" (2)	normal	round
K-6	3	not existed (1)~ "upturned U" (2)	not existed~ normal	shrivelled~ round
K-7	3	not existed (2)~ "waking stick" (1)	poor~ normal	shrivelled~ round
K-8	4	not existed (3)~ early "torpedo" (1)	not existed~ normal	shrivelled~ round
K-9	4	late "torpedo" (1)~ "upturned U" (3)	normal	round

1): Refer to Table 14.

2): Number of observed ovules shown in the parenthesis.

Table 19. Seed coat in the crosses of 2x 2, 4x 4 and 4x x 2x in the medium added with IAA and Kinetin

Medium <sup>1)</sup>	No. of ovules examined	Developmental condition of embryo <sup>2)</sup>	Developmental condition of endosperm	Seed coat
K-1	9	not existed (8)~ Globular (1)	not existed	shriveled
K-2	3	not existed (1)~ early "torpedo" (1)	not existed~ poor	shriveled~ round
K-3	14	not existed (12)~ Globular (2)	not existed	shriveled
K-4	3	not existed (2)~ "upturned U" (1)	not existed~ normal	shriveled~ round
K-5	2	not existed (1)~ "walking stick" (1)	not existed~ normal	shriveled~ round
K-6	5	not existed (5)	not existed	shriveled
K-7	5	not existed (2)~ "flat top"	not existed	shriveled
K-8	12	not existed (9)~ heart shaped (1)	not existed~ poor	shriveled~ round
K-9	2	not existed (2)	not existed~ poor	round

1): Refer to Table 14.  
2): Number of observed ovules shown in the parenthesis.

2" F。異常な胚乳の空胞化や巨大核の存在は認められず、胚珠の内皮の異常増殖が著しく、胚珠にみられた (図6f)。

4x x 4x には、胚の発達は良く、K-4とK-8を除いた総2の区には、自然条件下での発達の18日或いは21日目と相当するものがあった。

"late torpedo" の胚でも膜形成を起した胚乳の存在が僅かのために種皮の著しく萎縮しているものがあった (図6g)。またよく発達している胚珠にも胚の存在がみられず、膜形成を起した胚乳だけが一杯に満ちているものがK-7とK-8区の残るものも認められた。胚珠の内皮の異常に肥大したものを図6f のようにみられた。

2x x 4x の交配には、観察したどの胚珠にあつても胚が存在するものはなく、胚乳もまたほとんど見当らず、胚珠は著しく萎縮してゐた。これに対し 4x x 2x の交配では種々の発達段階を示す胚がみられた。即ちほとんど発達している"球型"、分化の遅れしている球型、"heart" 型、"torpedo" 型と "upturned U" 型があ

る。K-2, K-4 と K-5 の培養皿に於ける各1粒ずつの胚珠の胚の発達は良好で成熟段階まで達すると思われた。ニハ等の胚珠の胚乳には隱形或や発達程度にも異常や違いがみられた。胚が存く胚乳だけが隱形或を起してよく発達し、胚珠内は一杯満ちたものが K-9 の胚がみられた。その外皮は図6f の如く異常増殖を示してゐた。

IAA とジベリリンを培養に添加し、その拮抗作用を調べた結果を表20と表21に示す。表20は  $2x \times 2x$  と  $4x \times 4x$ 、表21は  $2x \times 4x$  と  $4x \times 2x$  につゝの結果を示す。 $2x \times 2x$  にはおゝでは、良好な胚の発達は G-2, G-3, G-4 の3区におゝてみられた。"early torpedo" 型実は "late torpedo" 型の胚を持つ胚珠に於ては、胚乳はほとんど存在せず、種皮は萎縮し、図6bの如き様子を呈してゐた。 $4x \times 4x$  にはおゝでは、胚の発達は  $2x \times 2x$  よりも更に良好で、おゝ此の区におゝても成熟に達し、自然条件下の交配後18日から21日目の胚に相当するものであつた。

Table 20. Developmental condition of embryo, endosperm and seed coat in the crosses of 2x x 2x and 4x x 4x in the medium added with IAA and Gibberellin

Medium	No. of ovules examined	Developmental condition of embryo	Developmental condition of endosperm	Seed coat
G-1	4	Globular (1) ~ "upturned U" (1)	not existed ~ normal	shrivelled ~ round
G-2	3	heart shaped (1) ~ "upturned U" (1)	not existed ~ normal	shrivelled ~ round
G-3	3	early "torpedo" (1) ~ "upturned U" (1)	poor ~ normal	shrivelled ~ round
G-4	2	late "torpedo" (1) ~ "upturned U" (1)	normal	round
G-5	7	not existed (5) ~ "upturned U" (1)	not existed ~ normal	shrivelled ~ round
G-6	8	not existed (6) ~ "upturned U" (1)	not existed ~ normal	shrivelled ~ round
G-7	6	early "torpedo" (2) ~ "upturned U" (4)	not existed ~ normal	shrivelled ~ round
G-8	3	not existed (2) ~ "upturned U" (1)	not existed ~ normal	shrivelled ~ round
G-9	4	late heart (1) ~ "upturned U" (1)	not existed ~ normal	shrivelled ~ round

1): Refer to Table 14.  
2): Number of observed ovules shown in the parenthesis.



Table 21. Developmental condition of embryo, endosperm and seed coat in the crosses of 2x x 4x and 4x x 2x in the medium added with IAA and Gibberellin

Medium <sup>1)</sup>	No. of ovules examined	Developmental condition of embryo <sup>2)</sup>	Developmental condition of endosperm	Seed coat
G-1	7	not existed (7)	not existed	shriveled~ round
G-2	8	not existed (7)~ globular (1)	not existed	shriveled
G-3	4	not existed (2)~ heart shaped (1)	not existed	shriveled~ round
G-4	10	not existed (9)~ globular (1)	not existed	shriveled
G-5	7	not existed (7)	not existed	shriveled
G-6	10	not existed (10)	not existed	shriveled~ round
G-7	4	not existed (4)	not existed	shriveled
G-8	4	not existed (4)	not existed	shriveled
G-9	9	not existed (8)~ globular (1)	not existed	shriveled

1): Refer to Table 14.

2): Number of observed ovules shown in the parenthesis.

本図 6b の よう に胚の発達は割合に速い。胚乳がほとんど胚珠中に存在せず、種實の萎縮がみられ、そのものもあつた。"heart" 型の胚をもつ胚珠は一部胚乳の異常がみられた (G-9) (図 6c)。胚乳の膜形成は胚周部のみで、他の部分では空胞化が著しく、核の局在が目立つた。"basal part" に胚乳核が多く存在するものは、その部分の胚乳が異常に増殖したためと考えられる。胚乳の異常な空胞化に伴つて偏在させられたものと思われ。

$2x \times 4x$  の交配には、球型、"heart" 型の胚が G-2 と G-3 に観察されたが、他の培養基組成の区では、胚の存在する胚珠が全くみられなかった。球型の胚を持つ胚珠の胚乳は既に消失して、内皮細胞の異常肥大が認められた。また "heart" 型を持つ胚珠では、胚乳の膜形成はなく、多くの異常な空胞化がみられた。 $4x \times 2x$  にあつたのは、球型と示す胚が、その母の胚乳は胚珠中に残存してゐなかった (G-3, G-4, G-9)。ほとんどが胚珠は

観察してゐた。4x x 4x の交配では胚珠の異なる  
 胚嚢がみられただ、正交交雑にも"2"は  
 ずいぶん対照胚の構造を呈するはみられなかった。

表15に示した種類の培地を用いて子房培養  
 と行なつたものと組織学的に観察した結果の  
 うち胚の発育状態を表22と表23に示す。

基本培地には生長調節物質を添加したもので  
 うち2x x 2x の交配にあつては、"late torpedo"型  
 にまで発達した胚は、培地にジベレリンを添  
 加した区でだけみられた(NG)。胚が球型のま  
 まで生長を続けるだけで、分化を起さずにも  
 みられた(NO) (図6e)。  
 "torpedo"型を持つ  
 胚の胚乳は膜形成を起してゐたが、球型の  
 胚をもつ胚珠では胚乳の膜形成はみられな  
 った。4x x 4x の交配では、2つの区にも  
 胚が成熟に達してゐた(NO, NK)。  
 "heart"型と  
 "early torpedo"型の胚も他の胚珠にみられた。  
 IAA を添加した培地(NI)では、2つの  
 "heart"型の胚が観察されたが、一方の胚は  
 "basal endosperm"を除く2つの胚乳に膜形成がみ

られただが、他初胚乳では全く隠形成長はみられず、また異常も存かた。胚珠の分泌が全体的に遅れであるようにみえた。

$2x \times 4x$  の胚珠では最も良く発達したもので球型の胚 (NI, NT) があつた。これらの胚を持つ胚珠の胚乳は量的に僅かであり、異常な状態にあつた。胚は球型であるにも拘らず崩壊を始めてあり、その胚乳は、特に胚乳体近において著しく崩壊を来した (図6)。胚乳の異常な空胞化と種皮の大きさの核とが観察されたが、これ等は自然条件での受精後に日目の胚珠に似てゐた。  $4x \times 2x$  にあける胚の発達は球型までで、ほとんど胚珠では胚乳は消失してしまつてあり、種皮が著しく萎縮してゐた。そして球型の胚とせよ胚珠の胚乳は存在せず、萎縮してゐた。

培地はトクトジューズと生長調整物質を添加した培地で培養した子房につては、20個の胚珠を調査したがその結果、僅かに "early torpedo" 型の胚を2個 ( $2x \times 2x$ ) と球型の胚を

2個 ( $4x \times 4x$ ) 認めただけである。この等の胚を持つ胚珠のうち2個では胚乳の膜形成が認められた ( $2x \times 2x$  と  $4x \times 4x$  各1個) が、他は完全に萎縮してしまつてゐて、胚乳は残存してゐなかつた。

$2x \times 4x$  と  $4x \times 2x$  とに於ては、2枚の胚珠を調査したが、胚の存在するものは必ずこの培地にも見当らず、胚乳もほとんどなく、胚珠は著しく萎縮してゐた。

イースト抽出物と生長調整物質の濃度を添加したもののうち、IAA を含む培地で培養した  $2x \times 2x$  に於ては球型の胚のみならず以外は、總之の培地で "torpedo" 型の胚が観察された。同じ "torpedo" 型の胚の中にも発達の差異があつた。球型の胚と持つ胚珠以外のものでは、つねに膜形成を起した胚乳が存在してゐた。 $4x \times 4x$  では種々の発達段階の胚がみられた。即ち "torpedo" 型, "flat top" 型, "heart" 型と球型胚がある。"torpedo" 型の胚は3種の培地でみられた (YC, YK, YT)。これらの胚の発達の程度は自然

条件のものより幾分遅い。胚の発達の  
 型"場合" ("heart" 型, "flat top" 型, 球型), 之  
 の胚乳は崩壊して, ほとんど胚珠中に存在し  
 てゐた。

$2x \times 4x$  では, 多数の胚珠と調つたにみられ  
 るが, 1粒の球型胚 (Y1) がみられただけで  
 あつた。また胚乳は膜形成をみせず, 崩壊と  
 皇胞化を示してゐた。 $4x \times 2x$  の交配に於て  
 は, 2粒の胚珠が胚がみられた。1粒は  
 "walking stick" 型 (Y0) と他の1粒は "flat top" 型  
 (YT) であつた。"walking stick" 型の胚の胚乳は  
 正常に発達してゐたが, "flat top" 型のものは  
 胚乳はなく, 種皮は萎縮してゐた。その他の  
 の胚珠には胚も胚乳もなかった。

培地にカゼイン分解物と添加した子房の  
 培養では,  $2x \times 2x$  の場合には球型と "torpedo"  
 型の胚がみられた。ChO と ChG の培養区に於  
 ては, 良く発達した胚がみられ, 胚乳の発  
 達は自然条件下での交配後18日から21日目の  
 発達程度に相当するものであつた。胚の発達

が少し遅れたものでは、胚乳の膜形成が胚の  
 周辺部の8割程度に止られた。この状態は、  
Brassica ではよくいう "heart" 型に分化すると胚乳  
 の膜形成が始まるので、これに比べれば少し  
 遅れてゐることが分つた。ChI と ChT の区別  
 としては、球型の胚と持つ胚珠では "basal part"  
 以外の胚乳は全面に膜形成をしてゐた(図9)

4x x 4x にあける胚には "heart" 型から "late  
 torpedo" 型までみられ、ChC と ChT の区別はと  
 くに良好な差違を示した。胚の発達の遅れて  
 ゐるものでは、胚乳の異常発達が認められた。  
 自然条件下では 2x x 4x の胚乳崩壊は交配後12  
 日から始まる(図6b)が、ここでは胚乳の  
 崩壊が "basal part" (図9l)のみならず他の部  
 分にも観察された(図9m)。胚珠の発達が良  
 くとも物らず、胚の発達は初期の段階で止ま  
 つてゐるものもあった。膜形成を起さずな  
 胚乳が僅かに胚周辺だけに存在して、"basal  
 part" の胚乳の発達も悪く、胚嚢の内部が空に  
 なつてしまつてゐる、球型胚と持つ胚珠がみ

られた(圖6m)。

2x x 4x の交配においては、胚の発達は球型から "flat top" 型までみられた。これらの胚珠の胚乳は膜形成を起さず、著しい崩壊を示した。巨大核の出現、染色頂部分の偏在が胚乳の多くの部分において観察された(圖90)。更に崩壊の進んだ胚乳もみられ、胚はくずれ、その周りの胚乳はヘマトキシリンで染色されず、核と細胞質を区別かつくなくならず、213 胚珠もあった。胚乳が膜形成を起さなかったものは、全く存在しなかった。

4x x 2x の交配においては、"torpedo" 型の胚が直ちに細胞分裂を行なつていたが、分化が遅れてくるものもみられた(圖6p)。"torpedo" 型の胚を持つ胚珠の胚乳は "basal part" 以外の線この部分において膜形成を起さなかった。

"heart" 型や球型胚を持つ胚珠には胚乳は存在せず、種皮は著しく萎縮していた。胚嚢に接した内皮細胞の肥大が起り、これらの細胞が胚を圧迫してゐる胚珠がみられた(圖6q)。



著本培地はココナツトミロクと生葉調養物  
 類と添加した培地で人工培養をした3房のう  
 ち、 $2x \times 2x$ に於いては、胚の発達はIAAと添  
 加した培地で球型胚のみらしいが(CMI)他は、"  
 ずれ"の区に於いては、胚の発達が良く"torpedo"  
 型から"upturned U"型まで観察された。是れを  
 是れを良好な発達と示す胚珠の胚乳は全面に  
 膜形成を起ししといた。また球型の胚を持つ  
 胚珠の胚乳も図6cのように全面に膜形成を  
 示した。発達の良好な"torpedo"型と比べ、胚珠の  
 存か、胚乳の発達が良く種皮が萎縮して図  
 6aのように存するものがあった。 $4x \times 4x$   
 の交配では、CMIの区で良く発達した胚のみ  
 したが、他の培養区では球型から"torpedo"型  
 までであった。この球型胚と比べ、胚珠の胚乳  
 では全面にわたって膜形成がみられ、図6c  
 の如き様子を呈していた。

$2x \times 4x$ の胚の発達は、一般に余り良くなく、  
 多くは"late heart"型の段階に達したものがみ  
 られた。胚乳の崩壊に伴って球型胚の崩壊が

図6x のように観察され下。このような胚珠  
 の胚乳は著しい皇胞化を示したり(図6r),  
 大小さまざまな核だけが集まったりするものが  
 みられ下(図6s)。“heart”型胚の周辺部の  
 胚乳には、多数の非常に巨大な核が図6j の  
 ように存在した。胚乳における膜形成ほどの  
 胚珠にもみられなかつた。4x x 2x についで、  
 線2で22個の胚珠を調査したが、胚・胚乳は  
 全く存在せず、種皮を著しく萎縮して下。

基本培地にココナットミルク、カゼイン酪  
 分解物および生長調整物質(IAA, GA, Kinetin)を  
 添加したものに子房を人工培養した。2x x 2x  
 の場合、胚の発達程度は球型から“walking stick”  
 型までであつた。こゝら“walking stick”型と  
 “torpedo”型の胚とを比較するに、胚乳は膜形  
 成を起してあり、自然条件下での状態と同  
 程度であつた。また球型胚と比べて胚珠には赤  
 とも、その胚乳は全周にみられ膜形成を示し  
 て下(図6t)。4x x 4x の発達は球型から  
 “walking stick”型までみられ下が、2x x 2x に較

べと一段と良いものがあった。子葉部の歪形  
 した胚が、胚座の良い胚の中に見られた  
 (CMChK) (圖6u)。球型胚を持つ胚珠でも胚乳  
 の膜形成がCMChIとCMChT 足には亦い之みられた  
 (圖6t)。胚乳核の異常、即ち空胞化、巨大核  
 の出現、核の崩壊等は認められた。

$2x \times 4x$  の胚発座は球型から "heart" 型まで  
 あった。それ等の胚珠では胚乳の膜形成がま  
 ったく認められなかった。是れ二種之の異常  
 が観察された。即ち胚乳の崩壊(圖6v)や、  
 巨大核や多くの異常空胞の出現(圖6w)等  
 がある。胚周辺の胚乳の崩壊が胚の崩壊を引  
 起してしるものも観察された(圖6x)。

$4x \times 2x$  には亦い之は、12個の胚珠を調査した  
 が總之の足には亦い之胚珠は萎縮してしまつて  
 いた。球型胚を持つ胚珠に亦い之も胚乳は存  
 存せず、胚珠は萎縮していた。是れ二種は  
 圖6g のように胚を押しつけた。

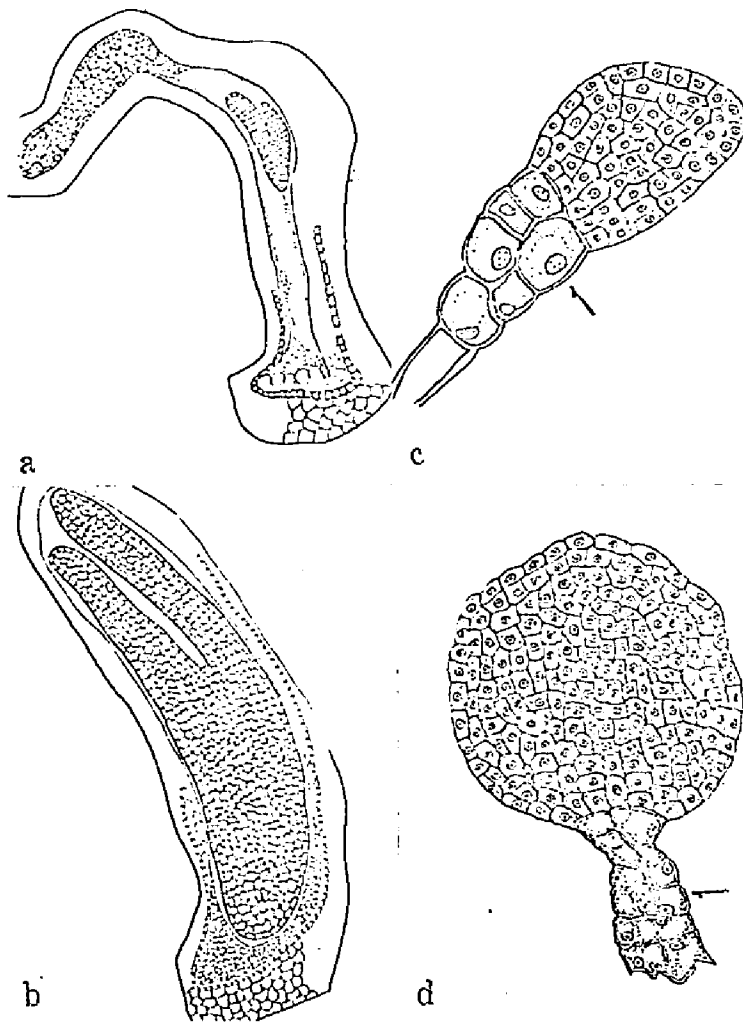


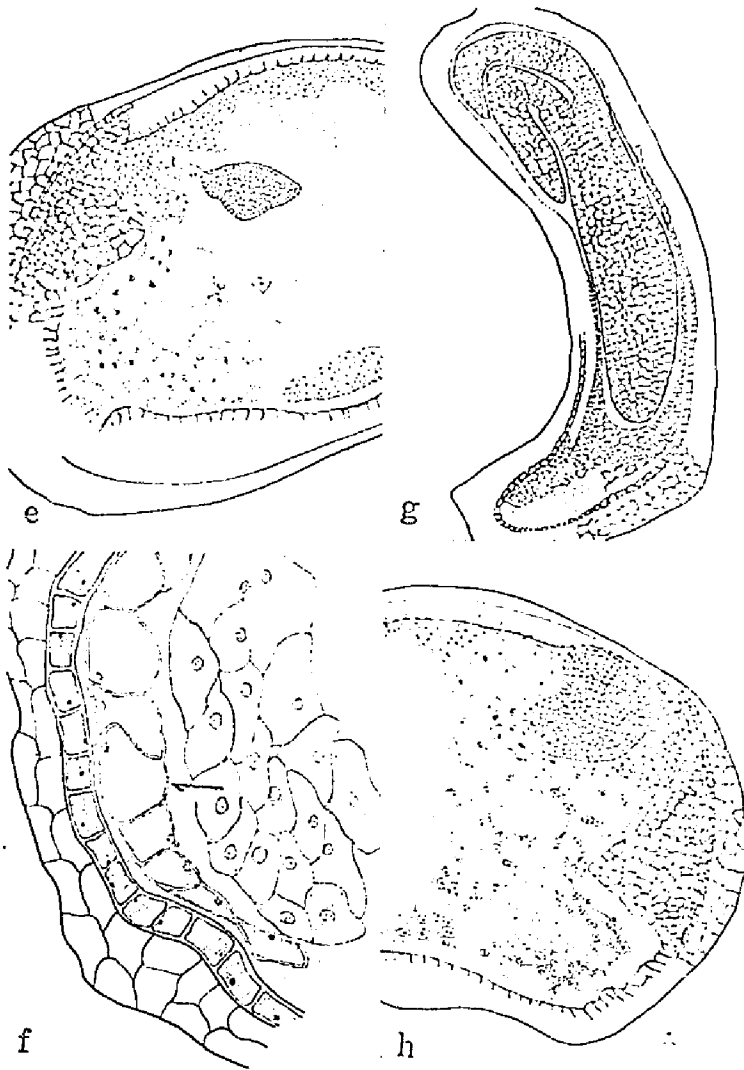
Fig. 6. Embryo and endosperm development in cultured ovaries.

a:  $2\times \times 2\times$ , early torpedo shaped embryo and poor cell walled endosperm.

b:  $4\times \times 4\times$ , late torpedo shaped embryo and shriveled seed coat.

c:  $4\times \times 2\times$ , anomalous suspensor (arrow).

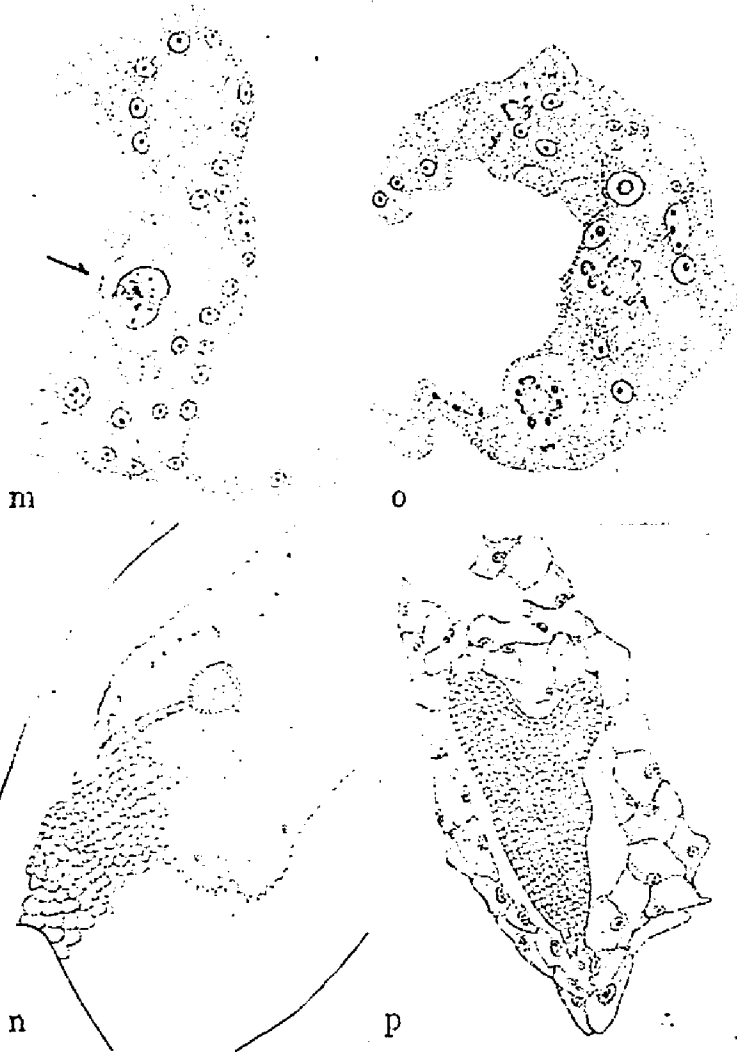
d: undifferentiated embryo and anomalous suspensor in ovule culture (arrow).



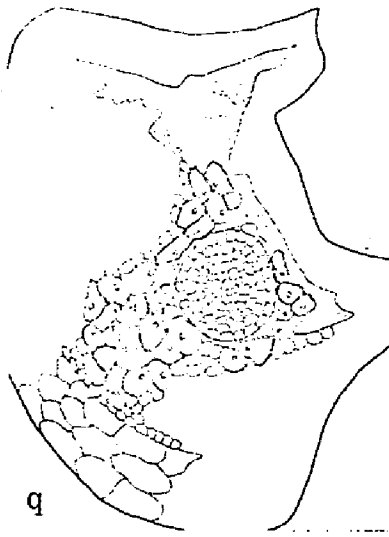
- e:  $4x \times 2x$ , anomalous embryo and poor developed endosperm.  
 f:  $2x \times 2x$ , enlargement of the nucellus cells (arrow).  
 g:  $4x \times 4x$ , late torpedo shaped embryo and poor cell walled endosperm.  
 h:  $4x \times 4x$ , heart shaped embryo and abnormal vacuolized endosperm.



- i:  $2x \times 2x$ , no differentiated growing embryo and no cell walled endosperm.
- j:  $2x \times 4x$ , abnormal endosperm and irregular sized nuclei.
- k:  $2x \times 4x$ , endosperm collapse (arrow) near the embryo in natural condition.
- l:  $4x \times 4x$ , endosperm collapse (arrow) at the chalazal part.



- m:  $4x \times 4x$ , endosperm collapse (arrow).  
 n:  $4x \times 4x$ , poor no cell walled endosperm and globular shaped embryo.  
 o:  $2x \times 4x$ , giant nucleus and collapsed endosperm.  
 p:  $4x \times 2x$ , embryo differentiation was retarded.



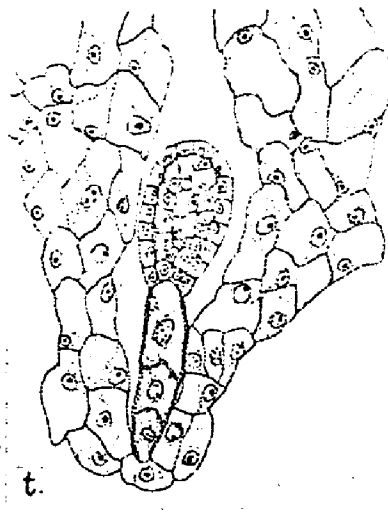
q



s



r



t

- q:  $4\times$  x  $2\times$ , giant nucellus cells and globular embryo.  
 r:  $2\times$  x  $4\times$ , abnormal vacuolization in endosperm remarkably.  
 s:  $2\times$  x  $4\times$ , numerous nuclei congregated at either side of endosperm.  
 t:  $2\times$  x  $2\times$ , globular shaped embryo and cell walled endosperm.





- u:  $4\times$  x  $4\times$ , embryo deformed at the cotyledonous part.  
 v:  $2\times$  x  $4\times$ , endosperm collapse (arrow) and many sized nuclei.  
 w:  $2\times$  x  $4\times$ , conspicuous vacuolization in endosperm.  
 x:  $2\times$  x  $4\times$ , degeneration of endosperm and collapse of embryo.

Table 22. Effect of growth substances and developmental condition of embryo in artificial culture of ovaries

Cross	Medium <sup>1)</sup>	Developmental stages of embryo							
		Not existed	Globular	Heart	early torpedo	Torpedo	Late torpedo	Walking stick	Upturned U
2x x 2x	O	2	2	0	0	6	0	1	0
	IAA	5	5	0	0	1	2	0	0
	K	4	0	0	0	5	0	2	0
	GA	1	0	0	2	3	1	1	2
	T	6	1	0	1	2	0	0	0
Total		18	8	0	3	17	3	4	2
2x x 4x	O	7	4	2	0	0	0	0	0
	IAA	17	2	0	0	0	0	0	0
	K	9	7	1	1	0	0	0	0
	GA	8	3	0	0	0	0	0	0
	T	12	1	1	0	0	0	0	0
Total		53	17	4	1	0	0	0	0
4x x 4x	O	2	1	0	1	4	6	1	0
	IAA	11	4	2	1	0	0	0	0
	K	7	0	0	2	4	1	0	0
	GA	2	0	2	0	4	2	0	0
	T	5	6	2	1	6	0	0	0
Total		27	11	6	5	18	9	1	0
4x x 2x	O	13	1	0	0	1	0	1	0
	IAA	21	0	0	0	1	0	0	0
	K	23	1	1	0	0	1	0	0
	GA	16	2	2	0	0	0	0	0
	T	20	1	0	1	0	0	0	0
Total		93	5	3	1	2	1	1	0

1): Refer to Table 15.

Table 23. Effect of different nutrients and developmental condition of embryo in artificial culture of ovaries

Cross	Medium <sup>1)</sup>	Developmental stages of embryo							
		Not existed	Globular	Heart	Early torpedo	Torpedo	Late torpedo	Walking stick	Upturned <sup>2)</sup>
2x x 2x	N	8	2	0	0	2	1	0	0
	TJ	9	0	0	1	0	0	0	0
	YE	0	1	0	1	7	2	0	0
	Ch	1	3	0	0	3	0	0	0
	CM	0	1	0	0	3	0	3	2
	CMCh	0	1	0	1	2	0	1	0
Total		18	8	0	3	17	3	4	2
2x x 4x	N	8	2	0	0	0	0	0	0
	TJ	12	0	0	0	0	0	0	0
	YE	11	1	0	0	0	0	0	0
	Ch	4	4	1	0	0	0	0	0
	CM	13	4	2	1	0	0	0	0
	CMCh	5	6	1	0	0	0	0	0
Total		53	17	4	1	0	0	0	0
4x x 4x	N	7	1	3	0	2	2	0	0
	TJ	7	2	0	1	0	0	0	0
	YE	3	2	2	2	2	0	0	0
	Ch	3	2	0	1	7	2	0	0
	CM	7	1	0	0	2	1	0	0
	CMCh	0	3	1	1	5	4	1	0
Total		27	11	6	5	18	9	1	0
4x x 2x	N	25	3	0	0	0	0	0	0
	TJ	15	0	0	0	0	0	0	0
	YE	19	0	0	1	0	0	1	0
	Ch	1	1	3	0	2	1	0	0
	CM	22	0	0	0	0	0	0	0
	CMCh	11	1	0	0	0	0	0	0
Total		93	5	3	1	2	1	1	0

1): Refer to Table 15.

## 胚の生育における生長調整物質と栄養物の関係について

各組合せにおける胚の生育については、生長調整物質と栄養物質の関係を調査した結果のうち、生長調整物質については表22に、栄養物質については表23にそれぞれ示した。

生長調整物質については、 $2x \times 2x$  と  $4x \times 4x$  の胚の発育状態をみると、胚珠中には胚の存在しなかったものの数が一番多かつたが、次は "torpedo" 型の胚であつた。"torpedo" 型以上に発育した胚をみると、 $2x \times 2x$  では基本培地のみ(0)で7粒、カイネチン(K)とジベレリン(GA)で同じく個であつた。 $4x \times 4x$  では、基本培地で11個があるのに対し、生長調整物質を添加したものは6個(T, GA)が最も多かつた。

$2x \times 4x$  についてはみると、胚の発育は早く、IAAを含む培地で "early torpedo" 型と示すのみであり、 $4x \times 2x$  では、"torpedo" 型以上に発育した胚は IAA で1個、カイネチンの区で1個

得らぬが、至極調態物質を含む区は  
2粒で最も良かった(表22)。

基本培地に添加した栄養物には、 $2 \times 2$ の  
"torpedo"型以上は培養した胚は、 $2 \times 2$ で、  
胚物を含む区も1区3個に對して、イース  
ト抽出物を含む培地(YE)で9個、ココナツト  
ミルクを含む培地(CM)で8個、ココナツト  
ミルクとカゼイン酸分解物の両者を添加した  
培地(CMCh)で3個あった。特にCMとCMChでは  
何れも培養をみれば胚がみとめられた。 $4 \times 4$ で  
は、栄養物と添加した培地で4個に對して、  
カゼイン酸分解物を添加した区(Ch)で9個、  
ココナツトミルク添加培地で3個、CMChの培  
地からは10個得られた。いずれにも $2 \times 2$ の  
培養は添加した栄養物によつて大きき差  
がみられた。 $2 \times 4$ では最も良く培養した胚  
は、CMの培地で、"early torpedo"型の胚2個あ  
ったが、 $4 \times 2$ ではYEとChの区には $2 \times 2$ の良好に  
培養した胚をもつ胚珠が得られた。

トマトジュースを培地に添加した区には

は、11 ずつの交配組合せから生まれた胚の発達を認める胚珠はみられず、 $2x \times 2x$  と  $4x \times 4x$  にはそれぞれ各 1 個の "early torpedo" 型の胚のみがみられた (表 25)。

胚珠の中には胚が消失してしまつて存在したものの数が一番多くみられたが、 $2x \times 2x$  と  $4x \times 4x$  では、次に多い胚の発達段階は "torpedo" 型のものではあつた。子房の人工培養を行なうと、胚の発達が良好に進行するものは、割合順調に "torpedo" 型まで発達するが、とうとう存続するのは置床したときからほとんど発達しないうちに思われた。

### 子房培養と自然条件下での胚の発達の比較

自然条件下での胚の発達と人工培養した子房でのそれとを比較した。11 ずつの交配組合せにはそれぞれ、成熟すれば生育可能な種子と考へられる胚が観察された (図 7)。

自然条件下での胚の発達程度は、発達段階を過

して調査したものである (Nishiyama and Inomata  
 1966)。人工培養の場合は、交配後4日目の標  
 本をハリスから切り離して子房を無菌的に種々の培  
 地にて培養し、11日を経過した時発育状態を観  
 察したものである。これらの胚・胚乳はハリス  
 にも同じ倍率で、カメラルシダを用いてスリ  
 ックした。図7からも明らかのように、自然  
 条件下で生育出来る種子に存るとみられる胚  
 珠を観察された胚に比べ、人工培養子房に  
 採られた胚は、交配後15日目の段階におい  
 て、3日から7日程生育が良いことが分  
 った。即ち交配後15日目における胚が自然条  
 件の18日或は21日目の胚と同程度の発達  
 した。この胚の発達状態の差異は、用いた培  
 地や、交配組合せに関係なく、同じであつた  
 生育可能な種子に存ると思われる発育段階  
 達しては存る胚では、胚乳の発達が十分で  
 なく、種皮もほとんど萎縮してしまつた。

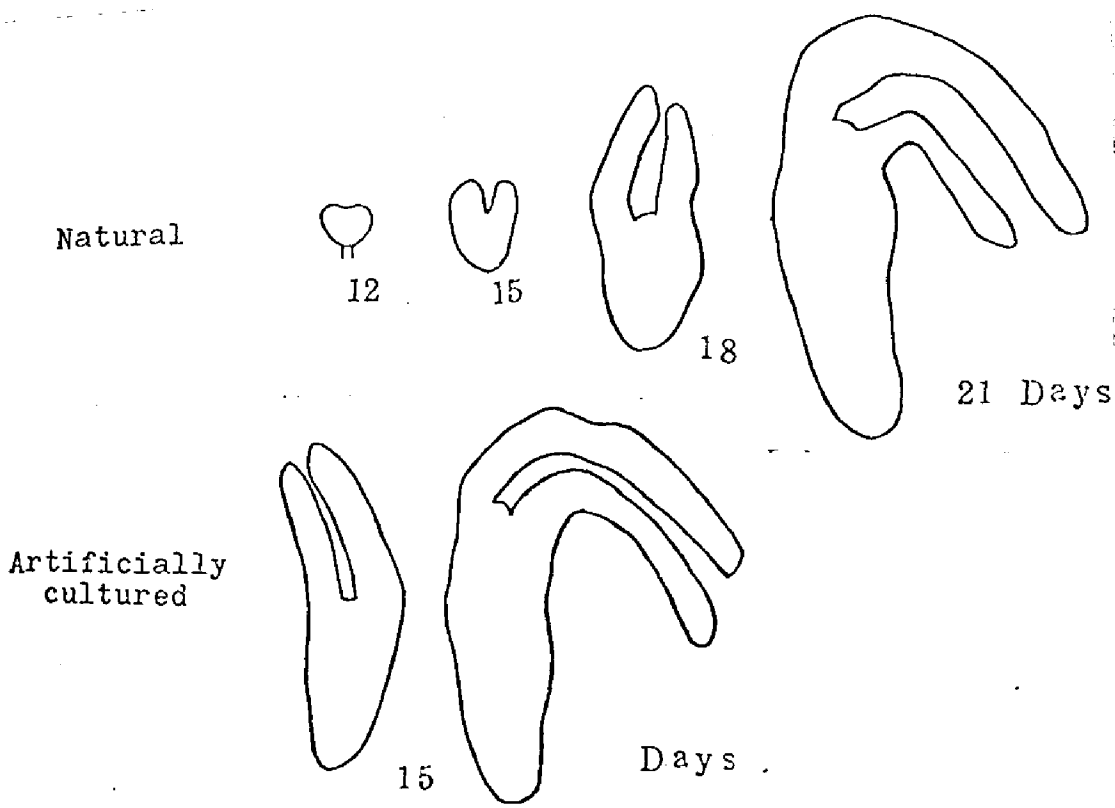


Fig. 7. Development of embryos under natural and artificially cultured condition.



## (2) 器官の人工培養による雑種化の育成

### (i) 自然状態による交雑結果

胚珠および子房の人工培養を行なったときは、その各々の組合せに対し、対照実験も行った。これは、交配を行なったからそのまゝ放置して植物体に着くまま、自然条件下で胚珠の発露をさせ、交配後40日後におこなつて収穫し調査したものである。

## 結 果

対照として自然条件下における交雑結果を調べた。成熟した莢について、莢の長さ、子稔性、得られた種子の発芽率等を調査し結果を表24に示す。表24中NO.1は胚珠培養を行なったときの対照のものであり、NO.2は子房の人工培養を行なったときのそれであり、NO.3とNO.4はそれぞれ修正培地による子房の人工培養の対照実験である(参考、(2)iv)

Table 24. Results of crossing experiment between diploid *B. campestris* ( $2x$ ) and its autotetraploid ( $4x$ ) under natural condition

Cross	No. of capsules examined	Av. capsule length (mm)	No. of seeds obtained	Seed set (%)	Seed germination (%)
N o . 1 *					
$2x \times 2x$	24	26.9	62	12.9	85.5
$2x \times 4x$	5	36.0	0	0.0	-
$4x \times 4x$	23	40.0	95	17.2	94.7
$4x \times 2x$	5	40.5	0	0.0	-
N o . 2 * *					
$2x \times 2x$	37	29.5	126	18.8	92.0
$2x \times 4x$	12	32.0	0	0.0	-
$4x \times 4x$	70	52.1	359	20.3	95.1
$4x \times 2x$	13	37.8	0	0.0	-
N o . 3 * *					
$2x \times 2x$	11	34.4	25	11.4	100
$2x \times 4x$	12	20.9	0	0.0	-
$4x \times 4x$	8	36.9	23	12.0	100
$4x \times 2x$	10	41.5	0	0.0	-
N o . 4 * *					
$2x \times 2x$	7	65.3	115	72.8	90.4
$2x \times 4x$	9	57.7	0	0.0	-
$4x \times 4x$	9	58.3	47	22.0	63.8
$4x \times 2x$	8	63.0	0	0.0	-

\* : Ovule culture.

\*\* : Ovary culture.

実験に使用した2倍体はNO.1からNO.4まで  
= 貧目体菜であり、同種4倍体は11すれも、  
4-1は白菜である。

$2x \times 2x$  と  $4x \times 4x$  では、NO.4の  $2x \times 2x$  の場合  
と除いて11すれも、菜の長さが短く、種子の  
稔性も低かった。これは他殖性作物の Brassic  
を自殖したためと考えられる。またNO.4の  
 $2x \times 2x$  の場合は、種子と直接種子業者から採  
めたものであったので、種子稔性は他のものと  
比べて非常に高く、通常実験に用いたものが  
10%から20%前後の種子稔性であったものが、  
72.8%であった。しかしながら、得られた  
種子の発芽率は  $2x \times 2x$  と  $4x \times 4x$  では、NO.4の  
 $4x \times 4x$  と除いて、11すれも85%以上を示した  
等々種子稔性は胎座数 ( $2x \times 2x$  は20,  $4x \times 4x$   
は24) と得られた種子数から計算した。 $2x$  と  
 $4x$  間の正逆交雑においては、多数の胚珠は  
かに発芽したと思われたが、種子は幼胚の発  
育に崩壊してしまし、交雑種子は11すれの場合  
においても得られなかった(表24)。

子房の人工培養による新型ナブスの育成の研究を行なつたが、この時は種之間に自由交配組合せの対照実験区として、いずれの場合にもこの交配後植物から種子をすぐ放置して、収穫まで待ち、莢の大きさ、得られた種子数、着粒率、その種子の発芽率等が調査された。その結果を表 25-1 と表 25-2 に示す(表 25-1, 25-2)。

B. campestris 群としては、畑菜、野崎白菜、倉町小燕、京都白菜、早生小松菜とニ食自体菜を用いて、B. oleracea 群のサクセツニヨニ、中野早生と野崎中世の交配を行なつたもので、正逆交雑の他に対照区の交配も行なつた。実験区 NO. 1 においては、サクセツニヨニとネオに用いた交配の結果は調査しなかつた。対照実験の交配結果をみると、種子稔性は組合せによつてかなり異つていて、最も低いもので 2.1%、最高 93.8% であつた。得られた種子の発芽率は、早生小松菜の自交を除いていずれも 80~100% を示した。キヤベツのネの

Table 25-1. Results of crossing experiment between B. campestris and B. oleracea under natural condition

Cross	No. of capsules examined	Av. capsule length (mm)	No. of seeds obtained	Seed set (%)	Seed germination (%)
N o . 1 Hatana and Succession					
Hatana x Hatana	7	43.1	36	13.4	97.2
Hatana x Succession	15	61.4	0	0.0	-
Succession x Succession	0	-	-	-	-
Succession x Hatana	0	-	-	-	-
N o . 2 Nozaki-hakusai and Nakano-wase					
Nozaki x Nozaki	7	20.6	3	2.1	100
Nozaki x Nakano	7	32.3	0	0.0	-
Nakano x Nakano	6	91.6	0	0.0	-
Nakano x Nozaki	7	88.0	0	0.0	-
N o . 3 Kanemachi-kokabu and Nakano-wase					
Kabu x Kabu	9	46.2	45	17.7	97.8
Kabu x Nakano	30	23.5	0	0.0	-
Nakano x Nakano	5	110.0	71	47.3	83.1
Nakano x Kabu	8	84.4	0	0.0	-

Table 25-2. Results of crossing experiment between B. campestris and B. oleracea under natural condition

Cross	No. of capsules examined	Av. capsule length (mm)	No. of seeds obtained	Seed set (%)	Seed germination (%)
No. 4 Kyoto-hakusai and Nakano-wase					
Hakusai x Hakusai	4	78.3	105	93.8	82.8
Hakusai x Nakano	13	12.2	0	0.0	-
Nakano x Nakano	3	123.3	71	78.9	100
Nakano x Hakusai	16	104.8	0	0.0	-
No. 5 Wase-komatsuna and Nozaki-chusei					
Komatsuna x Komatsuna	4	74.5	92	82.1	8.9
Komatsuna x Nozaki	5	64.8	0	0.0	-
Nozaki x Nozaki	25	84.8	110	14.7	98.2
Nozaki x Komatsuna	18	66.2	0	0.0	-
No. 6 Nikanme-taina and Succession					
Taina x Taina	6	27.5	20	16.7	100
Taina x Succession	3	21.0	0	0.0	-
Succession x Succession	6	85.0	146	81.1	100
Succession x Taina	27	87.1	0	0.0	-

自殖では種子の得らぬものもあつた。收穫時にはおいて求めた平均の莢の長さ、B. campestris 群と母オに用いた組合せのオは、B. oleracea 群と母オにしたものよりも短く、 $\frac{1}{4}$ から $\frac{1}{2}$ の長さであつた。正逆交雑にはおいては、莢の長さは対照区のものと同程度に発達したものが多かつたが、これ等の莢の中には発達初期には胚嚢生が行なわれたと思われ、そしてやがて止つてしまつた萎縮した胚珠が存在したのみで、発達の良い種子はどの組合せの交配からも得ることは出来なかつた。

## (ii) 胚培養

Brassica にはおいては、胚培養の研究は余りないが、Brassica における種間交雑ではこのほどくどが不稔になる。しかもこれ等の雑種を容易に作成することは、育種上重要であると云はれてゐる。B. oleracea と B. campestris との正逆交雑のうち B. oleracea x B. campestris だけは

幼胚を取り出しで培養することに成功した。此の組合せでは胚が発達初期に崩壊してしまふので、胚培養によつて雑種は得られなかつた (Nishi et al. 1959)。B. campestris の 2 倍体と同價 4 倍体の正逆交雑においても、通常種子は得られなかつた。胚発生学的な研究によると、この場合の種子崩壊は主として胚乳崩壊に起因することが分かつた (Nishiyama and Inomata 1966)。

この事實に基づいて B. campestris の 2 倍体と同價 4 倍体の正逆交雑においても、その胚崩壊以前に無菌的に胚を取り出しで人工培養することを試みた。その結果を以下に述べる。

### 方 法

上述の組織学的ならびに発生学的研究の結果に基づいて、培養のために胚珠から胚を取り出す最も適切な時期を決定した。即ち  $4x \times 2x$  にあつては交配後 12 日目、 $2x \times 4x$  にあつては交配後 13 日目に胚を胚珠から無菌的に摘出



した。この際、植物体から切り取った葉の表面を80%エチルアルコールで殺菌し、予め用意しておいた培養基中に約1mmの塊までを置床した。胚の摘出方法は Van Overbeek et al. (1942) によった。置床した胚は  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ 、1000 ルックスの恒温箱中で培養した。約2週間後には不定形の子葉の著しい発達が認められた個体は作用物質をまったく含まない修正 white の培地に移し替え、茶根とともに本葉の輪廻が始まると、3-4枚にたったとき、試験管から植物体を取り出して、石英砂に移植し、 $20^\circ\text{C}$  の恒温室で栽培した。そしてさらには3週間経過してから土と入れた鉢に移した。これらの植物の系統性の検定にあたっては、形態的調査を行なうとともに、染色体数とPMCの成熟分裂で調べた。

胚培養に用いた基本培地は表26に示す white の修正培地である(表26)。この基本培地は Lupinus luteus から抽出された "embryo factor" を加え pH 6.0 に調整し、 $1.2\text{kg}/\text{cm}^2$  の高圧滅菌を

Table 26. Composition of a modified White's medium used for the embryo culture (mg/l)

MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	36.12
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	197.2
Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>	199.6
KNO <sub>3</sub>	80.0
KCl	67.2
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	14.4
MnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	4.5
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1.52
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1.44
KI	0.75
Ferric citrate FeC <sub>6</sub> O <sub>5</sub> · 5H <sub>2</sub> O	4.0
Glucose	4000
Agar	900

10分間行なう。

用いた "embryo

factor" は Lupinus

luteus の若い未

熟の種子から 2°C

の 80% エタノール

で抽出し、濾

化後溶解液を蒸

発させたものど

ある。蒸発の過

程では 50°C 以上

に温度を上昇さ

せなかつた。全

体重 100g に相当

する Lupinus の種子の抽出物を 10ml の水に溶解し、氷結した状態で保存した。胚培養に使用した濃度は、Lupinus の生体種子 10g の抽出物を 100CC の培養基に加えたものに相当する。即ち培養基 100CC に対し、アルコールで抽出したの水に溶解させた抽出液を 1CC の割合

合が添加した (Matsubara 1962, 1964)。

## 結 果

実験の結果を表27に示す(表27)。

Table 27. Production of triploid hybrids between *B. campestris* (2x) and its autotetraploid (4x), with or without embryo culture

Cross	Embryo culture	No. of flowers pollinated	No. of embryos fertilized	No. of embryos explanted	No. of triploids produced
2x x 4x	no	125	375	-	0
"	do	14	-	4	1
4x x 2x	no	207	1656	-	35
"	do	18	-	20	2

\* estimated on the basis of 8 and 3 embryos per flower in diploid and tetraploid, respectively.

2x x 4x につゝ " は 125 花交配し、約 400 個の胚珠に受精を認められたが、雑種種子は得られなかった。一方胚培養に関し " は、受精した 14 花から 4 個の胚を摘出し、培養した。4 個の胚のうち 2 個が生育したのど、"embryo factor" を除いた white の基本培地に移植した。その後

1個は胚の頂点が緑色を帯びたと = 32 生育が止まつてしまつたが、他方は不規則ながら子葉部の成長を示した。約1ヶ月後に再び white の培地に移すと、旺盛な根と根の伸長を示し、同時に本葉の展開を始めた(四ヶ)。

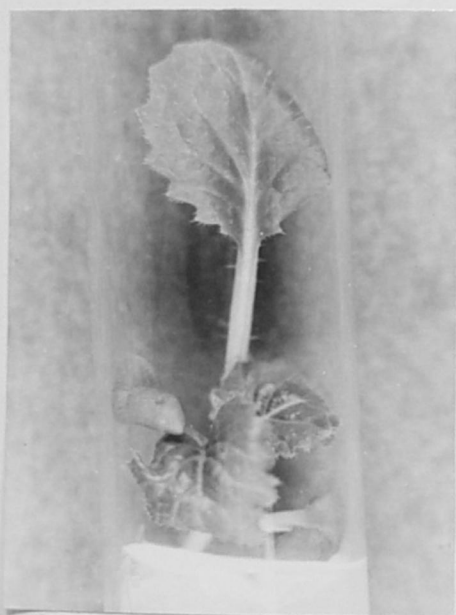


Fig. 7. Hybrid plant obtained from embryo culture in test tube.

得られた雑種個体と両親の葉の形態および植物体全体を表28および図8に比較して示す。2x x 4x からの雑種個体の葉の先端は丸く、2倍体の形質に、葉の厚さは4x型、葉の表面は2x型の形質に近かつた。

4x x 2x についても、207

花を交配し、約1600粒の受精胚珠を認めた。それから計35粒の種子を得たが、これから生じた植物はすべて雑種であつた。一対胚培養に關しては、18花を授粉し、それから20個の胚を摘出して培養した。そのうち3個体の胚

から不足の子葉の生長を認められたので、これを White の無機塩だけの培地に植之替之たところ、 $2x \times 4x$  と同じ時期に発根と本葉の展開がみられた (図7)。この3個体とその後植本鉢に移植したが、うち1個体は枯死し、残りの2個体が生育したので、両親および  $2x \times 4x$  の個体と形態的に比較した (表28, 図8)。葉の先端は丸く、厚さは厚く  $4x$  親型と示し、葉形は滑かど  $2x$  親型と示してゐた。両個体とも、 $2x \times 4x$  から得られた個体と類似してゐた。

$2x \times 4x$  および  $4x \times 2x$  から得た3個体は染色体観察の結果、何れも3倍性雑種でありことが確認された。

Table 28. Morphology of leaves of the hybrid plants obtained from embryo culture

Plant	Shape of leaf tip		Leaf thickness		Leaf surface		Ploidy
	Notched	Round	Thick	Thin	Rough	Smooth	
$2x \times 2x$		*		*		*	$2x$
$4x \times 4x$	*		*		*		$4x$
$2x \times 4x$		*	*			*	$3x$
$4x \times 2x$		*	*			*	$3x$
$4x \times 2x$		*	*			*	$3x$



Fig. 8. Hybrid plants obtained from embryo culture.  
 a: Diploid Brassica campestris ssp. chinensis (L.) Makino.  
 b: Autotetraploid B. campestris ssp. pekinensis (Lour.) Olsson.  
 c:  $F_1$  hybrid from  $2x \times 4x$ .  
 d. and e:  $F_1$  hybrid from  $4x \times 2x$ .

## (iii) 胚珠の人工培養

倍數性の異なる交雑、或は種属間雜種の不稔種子形成と、発生学的な研究からみると、胚の発達が停止するのは、胚自体の生理的・遺伝的な不均衡からの場合もあるが、直接的には胚乳の異常にともなう不稔から、種子不稔を引き起こしてゐると思われれるものが多く存在してゐる。交配した胚珠の発達が止み、胚乳の崩壊が起こつて、胚の崩壊消失以前に胚を胚珠から取り出して、胚培養を行なう他に交雑不適合の組合せから、雜種個体を得る研究として、胚・胚乳と胚珠の関係を明らかにする研究が必要と思われた。

ここでは交雑不適合個体の胚珠の人工培養を種々の培地を用いて試みた。

交配後9日目の胚珠と人工培養に用いた。

これは前述の発生学的観察によつて、この時期までは  $2x \times 4x$  と  $4x \times 2x$  の胚の発達程度は両親と変わりかなく、胚乳も著しい崩壊を示してはなからである。

培養に用いた基本培地は Nitsch (1951) のもので、その無機塩および微量元素と鉄の添加は

$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	500mg	} ----- (1)	次の通りである。(1),
$\text{KNO}_3$	125mg		(2), (3)
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	125mg		を各々1 l
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	125mg		の純水に溶
$\text{H}_2\text{SO}_4$ sp. gr. 1.83	0.5cc	} ----- (2)	解し、(2)
$\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3000mg		液と(3)
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	500mg		液とをそれぞれ
$\text{H}_3\text{BO}_3$	500mg		それぞれ1ccずつ
$\text{Na}_2\text{MnO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	25mg		を取つて(
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	25mg		(3) 1) 液に混
$\text{FeC}_6\text{O}_5\text{H} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	10g	----- (3)	合したものである。この他に基本培地に添加したものは、グリニシ 15mg, ナイアミシ 2.5mg,



ピリドキシン 0.5mg, サイアミン 0.5mg, 蔗糖 5g, 麥天末 9g (それぞれ 1g あたり) があり、培養基の pH は 1N-KOH 或いは 1N-HCl で高圧殺菌前には 6.0 に調整した。高圧殺菌は  $1.2 \text{ kg/cm}^2$  で 10 分間行なった。培養に用いた試験管は 18 x 180 mm のものを、その中には 10ml の培地を入れた。

この基本培地には、さらに、IAA, カイネチン, ジベレリン, トマトジュース (15% と 25%), イースト抽出物 (2g/l) を必要に応じて添加した。IAA, カイネチン, ジベレリンの添加量は表 29 に示す (表 29)。

交配後 9 日目の子房を植物体から取り取り、すぐに 70% エタノールで表面を殺菌し、カミソリの刃で切り開いて胚珠を摘出した。これを予め用意した培地に置床した (図 9)。置床した胚珠の数は試験管 1 本当たり 4 個である。培養条件は温度  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , 蛍光灯で 300-500 lx の連続照明を行なった。

植之込んどから 31 日後 (交配後 40 日目) に

Table 29. The concentration of IAA, kinetin and gibberellin in different media (mg/l)

Medium	IAA	Kinetin	GA. <sup>1)</sup>
K-1	0	0	-
K-2	1	0	-
K-3	5	0	-
K-4	0	0.1	-
K-5	1	0.1	-
K-6	5	0.1	-
K-7	0	0.5	-
K-8	1	0.5	-
K-9	5	0.5	-
G-1	0	-	0
G-2	1	-	0
G-3	5	-	0
G-4	0	-	1
G-5	1	-	1
G-6	5	-	1
G-7	0	-	5
G-8	1	-	5
G-9	5	-	5

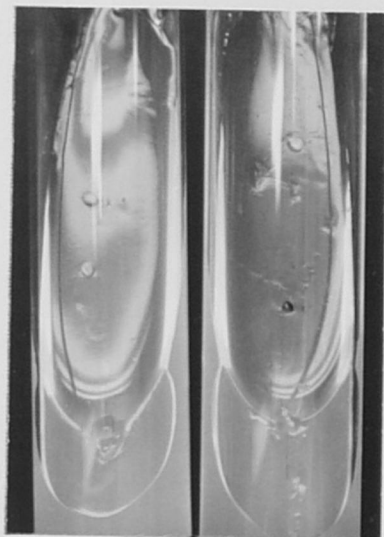


Fig. 9. Explanted ovules in test tubes.

1): Gibberellin.

胚珠の発達状

態を調べた。

また置床6日

後(交配後15

日目)に6~13個の胚珠を各皿から取り出し、  
 胚珠の発達状態と組織学的に調べた。その結  
 果はすでに述べたとおりである。

### 結 果

結果を表30にまとめて示す(表30)。表30

Table 30. Effects of IAA, kinetin, gibberellin, tomato juice and yeast extract on the growth of cultured ovules

Medium*	N o . o f o v u l e s			
	Cultured	Examined	Somewhat developed	Un-developed
K-1	54	48	19	27
K-2	47	38	21	17
K-3	43	33	17	16
K-4	44	36	17	19
K-5	48	35	18	17
K-6	44	38	21	17
K-7	44	35	20	15
K-8	44	36	25	11
K-9	42	33	25	8
G-1	59	51	17	34
G-2	47	39	14	25
G-3	47	37	20	17
G-4	45	34	26	8
G-5	44	31	25	6
G-6	44	32	21	11
G-7	43	32	21	11
G-8	39	28	20	8
G-9	38	30	22	8
T-1	80	70	39	31
T-2	55	48	28	20
T-3	58	47	31	16
Y-1	60	47	30	17

- \* K-1 to G-9: Refer to Table 29.  
 T-1: Basal medium (=K-1, G-1).  
 T-2 and T-3: Basal medium plus tomato juice 15% and 25% respectively.  
 Y-1: Basal medium plus yeast extract (2g/l).

に於いて、各培養区の培養された胚珠数は、4つの交配組合せ ( $2x \times 2x$ ,  $2x \times 4x$ ,  $4x \times 4x$ ,  $4x \times 2x$ ) とまとめられたものであり、交配組合せによつて植えこんだ胚珠の数が異なるが、これは受精率の違いによるものである。表30における  $k-1$ ,  $G-1$  と  $T-1$  はそれぞれ基本培地だけと含羞対照区である。

IAA とカイネチンと培地に添加してその相互作用を調査した結果、 $2x \times 2x$  と  $4x \times 4x$  に於いては幾分発達したと思われる胚珠が半数あることは以上ある区がほとんどであったが、 $2x \times 4x$  と  $4x \times 2x$  とに於いては幾分発達したと思われる胚珠が全体の  $1/3$  であった。IAA とカイネチンとの相互作用と胚珠の発達との関係については明らか傾向がみられなかった。外見上は種皮の発達程度に関して、自然条件のものと同程度のものが認められたが、その胚珠の形は球形ではなく凹んでいた。発芽可能な種子は必ず此の区からも得られなかった。

IAA とジベレリンの相互作用を調べてみる

と、全体的に  $2x \times 2x$  と  $4x \times 4x$  の胚珠の発達は  
 良い傾向がみられた。4組合せを総合してみ  
 ると、ジベレリン無添加区 (G-1, G-2, G-3) より  
 も添加区 (G-4 ~ G-9) の方が、胚珠の発達は  
 良かった。これらの区においても外観上、自  
 然条件下のものと同じ程度の発達を示す胚珠  
 がみられたが、球形ではなく凹みと歪んでい  
 る、発芽可能な種子は必ずこれらの区からも得ら  
 れなかった。

トマトジューズ (15%, 25%) とイースト抽出物  
 (2g/l) の効果については、 $4x \times 4x$  と  $4x \times 2x$  に  
 おいて発達した胚珠が多数みられたが、対照  
 区 (基本培地だけ) においても同じ傾向があ  
 ったので、トマトジューズ等はイースト抽  
 出物が有効であったかどうか明らかでない。

以上のように、培養に種々の培地を用いた  
 が、種々の生長調整物質やトマトジューズ、  
 イースト抽出物等の添加物の胚珠の発達に及  
 ぶる効果は明らかでなかった。またオキシ  
 ン、カイネチン等と含羞培地においても、胚

珠のカルス化は認められなかった。

#### (iv) 子房の人工培養

Datura の種間交雑を行なうと、或る組合せにおいでは受精卵は2, 3回分裂するだけで退化してしまったり (Satina and Blakeslee 1935), 接合体が分裂せず胚乳が数回分裂するだけのものや、発達が遅れ胚乳の異常によつて球型の胚のときは胚珠の発達がとんでしまう (Sacht 1948)。このように胚発生の初期の胚嚢の崩壊が起こつて不稔に存る場合は、胚培養を行なうことは困難である。 Brassica oleracea (Howard 1939) と Raphanus sativus (Nishiyama 1952a, b, Inomata 1970) の  $2x$  と  $4x$  の交配では、 $2x \times 4x$  では種子形成の異常によつて不稔に存るが、 $4x \times 2x$  では雑種個体が出来ると。ところが同じ Brassica 属においでも B. campestris 科における  $2x$  と  $4x$  の交配では、 $2x \times 4x$  と  $4x \times 2x$  のいずれの組合せでも不稔種子しか得られないうし、また B. oleracea

と *B. campestris* の正逆交雑に於いても通常種子は得られず。このような不稔種子の発生学的研究を行なつた (A-(1)-(i))。この不稔種子の胚培養を行なつて雑種個体を得ることは出来た (Inomata 1967, A-2-ii)。しかしながら、胚と胚乳と胚珠の関連に於いては、胚培養の研究では十分でなく、胚珠の人工培養を行なつた。種々の培養法を試みて雑種育成を試みたが、雑種個体を得ることは出来なかつた (A-(2)-(iii))。

ここでは更に雑種個体を得る目的で、子房の人工培養と種々の培地を用いて試みた。

### 方 法

本実験では子房の人工培養を試みた。培養には交配後4日目の子房を用いた。これは、 $2x \times 2x$ ,  $2x \times 4x$ ,  $4x \times 4x$ ,  $4x \times 2x$  とともに時期の胚・胚乳の発達には大きな差異がみられることはよるものである。

培養に用いた培地は胚珠培養のものと同じ Nitsch (1951) のもので、それには 1 l あたりに グリシン 15 mg, ナイアシン 2.5 mg, ピリドキシン 0.5 mg, サイアミン 0.5 mg, 蔗糖 50 g, 寒天末 9 g を添加して基本培地とした。この基本培地には IAA, カイネチン, ジベレリン, トマトジューズ (15% と 25%), イースト抽出物 (2g/l), カゼイン酸分解物, ココナットミルクと種々の組合せで添加した。カイネチンとジベレリンを IAA と組み合わせで用いた。(その添加量と培地の略称を表 31 に示す (表 31))。また トマトジューズ (15%, 25%) と イースト抽出物 (2g/l) のそれぞれを単独に用いたものの他に、トマトジューズ, イースト抽出物, カゼイン酸分解物, ココナットミルクと IAA, カイネチン, ジベレリンと組み合わせで添加した。それ等の添加量と培地の略称を表 32 に示す (表 32)。

表 32 の結果から、カゼイン酸分解物とイースト抽出物の組合せ (表 33), ココナットミルクとイースト抽出物の組合せ (表 34), コ



Table 31. The concentration of IAA, kinetin and gibberellin in different media (mg/l)

Medium	IAA	Kinetin	GA. 1)
K-1	0	0	-
K-2	1	0	-
K-3	5	0	-
K-4	0	0.1	-
K-5	1	0.1	-
K-6	5	0.1	-
K-7	0	0.5	-
K-8	1	0.5	-
K-9	5	0.5	-
G-1	0	-	0
G-2	1	-	0
G-3	5	-	0
G-4	0	-	1
G-5	1	-	1
G-6	5	-	1
G-7	0	-	5
G-8	1	-	5
G-9	5	-	5

1): Gibberellin.

コナットミル

クとカゼイン

酸分解物の組

み合わせ (表

35) をつくり

実験をおこな

った。更に培

地の改良を行

った。カゼイン

酸分解物とコ

コナットミル

クを組み合わせ

せた培地を作

成した。この培地の添加量と略称を表36に示

す (表36)。培地のpHは高圧殺菌前には 1N-HCl

で 1N-KOH で 6.0に調整した。高圧殺菌は

1.2kg/cm<sup>2</sup> で10分間行なった。実験に用いた試

験管は 18 x 180mm のもので、その中には 10ml の培

地を入れ、綿栓を施した。

上述したように交配後4日目の子房を植物

Table 32. Composition of enriched media for culturing excised ovaries

	None	IAA	K	GA	T
BM	NO	NI	NK	NG	NT
BM-TJ	TJO	TJI	TJK	TJG	TJT
BM-YE	YEO	YEI	YEK	YEG	YET
BM-Ch	ChO	ChI	ChK	ChG	ChT
BM-CM	CMO	CMI	CMK	CMG	CMT
BM-CM-Ch	CMChO	CMChI	CMChK	CMChG	CMChT

IAA: 1mg/l, K: kinetin 0.1mg/l, GA: gibberellin 1mg/l, T: IAA+K+GA, BM: basal only, TJ: tomato juice (15%), YE: yeast extract (2g/l), Ch: casien hydrolysate (300mg/l), CM: coconut milk (10%), CMCh: casein hydrolysate+coconut milk.

Table 33. Composition of various-media supplemented with yeast extract and casein hydrolysate used for culturing ovaries

Casein hydroly- sate (mg/l)	Y e a s t e x t r a c t (g/l)			
	0	2	5	10
C	YEC- 1	YEC- 2	YEC- 3	YEC- 4
300	YEC- 5	YEC- 6	YEC- 7	YEC- 8
1000	YEC- 9	YEC-10	YEC-11	YEC-12
2000	YEC-13	YEC-14	YEC-15	YEC-16

体から切り取り、花弁の付いたものは  
 水を取り除いて、直ちに5%サライシ粉水に8  
 ～10分間浸して消毒し、水を滅菌水で4回  
 丁寧に洗浄してから試験管当り1個の子房を  
 斜面培地上に植之込んだ(図10)。培養は

Table 34. Composition of various media supplemented with yeast extract and coconut milk used for culturing ovaries

		C o c o n u t m i l k (%)			
		0	10	20	30
Yeast extract (g/l)	0	CMYE- 1	CMYE- 2	CMYE- 3	CMYE- 4
	2	CMYE- 5	CMYE- 6	CMYE- 7	CMYE- 8
	5	CMYE- 9	CMYE-10	CMYE-11	CMYE-12
	10	CMYE-13	CMYE-14	CMYE-15	CMYE-16

Table 35. Composition of various media supplemented with coconut milk and casein hydrolysate used for culturing ovaries

		C o c o n u t m i l k (%)			
		0	10	20	30
Casein hydroly- sate (mg/l)	0	CMC- 1	CMC- 2	CMC- 3	CMC- 4
	300	CMC- 5	CMC- 6	CMC- 7	CMC- 8
	1000	CMC- 9	CMC-10	CMC-11	CMC-12
	2000	CMC-13	CMC-14	CMC-15	CMC-16

Table 36. Composition of various media supplemented with coconut milk and casein hydrolysate used for culturing ovaries

		C o c o n u t m i l k (%)			
		0	10	15	20
Casein hydroly- sate (mg/l)	0	CMC- 1	CMC- 2	CMC- 3	CMC- 4
	300	CMC- 5	CMC- 6	CMC- 7	CMC- 8
	500	CMC- 9	CMC-10	CMC-11	CMC-12
	1000	CMC-13	CMC-14	CMC-15	CMC-16

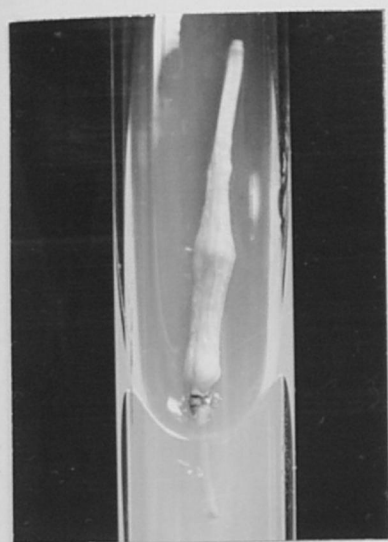


Fig. 10. Explanted ovary in test tube.

22±2°C で 300-500 ルクス の  
 蛍光灯の連続照明下で行な  
 った。子房を植えこんでか  
 ら 36 日後 (交配後 40 日目)  
 に 莖の長さ, 種子稔果率,  
 切り口のカルス形成等につ  
 いて調査した。

## 結 果

### 培養当初における子房の長さ

交配後 4 日目に植えこんだ子房の平均の大  
 きさを調査した。その結果を表 37 に示す (表  
 37)。表 37 のうち NO. 1 は、実験方法の表 31,  
 32 と トマト ジューズ (15%, 25%) と イースト  
 抽出物 (2g/l) を単独に添加したときの植え  
 こんだ子房の平均の大きさであり、NO. 2 は  
 実験の表 33, 34 と 35 のものである、NO. 3 は  
 表 36 の実験区に植えこんだ、交配後 4 日目の  
 子房の大きさである。NO. 1 と NO. 2 には、

Table 37. Average length of explanted ovaries

Cross	No. of ovaries examined	Av. capsule length (mm)
No. 1		
2x x 2x	32	10.7
2x x 4x	38	10.9
4x x 4x	35	13.7
4x x 2x	34	15.9
No. 2		
2x x 2x	34	10.1
2x x 4x	40	10.2
4x x 4x	34	11.6
4x x 2x	40	15.8
No. 3		
2x x 2x	20	20.8
2x x 4x	20	19.7
4x x 4x	20	17.4
4x x 2x	20	19.8

2x個体を母親とし

た場合、4x個体を

母親としたものよ

りも、子房の長さ

は短かった。2x x

2x と 2x x 4x 2" は、

差がみられなかつ

たが、4x x 4x と

4x x 2x 2" は、後者

の才が長かつた。

No. 3 の場合には

20個調査したが、

大きさはほとんど差

がなく 4x x 4x が一

番短かく、2x x 2x が一番長かつた。

子房の人工培養

種々の植物生長調整物質は培養物質と添加した培地の子房を人工培養し、種子特性

切り口のカルス形成等について調べた。植え  
 こんど子房は各表に示すように、バクテリア  
 やカビの侵入がほとんどなかった。表32から  
 36までに示した培地については、実験を一度に  
 行なうことができなかったのど、表32は培養  
 物質を添加した培地組成により、6回に分け  
 て行なった。表33から表36までは各表の培地  
 とも No. 1 から No. 8 までと、No. 9 から No. 16 ま  
 までとに分けて行なった。

IAA とカイネチンの相互作用： IAA とカ  
 イネチンの相互作用を調査した結果を表38-1  
 と表38-2 に示す(表38-1, -2)。表38-1  
 は  $2x \times 2x$  と  $2x \times 4x$  の結果を示し、表38-2は  
 $4x \times 4x$  と  $4x \times 2x$  の結果を示した。植えこんだ  
 子房の数と調査数が異なるのは、胚珠  
 の発達中の状態を調査するため各2割1個の  
 子房を、交配後15日目に固定したためである。  
 収穫時の莢の長さや自然条件下で交配、発達

Table 38-1. Interacting effects of IAA and kinetin on cultured ovaries in 2x x 2x and 2x x 4x

Cross	Medium <sup>1)</sup>	No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	Av. capsule length (mm)	Av. callus formation	No. of seeds obtained	Seed set (%)	Seed Germination (%)
2x x 2x	K-1	3	2	23.0	-	0	0.0	-
	K-2	3	2	21.5	-	1	2.5	0.0
	K-3	3	2	23.5	+	1	2.5	0.0
	K-4	3	1	14.0	-	0	0.0	0.0
	K-5	3	2	21.0	+	1	2.5	0.0
	K-6	3	2	23.0	+	2	5.0	50.0
	K-7	3	2	22.0	+	0	0.0	-
	K-8	3	2	18.5	+++	0	0.0	-
	K-9	3	2	20.0	++	1	2.5	0.0
Total		27	17	21.1		6	1.8	16.7
2x x 4x	K-1	3	2	16.5	-	0	0.0	-
	K-2	3	2	23.0	± <sup>2)</sup>	0	0.0	-
	K-3	3	2	17.5	+	0	0.0	-
	K-4	3	1	21.0	+	0	0.0	-
	K-5	3	2	21.0	+	0	0.0	-
	K-6	3	2	19.0	+++	0	0.0	-
	K-7	3	2	19.0	±	0	0.0	-
	K-8	3	2	19.5	+	0	0.0	-
	K-9	3	2	18.5	+++	0	0.0	-
Total		27	17	20.6		0	0.0	-

1): Refer to Table 31.  
 2): Roots were formed from the callus.

Table 38 -2. Interacting effects of IAA and kinetin on cultured ovaries in 4x x 4x and 4x x 2x

Cross Medium	No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	AV. capsule length (mm)	AV. callus formation	No. of seeds obtained	Seed set (%)	Seed germination (%)
4x x 4x	3	1	22.0	±	2	8.3	0.0
	2	1	23.0	+	5	20.8	20.0
	3	2	23.0	++ <sup>2)</sup>	2	4.2	0.0
	3	1	11.0	-	0	0.0	-
	3	2	18.0	++	1	2.1	0.0
	3	2	20.0	+++	1	2.1	0.0
	3	2	24.5	±	3	6.3	66.7
	3	2	22.0	+	0	0.0	-
	3	2	21.0	+++	6	12.5	16.7
Total	27	15	21.3		20	5.6	20.0
4x x 2x	3	2	34.0	±	0	0.0	-
	3	2	28.5	± <sup>2)</sup>	1	2.1	0.0
	3	1	31.0	+++ <sup>2)</sup>	0	0.0	-
	3	2	22.0	±	1	2.1	0.0
	3	2	24.0	++	1	2.1	0.0
	3	2	21.5	+++	0	0.0	-
	3	1	32.0	±	0	0.0	-
	3	2	31.5	±	0	0.0	-
	3	2	30.0	+++ <sup>2)</sup>	0	0.0	-
Total	27	16	28.5		3	0.8	0.0

1): Refer to Table 31.  
 2): Roots were formed from the callus.



したものと較べてみると(表24, NO.2), 11  
 ずれも生育が劣つていたが,  $2x \times 2x$  には  
 はその差が小さかつた。  $2x \times 4x$  と  $4x \times 2x$  には  
 莖の平均長が自然条件下で生育したものに較  
 べ, 約半分であつた。また, 図11に示すよう  
 に植物体から切り取つた切り口からカルス組  
 織の発達したものがみられた(図11)。カル

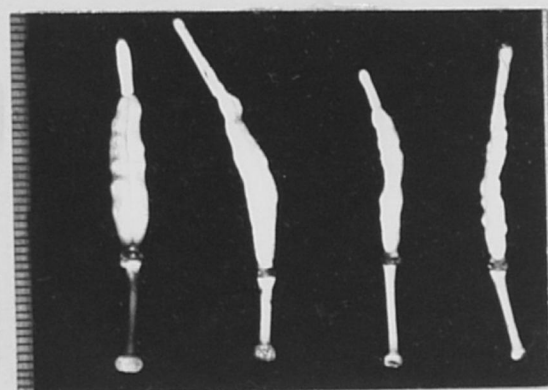


Fig. 11. Callus formation  
 at the cut end of cultured  
 ovaries, right to left; ±,  
 +, ++, +++, showing differ-  
 ent degree of callus forma-  
 tion.

ス形成にまつては,

IAA とカイネチン  
 相互作用があり, K6  
 とK-9区, 即ち IAA  
 $5 \text{ mg/l}$  とカイネチン  
 $0.1 \text{ mg/l}$ , IAA  $5 \text{ mg/l}$   
 とカイネチン  $0.5 \text{ mg/l}$   
 を含む区で, カルス  
 形成が目立つた。カ

ルスから根の発生もみられた。カルスを形成  
 したもののからは根の発生は見られなかつた。  
 カルスが形成されてゐる場合, その程度と根  
 の発生との間には直接の関係はみられなかつ

た。得られた種子は  $2x \times 2x$  で 6 粒,  $4x \times 4x$  で 20 粒,  $4x \times 2x$  で 3 粒であった。  $2x \times 4x$  においては種子は得られなかった。発芽率は自然条件下で得られた種子の発芽率に比べ、著しく低かった。  $4x \times 2x$  の組合せの種子はいずれも不発芽に終わった。種子形成については、カリスの場合と異なり、IAA とカイネチンの相互作用はみられなかった。

IAA とジベレリンの相互作用: IAA とジベレリンの相互作用を調査した結果をまとめて表 39-1 と表 39-2 に示す (表 39-1, -2)。表 39-1 は  $2x \times 2x$  と  $2x \times 4x$  の結果を示し、表 39-2 は  $4x \times 4x$  と  $4x \times 2x$  の結果を示した。莖の長さは IAA とカイネチンを含む区と同じか、それ以上の差を示した。IAA とジベレリンの濃度差による生育の差異はみられず、どの区においても同じような生育状態を示した。交配組合せの点からみると、 $2x$  を母親として

Table 59-1. Interacting effects of IAA and Gibberellin on cultured ovaries in 2x x 2x and 2x x 4x

	Cross	Medium	No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	Av. capsule length (mm)	Av. callus formation	No. of seeds obtained	Seed set (%)	Seed Germination (%)
2x x 2x	G-1		3	2	18.0	-	0	0.0	-
	G-2		3	2	21.0	-	1	2.5	0.0
	G-3		3	2	20.5	-	1	2.5	0.0
	G-4		3	2	22.0	-	0	0.0	-
	G-5		3	2	27.5	± 2)	0	0.0	-
	G-6		3	2	19.0	-	0	0.0	-
	G-7		3	2	23.5	-	0	0.0	-
	G-8		3	2	21.5	-	0	0.0	-
	G-9		3	2	18.5	±	0	0.0	-
Total			27	18	21.2		3	0.8	0.0
2x x 4x	G-1		3	2	22.5	-	0	0.0	-
	G-2		3	2	22.0	-	0	0.0	-
	G-3		3	2	28.5	+ 2)	0	0.0	-
	G-4		3	2	31.5	-	0	0.0	-
	G-5		3	2	21.5	± 2)	0	0.0	-
	G-6		3	2	20.5	+ 2)	0	0.0	-
	G-7		3	2	21.5	-	0	0.0	-
	G-8		3	2	27.0	± 2)	0	0.0	-
	G-9		3	2	20.5	±	0	0.0	-
Total			27	18	23.8		0	0.0	-

1): Refer to Table 51.  
 2): Roots were formed from the callus.

Table 39 -2. Interacting effects of IAA and gibberellin on cultured ovaries in 4x x 4x and 4x x 2x

Cross (medium)	No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	Av. capsule length (mm)	Av. callus formation	No. of seeds obtained	Seed set (%)	Seed germination (%)
4x x 4x							
G-1	3	2	27.0	-	3	6.3	33.3
G-2	3	2	23.5	±2)	5	10.4	40.0
G-3	3	2	24.0	±2)	5	10.4	40.0
G-4	3	2	25.0	±	2	4.2	50.0
G-5	3	2	27.0	±2)	4	8.3	75.0
G-6	3	2	31.5	±2)	1	2.1	0.0
G-7	3	2	30.0	-	4	8.3	0.0
G-8	3	2	38.0	±	2	4.2	50.0
G-9	3	2	31.5	±2)	2	4.2	50.0
Total	27	18	28.6		28	6.5	39.3
4x x 2x							
G-1	3	2	30.5	-	0	0.0	-
G-2	3	2	24.5	-	0	0.0	-
G-3	3	2	30.0	-	0	0.0	-
G-4	3	2	29.5	±	0	0.0	-
G-5	3	2	28.0	-	0	0.0	-
G-6	3	2	26.0	±2)	0	0.0	-
G-7	3	2	29.5	-	0	0.0	-
G-8	3	2	29.0	-	0	0.0	-
G-9	3	2	29.5	-	0	0.0	-
Total	27	18	28.4		0	0.0	-

1): Refer to Table 31.  
2): Roots were formed from the callus.

用いたもののオが4xと母親として用いたものよりも短かった。カルスの形成については、全般的に不良で、IAAを全く含まない区(G-1, G-4, G-7)ではカルスの形成はみられなかった。カルスからの発根の頻度は高く、IAA 5mg/l とジベリリ 1mg/l の区(G-6)ではどの組合せからとも発根がみられ、その頻度が最も高かった。

得られた種子は2x x 2xでは3粒、4x x 4xでは29粒(すべてこの区から得られた)得られたが、2x x 4xと4x x 2xからは得られなかった。得られた種子の発芽率は基本的に種子数が少ない場合が高かった。

トマトジューズとイースト抽出物： トマトジューズとイースト抽出物を基本培地に添加したときの種子形成の状態を表40に示す(表40)。莢の長さはイースト抽出物を添加したもので2x x 2xが最も長く、他の区では2xと母親にしたオが4xと母親にしたものよりも短

Table 40. Effects of tomato juice and yeast extract on cultured ovaries

Cross Medium	No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	AV. capsule length (mm)	AV. callus formation	No. of seeds obtained	Seed set (%)	Seed germination (%)
2x x 2x	T-1	5	23.3	-	0	0.0	-
	T-2	4	27.3	-	0	0.0	-
	T-3	3	25.5	+	0	0.0	-
	Y-1	3	31.0	-	1	2.5	0.0
Total	15	11	26.2		1	0.5	0.0
2x x 4x	T-1	3	24.0	-	0	0.0	-
	T-2	3	25.5	-	0	0.0	-
	T-3	3	24.0	±	0	0.0	-
	Y-1	3	22.0	±	0	0.0	-
Total	12	8	23.6		0	0.0	-
4x x 4x	T-1	3	26.5	-	1	2.1	0.0
	T-2	3	28.5	+	1	2.1	0.0
	T-3	3	26.5	+	0	0.0	-
	Y-1	3	24.5	±	1	2.1	0.0
Total	12	8	26.4		3	1.6	0.0
4x x 2x	T-1	3	30.5	-	1	2.1	0.0
	T-2	2	33.0	±	1	4.2	0.0
	T-3	3	31.5	±	0	0.0	-
	Y-1	4	29.3	±	1	1.4	0.0
Total	12	8	30.1		3	1.6	0.0

1): T-1, basal medium (=K-1, G-1), T-2 and T-3, basal medium added to tomato juice 15% and 25% respectively, Y-1, basal medium added to yeast extract (2g/l).

く存つた。切り口におけるカルス形成に  
ついては、トマトジュース・イースト抽出物  
の添加で僅かにみられた。よゝからの発根  
はなかつた。得られた種子は  $2x \times 2x$  2粒、  
 $4x \times 4x$  2粒、 $4x \times 2x$  2粒であったが、よゝ  
のいずれも発芽しなかつた。 $2x \times 4x$  からは種  
子は得られなかつた。

更に、IAA、カイネチン、ジベレリンと種  
々の栄養物質の相互作用と比較検討するため  
に表32の培地を用いて培養を行なつた。

表41は基本培地は IAA、カイネチン、ジベ  
レリンと単独或いは混合して添加した培地を  
用いた時の結果を示す(表41)。莖の長さは  
 $4x$ と母親として用いたものの約が、 $2x$ と母親  
として用いたものよりよく、IAA、カイネチ  
ン、ジベレリン等の生長調整物質の添加によ  
る差異はなかつた。カルス形成の程度の差は  
個体間に見られたが、培養基組成による差異  
はなく、余りよい発達はみられなかつた。種  
子形成については、 $4x \times 4x$ の約が  $2x \times 2x$ より

Table 41. Interacting effects of growth substances on cultured ovaries

Cross Medium	No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	Av. capsule length (mm)	Av. callus formation	No. of seeds obtained	Seed set (%)	Seed Germination (%)
2x x 2x	8	7	22.7	±2)	1	0.7	100
	8	7	19.3	+	0	0.0	-
	8	7	22.1	+	1	0.7	0.0
	8	7	21.7	±	1	0.7	0.0
	8	7	20.7	++	0	0.0	-
Total	40	35	21.9		3	0.4	33.3
2x x 4x	9	8	25.3	±	0	0.0	-
	9	8	20.6	±	0	0.0	-
	8	7	21.0	±	0	0.0	-
	9	8	23.0	±	0	0.0	-
	9	8	20.8	+	0	0.0	-
Total	44	39	22.2		0	0.0	-
4x x 4x	8	7	30.9	±	7	4.2	71.4
	8	7	28.0	±	0	0.0	-
	8	7	31.0	+	5	3.0	40.0
	8	7	32.7	±	2	1.2	50.0
	8	7	27.0	+	1	0.6	0.0
Total	40	35	29.9		15	1.8	46.7
4x x 2x	9	8	32.1	-	0	0.0	-
	9	8	29.0	-	0	0.0	-
	8	7	29.0	±	0	0.0	-
	9	8	32.9	±	1	0.5	0.0
	9	8	28.3	-	0	0.0	-
Total	44	39	30.3		1	0.1	0.0

1): Refer to Table 32, 2): Roots were formed from the callus.



も良く、その発芽率は「いずれの場合も基本培地だけのものが最も良かった。2x x 4x z」はこの区にはおいても種子の形成はなかった。

4x x 2x z」はジベレリン添加区にはおいても1粒みられたが、発芽しなかった。

基本培地にはトマトジュースと生長調整物質を添加した培養基についての結果を表42に示す(表42)。莖の生長は他の区と同じであった。カルス形成については個体変異が大きく、同じ培地においても発達の非常に良いものから、ほとんどカルスを形成しないものまで観察された。種子は全く得られなかった。

イースト抽出物を添加した培地についての結果を表43に示す(表43)。莖の長さには雌雄傾向がみられた。即ち2xを母親とした交配の子が4xのそれよりも短かった。カルスの形成は全般的に良かった。成熟種子の形成については、2x x 2x は4x x 4x に較べると、どの培養基組成区にあってもより結果を示したが、その発芽率は低く最高63.6%であった。2x x 4x

Table 4-2. Interacting effects of growth substances and tomato juice on cultured ovaries

Cross Medium	No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	Average capsule length (mm)	Average callus formation	No. of seeds obtained	Seed set (%)
2x x 2x	TO	7	22.3	-	0	0.0
	TI	7	19.1	-	0	0.0
	TK	7	22.1	±	0	0.0
	TG	7	22.0	±	0	0.0
	TT	7	18.9	±	0	0.0
Total	40	35	20.9		0	0.0
2x x 4x	TO	9	23.4	±	0	0.0
	TI	7	20.0	-	0	0.0
	TK	8	24.4	±	0	0.0
	TG	7	23.9	±	0	0.0
	TT	9	19.9	±	0	0.0
Total	45	38	22.3		0	0.0
4x x 4x	TO	8	30.0	±	0	0.0
	TI	8	28.9	±	0	0.0
	TK	8	34.7	++	0	0.0
	TG	8	36.1	±	0	0.0
	TT	8	27.4	+	0	0.0
Total	40	35	31.4		0	0.0
4x x 2x	TO	9	40.0	+	0	0.0
	TI	9	35.1	-	0	0.0
	TK	9	36.1	++	0	0.0
	TG	9	39.9	+	0	0.0
	TT	8	33.3	±	0	0.0
Total	44	39	37.1		0	0.0

1): Refer to Table 32. 2): Roots were formed from the callus.

Table 45. In vivo effect of growth substances and yeast extract on cultured ovaries

Cross	Medium	No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	AV. capsule length (mm)	AV. callus formation	No. of seeds obtained	Seed set (%)	Seed Germination (%)
2x x 2x	Y0	3	7	21.3	±	2	1.4	0.0
	Y1	3	7	20.9	±	11	7.9	63.6
	YK	8	7	21.0	±	4	2.9	0.0
	YG	8	7	22.0	±	7	5.0	28.7
	YT	8	7	22.6	+	11	7.9	18.2
Total		40	35	21.5		35	5.0	31.4
2x x 4x	Y0	9	8	21.3	#	0	0.0	-
	Y1	3	7	26.0	±	0	0.0	-
	YK	8	7	24.0	±	0	0.0	-
	YG	10	9	21.8	±	0	0.0	-
	YT	10	8	24.6	+	0	0.0	-
Total		45	39	23.4		0	0.0	-
4x x 4x	Y0	7	6	30.7	±	2	1.4	50.0
	Y1	7	6	36.2	±	1	0.7	0.0
	YK	2	7	35.7	+	1	0.6	0.0
	YG	8	7	31.6	+	2	1.2	50.0
	YT	8	7	30.7	+	5	3.0	0.0
Total		33	33	32.9		11	1.4	18.2
4x x 2x	Y0	8	7	32.6	±	2	1.2	50.0
	Y1	7	6	33.8	±	0	0.0	-
	YK	7	6	33.7	+	0	0.0	-
	YG	6	5	31.8	+	0	0.0	-
	YT	8	7	28.0	+	0	0.0	-
Total		36	31	30.8		2	0.3	50.0

1): Refer to Table 32.

では見熟種子は得られなかったが、 $4x \times 2x$ に  
あつては10区で2粒の種子が得られた。その  
うちの1粒は発芽し、3倍体雑種植物として  
生育した。

表44は基本培地にカゼイン分解物を IAA,  
カイネチン, ジベリリンと色々組合せで添加  
したときの結果を示す(表44)。莢の長さ  
については培地による差異はみられなかった。

母親による差異は明瞭であった。カルス形成  
は全般的に良好であった。カルスからの発根  
もみられた。種子形成については、 $2x \times 2x$ で  
は成熟種子が7粒得られ、うち2粒が発芽し  
た。これに対し、 $4x \times 4x$ における種子形成は  
全区にわたってよく、着粒率が13.7% (ChO)に  
達するものもみられた。得られた種子の合計  
は77粒であった。これらの種子の発芽率は最  
高79%、平均46%であった。 $2x \times 4x$ の交配種  
子は1粒も得られず、 $4x \times 2x$ においては、2  
粒の良く発達した種子が得られたが、不発芽  
であった。種子形成に関しては、培地による

Table 44. Induction of callus and embryonic development of *Hydrocotyle* sp. on cultured ovaries

Cross	Medial	No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	Av. capsule length (mm)	Av. callus formation	No. of seeds obtained	Seed set (%)	Seed germination (%)
2x x 2x	ChO	8	7	21.7	±	2	1.4	0.0
	ChI	8	7	18.4	±	1	0.7	0.0
	ChK	8	7	20.7	+	0	0.0	-
	ChG	8	7	19.4	=	4	2.9	50.0
	ChT	8	7	16.7	++	0	0.0	-
Total		40	35	19.4		7	1.0	28.5
2x x 4x	ChO	9	8	22.8	± <sup>2)</sup>	0	0.0	-
	ChI	10	8	18.3	±	0	0.0	-
	ChK	9	8	21.8	±	0	0.0	-
	ChG	9	8	21.9	=	0	0.0	-
	ChT	8	7	17.7	+	0	0.0	-
Total		45	39	20.5		0	0.0	-
4x x 4x	ChO	8	7	36.9	+	23	13.7	56.5
	ChI	8	7	30.3	+	14	8.3	0.0
	ChK	8	7	37.9	+	12	7.1	66.7
	ChG	8	7	37.6	±	19	11.3	78.9
	ChT	8	7	30.7	+	9	5.4	0.0
Total		40	35	34.7		77	9.2	45.5
4x x 2x	ChO	9	8	34.5	+ <sup>2)</sup>	1	0.5	0.0
	ChI	8	7	29.6	+	0	0.0	-
	ChK	9	8	35.4	+ <sup>2)</sup>	1	0.5	0.0
	ChG	9	8	33.8	+	0	0.0	-
	ChT	9	8	30.5	++	0	0.0	-
Total		44	39	26.4		2	0.2	0.0

1): Refer to Table 52. 2): Roots were formed from the callus.

144

明瞭な差異は認められなかった。

ココナットミルクと生長調整物質を添加した培地について、その結果を表45に示す(表45)。葉の生育は2xを母親として用いたものが4xを母親としたものよりよい生育を示した。カルス形成については全般的に良い発達が見られ、 $2x \times 2x$ からの根の形成もよかつた。得られた種子数は、 $2x \times 2x$ で29粒、 $4x \times 4x$ で17粒、 $2x \times 4x$ で2粒であった。また、 $4x \times 2x$ には1粒の種子も得られなかった。 $2x \times 2x$ 、 $4x \times 4x$ の両交配ともかなりの種子数を得たが、 $2x \times 2x$ の方が $4x \times 4x$ よりもよかつた。ココナットミルクを含む培地で $2x \times 4x$ の交配種子が2粒得られた(CMO, CEG)。これらはいずれも発芽して3倍性の雑種植物として生育した。得られた種子の発芽率は $2x \times 2x$ で平均28%であったが、 $4x \times 4x$ では59%で、 $2x \times 2x$ よりも良い発芽率を示した。

ココナットミルクとカゼイン酸分解物を生長調整物質と組合せて添加した培地について

Cross	Medium <sup>1)</sup>	No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	Av. capsule length (mm)	Av. callus formation.	No. of seeds obtained	Seed set (%)	Seed Germination (%)
2x x 2x	CMO	8	7	24.6	+	7	5.0	85.7
	CM1	8	7	21.6	+ <sup>2)</sup>	7	5.0	0.0
	CMK	8	7	25.7	+	5	3.6	40.0
	CMG	8	7	23.6	+	5	3.6	40.0
	CMF	8	7	21.1	++	5	3.6	0.0
Total		40	35	22.5		29	4.1	27.6
2x x 4x	CMO	9	8	25.6	+	1	0.6	100
	CM1	8	6	24.8	++ <sup>2)</sup>	0	0.0	-
	CMK	9	8	25.5	++	0	0.0	-
	CMG	8	7	26.0	++	1	0.7	100
	CMF	9	7	27.4	++	0	0.0	-
Total		43	36	25.9		2	0.3	100
4x x 4x	CMO	8	7	34.7	++ <sup>2)</sup>	6	3.6	66.7
	CM1	8	7	30.7	++ <sup>2)</sup>	1	0.6	0.0
	CMK	8	7	35.1	+++	4	2.4	75.0
	CMG	8	7	33.6	++ <sup>2)</sup>	3	1.8	100
	CMF	8	7	29.7	++	3	1.8	0.0
Total		40	35	32.8		17	2.4	58.8
4x x 2x	CMO	9	8	31.8	++	0	0.0	-
	CM1	8	7	30.9	++	0	0.0	-
	CMK	9	8	35.4	++	0	0.0	-
	CMG	9	7	37.0	+	0	0.0	-
	CMF	9	8	31.8	++	0	0.0	-
Total		44	38	33.3		0	0.0	-

1): Refer to Table 32. 2): Roots were formed from the callus.

Table 16. Interactions of effects of growth substances, coconut milk and casein hydrolysate on cultured ovaries

Cross	Medi-um	No. of ovaries cul-tured	No. of ovaries exami-ned	AV. capsule length (mm)	AV. callus forma-tion	No. of seeds obtain-ed	Seed set (%)	Seed Germi-nation (%)
2x x 2x	CMChO	8	7	22.1	+	1	0.7	100
	CMChI	8	7	19.0	+ <sup>2)</sup>	0	0.0	-
	CMChK	8	7	22.6	++	2	1.4	50.0
	CMChG	8	7	20.9	++	2	1.4	50.0
	CMChT	8	7	18.9	+++	0	0.0	-
Total		40	35	20.7		5	0.7	60.0
2x x 4x	CMChO	11	10	30.5	+	0	0.0	-
	CMChI	9	8	28.4	+ <sup>2)</sup>	0	0.0	-
	CMChK	9	8	29.8	+ <sup>2)</sup>	0	0.0	-
	CMChG	8	6	30.0	+	0	0.0	-
	CMChT	9	8	30.0	++	0	0.0	-
Total		46	40	29.8		0	0.0	-
4x x 4x	CMChO	8	7	32.4	+	9	5.4	55.6
	CMChI	8	7	29.3	+	8	4.8	37.5
	CMChK	8	7	30.7	++	15	9.5	56.3
	CMChG	8	7	32.1	++	12	7.1	33.3
	CMChT	8	7	29.7	++	15	8.9	60.0
Total		40	35	30.9		60	7.1	50.0
4x x 2x	CMChO	9	8	36.4	++	0	0.0	-
	CMChI	9	8	31.9	++	0	0.0	-
	CMChK	9	8	37.6	+++	0	0.0	-
	CMChG	9	8	33.9	+++	1	0.5	100
	CMChT	9	8	29.6	++	0	0.0	-
Total		45	40	33.9		1	0.1	100

1): Refer to Table 52. 2): Roots were formed from the callus.



の結果と表46に示す(表46)。葉の長さは傾  
 向を示した。カルス形成はココナットミ  
 ルクと添加した培地と同等か、それ以上に良  
 好であった。種子形成については、 $2x \times 2x$ の  
 組合せで5粒であったのに対し、 $4x \times 4x$ では  
 60粒の種子が得られた。しかしながら発芽率  
 は $4x \times 4x$ の方が $2x \times 2x$ よりも低かった。交雑  
 種子の形成については、 $2x \times 4x$ では1粒の種  
 子も得られなかったが、 $4x \times 2x$ では1粒得ら  
 れ(CMChG)、発芽した3倍性の雑種植物として  
 生育した。

種子形成における生長調整物質と添加した培  
養物質の効果については： 今まで調査した種  
 子形成と生長調整物質と栄養物質の点から吟味  
 した。表47は生長調整物質についてはまとめ  
 もので、これ等の中にはいずれの区にもあ  
 る、トコトジユース、イースト抽出物、カゼ  
 イン分解物、ココナットミルクを含んで

Table 47. Interacting effects of growth substances on seed set and seed germination

Medium	Gross combination 2)						Total (%)
	2x x 2x	2x x 4x	4x x 4x	4x x 2x	4x x 4x	4x x 2x	
N	8/13	1/1	29/47	1/3			39/64 60.9
IAA	7/19	0/0	3/24	0/0			10/43 23.3
K	3/12	0/0	22/38	0/1			25/51 49.0
GA	7/19	1/1	24/38	1/2			33/60 55.0
T	2/16	0/0	9/33	0/0			11/49 22.4
Total	27/79	2/2	87/180	2/6			118/264
(%)	34.2	100	48.3	33.3			44.2

1): Refer to Table 32.

2): No. of seeds germinated/no. of seeds obtained.

Table 48. Interacting effects of different nutrients on seed set and seed germination

Medi <sup>th</sup>	Cross combination 2)					Total (%)
	2x x 2x	2x x 4x	4x x 4x	4x x 2x		
NO	1/3	0/0	8/15	0/0	9/19	47.4
TJ	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	-
YE	11/35	0/0	2/11	1/2	14/48	29.2
Ca	2/7	0/0	36/77	0/2	38/86	44.2
CM	10/29	2/2	10/17	0/0	22/48	45.8
CMCh	3/5	0/0	31/60	1/1	34/66	51.5
Total (%)	27/79 34.2	2/2 100	87/180 48.3	2/6 33.3	118/265 44.2	

1): Refer to Table 52.  
 2): No. of seeds germinated/no. of seeds obtained.

る(表47)。得られた種子とその発芽率を調査したが、 $4x \times 4x$ の得られた種子数は $2x \times 2x$ の2.3倍であり、その発芽率は48.3%と34.2%であった。生長調整物質による比較とみると $2x \times 2x$ ではIAAとジベレリン添加区において種子形成は良かったが、その発芽率は基本培地だけのものが61.5%と最も高かった。

$4x \times 4x$ においては生長調整物質を添加した11区以外の区にみられたものよりも、無添加の区において着粒率も発芽率も最も良好であった。

$2x \times 4x$ と $4x \times 2x$ においては雑穂個体が得られたのは無添加区とジベレリン添加区においてであった。基本培地には生長調整物質を添加したものにおける各交配組合せの全種子についてみるとジベレリン区が最も良く、これにカイネチン区と全部添加した区が続いているが、基本培地だけのものが得られた種子もその発芽率も最高であった。

表48は添加した栄養物質についてまとめたもので、11区以外の区においてもIAA、カイネ

4<sub>x</sub>、ジベシリンを含む(表48)。  
 得られた種子とその発芽率についてみると、  
 2<sub>x</sub> × 2<sub>x</sub> はイースト抽出物とココナットミルク  
 添加区において良好な種子形成がみられた。  
 4<sub>x</sub> × 4<sub>x</sub> は得られた種子数が多かったが、特  
 にカゼイン酸分解物とココナットミルクとカ  
 ゼイン酸分解物添加区において良好な種子形  
 成がみられた。2<sub>x</sub> × 4<sub>x</sub> はココナットミルク  
 添加区において、4<sub>x</sub> × 2<sub>x</sub> はイースト抽出物  
 とカゼイン酸分解物とココナットミルク添加  
 区において、それぞれ雑種個体を得ることに  
 成功した。培地に栄養物質を添加したものに  
 ける各組合せの種子形成をみると、まずト  
 トジユース添加区では全く種子形成がな  
 った。他の栄養物質添加区においては、無添加  
 の区に較べて種子形成は非常に良く存った。  
 カゼイン酸分解物においては約4.5倍で最  
 も高く、次にカゼイン酸分解物とココナ  
 ットミルク添加区、ココナットミルク添加区、  
 イースト抽出物添加区の順に存った。

以上のことから子房の人工培養においては生長調整物質の種類によるよりも、栄養物質の種類によつて、種子形成にはつまりとした相違がみられた。

子房の培養で得られた交雑種子とその植物個体：  
子房の培養で得られた発芽して生育した種子は  $2x \times 4x$  で2粒 (CMO, CMG) と  $4x \times 2x$  で2粒 (YEO, CMChG) があった (図12)。生育した個体

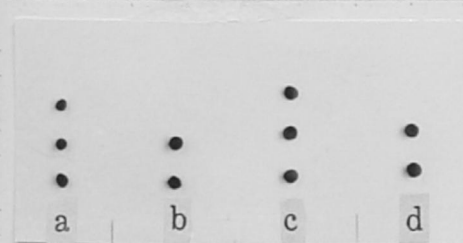


Fig. 12. Hybrid seeds produced by ovary culture. a:  $2x \times 2x$ , b:  $2x \times 4x$ , c:  $4x \times 4x$ , d:  $4x \times 2x$ .

の葉の形態と倍數性を表49に示す (表49)。

また、植物体全体を図13に示す (図13)。交配親に使用した体菜 ( $2x$ ) と白菜 ( $4x$ ) に較

べ、交雑種子から得た個体は両者の中間型を示した。 $2x \times 4x$  から得られた2個体は「す」れも同じような形態を示したが、 $4x \times 2x$  からの2個体は形態を少し異にし、YEO系から得ら

Table 49. Morphology of leaves of the hybrid plants obtained from ovary culture

Plant	Shape of leaf tip		Leaf thickness		Leaf surface		Floidy
	Notched	Round	Thick	Thin	Rough	Smooth	
2x x 2x		*		*		*	2x
4x x 4x	*		*		*		4x
2x x 4x (CHO)		*	*			*	3x
2x x 4x (CHG)		*	*			*	3x
4x x 2x (YEO)		*	*			*	3x
4x x 2x (CMChG)		*	*			*	3x

此葉もの(圖13e)は2x x 4xの個体と同じく葉全体の形は丸か>葉か, CMChGから得られたもの(圖13f)の葉は細長か>葉。これ等の個体の細胞学的な観察からいずれも3倍性雜種であることがわかった。

子房の人工培養においては、培養物質の種類の違いによつて種子形成の割合が異なることがわかった。基本培地に添加する培養物質のうち、イースト抽出物、カゼイン分解物、ココナットミルクの三者を組合せた培地を



Fig. 13. Hybrid plants obtained from ovary culture.  
 a: Diploid Brassica campestris ssp. chinensis (L.) Makino.  
 b: Autotetraploid B. campestris ssp. pekinensis (Lour.) Olsson.  
 c and d: Two  $F_1$  hybrids from the cross,  $2x \times 4x$ .





e and f: Two  $F_1$  hybrids from the cross,  $4x \times 2x$ .

くつて、種子形成等と調査した。その栄養物質の組合せを表33, 表34, 表35, と表36に示した。

イースト抽出物とカゼイン分解物の添加による相互作用: 表33に示す培地を用いてイースト抽出物とカゼイン分解物の相互作用を調査した。その結果を表50-1, -2, -3, と-4に示す。收穫時にはおける莖の長さは  $2x \times 2x$  と  $2x \times 4x$  においてはほぼ同じであったが,  $4x \times$

Table 50-1. Interacting effects of casein hydrolysate and yeast extract on cultured ovaries in 2x x 2x

Medium	No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	Av. capsule length (mm)	Av. callus formation	No. of seeds obtained	Seed set (%)	Seed germination (%)
YEC- 1	7	7	18.3	-	1	0.7	100
YEC- 2	7	7	16.7	+	0	0.0	-
YEC- 3	7	5	17.2	#	0	0.0	-
YEC- 4	7	7	17.9	-	0	0.0	-
YEC- 5	7	7	17.0	#	1	0.7	100
YEC- 6	8	8	18.3	#	1	0.7	100
YEC- 7	7	7	18.9	#	0	0.0	-
YEC- 8	7	7	17.7	-	0	0.0	-
YEC- 9	7	5	20.0	#	0	0.0	-
YEC-10	7	6	18.2	#	0	0.0	-
YEC-11	7	7	19.6	#	0	0.0	-
YEC-12	7	7	19.6	-	0	0.0	-
YEC-13	7	5	20.0	-	0	0.0	-
YEC-14	7	5	19.4	#	1	0.7	100
YEC-15	7	7	20.7	#	0	0.0	-
YEC-16	7	5	15.8	-	0	0.0	-
Total	113	102	18.4		4	0.2	100

1): Refer to Table 33.

Table 50-2. Interacting effects of casein hydrolysate and yeast extract on cultured ovaries in 2x x 4x

Medium <sup>1)</sup>	No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	Av. capsule length (mm)	Av. callus formation	No. of seeds obtained	Seed set (%)	Seed germination (%)
YEO-1	7	7	16.1	-	0	0.0	-
YEO-2	7	7	18.0	±	0	0.0	-
YEO-3	7	7	17.4	±	0	0.0	-
YEO-4	7	7	16.7	-	0	0.0	-
YEO-5	7	7	18.4	±	0	0.0	-
YEO-6	7	7	15.7	±	0	0.0	-
YEO-7	7	7	18.6	±	0	0.0	-
YEO-8	7	7	17.4	-	0	0.0	-
YEO-9	7	7	20.6	-	0	0.0	-
YEO-10	7	7	17.7	±	0	0.0	-
YEO-11	7	7	20.4	±	0	0.0	-
YEO-12	7	7	20.9	±	0	0.0	-
YEO-13	7	7	20.7	-	0	0.0	-
YEO-14	7	7	18.6	±	0	0.0	-
YEO-15	7	7	18.4	±	0	0.0	-
YEO-16	7	6	19.0	-	0	0.0	-
Total	112	111	18.2		0	0.0	-

1): Refer to Table 55.

Table 50-3. Interacting effects of casein hydrolysate and yeast extract on cultured ovaries in 4x x 4x

Medium	No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	Av. capsule length (mm)	Av. callus formation	No. of seeds obtained	Seed set (%)	Seed germination (%)
YEC-1	7	7	18.9	-	0	0.0	-
YEC-2	7	7	19.9	±	1	0.6	0.0
YEC-3	7	7	20.4	±	0	0.0	-
YEC-4	7	7	19.9	-	0	0.0	-
YEC-5	7	7	22.0	±	2	1.2	100
YEC-6	7	7	19.4	±	0	0.0	-
YEC-7	7	7	20.5	-	0	0.0	-
YEC-8	7	7	20.4	-	0	0.0	-
YEC-9	7	7	20.3	±	0	0.0	-
YEC-10	7	7	21.3	±	0	0.0	-
YEC-11	7	7	19.8	±	0	0.0	-
YEC-12	7	6	22.3	-	0	0.0	-
YEC-13	7	7	22.6	±	2	1.2	0.0
YEC-14	7	6	19.8	±	0	0.0	-
YEC-15	7	7	20.3	±	0	0.0	-
YEC-16	7	7	20.7	-	0	0.0	-
Total	112	110	20.2		5	0.2	40.0

1): Refer to Table 33.

Table 50-4. Interacting effects of casein hydrolysate and yeast extract on cultured ovaries in 4x x 2x

Medium	No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	Av. capsule length (mm)	Av. callus formation	No. of seeds obtained	Seed set (%)	Seed germination (%)
YEC-1	7	7	26.7	+	0	0.0	-
YEC-2	7	7	26.3	+	0	0.0	-
YEC-3	7	7	28.6	±	0	0.0	-
YEC-4	7	7	25.0	-	0	0.0	-
YEC-5	7	7	29.0	+	0	0.0	-
YEC-6	7	7	27.9	±	0	0.0	-
YEC-7	7	7	27.6	-	0	0.0	-
YEC-8	7	7	24.9	+	0	0.0	-
YEC-9	7	7	31.3	+	1	0.6	0.0
YEC-10	7	7	24.7	±	0	0.0	-
YEC-11	7	7	24.7	±	0	0.0	-
YEC-12	7	7	28.4	-	0	0.0	-
YEC-13	7	7	29.4	±	0	0.0	-
YEC-14	7	7	27.0	-	0	0.0	-
YEC-15	7	7	28.7	±	0	0.0	-
YEC-16	7	7	27.4	±	0	0.0	-
Total	112	112	27.3		1	0.04	0.0

1): Refer to Table 35.

$4x$  と  $4x \times 2x$  には、後者の方が良かった。  
 カルスの形成は僅かにみられたが、イースト  
 抽出物とカゼイン酸分解物の添加量を増加し  
 ても、それほどの変化はみられなかった。

$2x \times 2x$  と  $4x \times 4x$  の種子形成については、 $2x \times 2x$   
 が4粒、 $4x \times 4x$  が5粒しか得られなかった。

その傾向をみると、いずれもイースト抽出物  
 の添加量の少ない培養基には、 $2x$  の種子形成  
 がみられ、 $5g/l$  や  $10g/l$  のイースト抽出物を  
 添加したものはカゼイン酸分解物の添加量  
 に関係なく種子は得られなかった。得られた  
 種子の発芽率は  $2x \times 2x$  が  $100\%$  であつたが、  
 $4x \times 4x$  が  $40\%$  であつた。 $2x \times 4x$  にはいずれ  
 の区にも種子形成はなかった。 $4x \times 2x$   
 には、カゼイン酸分解物  $1000 mg/l$  を之  
 んかした区 (YEC-9) には、 $2$  粒の種子が得ら  
 れたが、不発芽であつた。

ココナットミルクとイースト抽出物の添加に  
 よる相互作用：表34に示した培地を用いて

Table 51-1. Interacting effects of coconut milk and yeast extract on cultured ovaries in 2x x 2x

Medium	No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	av. capsule length (mm)	av. callus formation	No. of seeds obtained	Seed set (%)	Seed Germination (%)
CMYE-1	7	7	20.0	-	0	0.0	-
CMYE-2	7	7	21.0	-	0	0.0	-
CMYE-3	7	7	21.0	-	0	0.0	-
CMYE-4	7	7	20.9	±	0	0.0	-
CMYE-5	7	7	19.9	-	0	0.0	-
CMYE-6	7	6	19.2	#	0	0.0	-
CMYE-7	7	7	21.0	-	0	0.0	-
CMYE-8	7	7	21.4	-	0	0.0	-
CMYE-9	7	7	20.9	-	1	0.7	0.0
CMYE-10	7	7	21.7	-	0	0.0	-
CMYE-11	7	7	21.6	#	0	0.0	-
CMYE-12	7	7	21.4	-	0	0.0	-
CMYE-13	7	7	19.7	-	0	0.0	-
CMYE-14	7	7	21.9	-	0	0.0	-
CMYE-15	7	7	21.6	-	0	0.0	-
CMYE-16	7	7	21.6	-	0	0.0	-
Total	112	111	20.9	-	1	0.05	0.0

1): Refer to Table 54.

Table 51-2. Interacting effects of coconut milk and yeast extract on cultured ovaries in 2x x 4x

Medium	No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	Av. capsule length (mm)	Av. callus formation	No. of seeds obtained	Seed set (%)	Seed germination (%)
CMYE- 1	7	7	20.0	-	0	0.0	-
CMYE- 2	7	7	22.3	-	0	0.0	-
CMYE- 3	7	7	20.6	±	0	0.0	-
CMYE- 4	7	7	24.3	±	0	0.0	-
CMYE- 5	7	7	21.3	-	0	0.0	-
CMYE- 6	7	6	22.7	-	0	0.0	-
CMYE- 7	7	7	22.4	-	0	0.0	-
CMYE- 8	7	7	21.1	±	0	0.0	-
CMYE- 9	7	7	20.6	-	0	0.0	-
CMYE-10	7	7	21.7	-	0	0.0	-
CMYE-11	7	7	21.9	±	0	0.0	-
CMYE-12	7	7	22.0	-	0	0.0	-
CMYE-13	7	7	19.7	-	0	0.0	-
CMYE-14	7	7	21.3	-	0	0.0	-
CMYE-15	7	7	22.4	-	0	0.0	-
CMYE-16	7	7	21.4	-	0	0.0	-
Total	112	111	21.8		0	0.0	-

1): Refer to Table 74.



Table 51-3. Interacting effects of coconut milk and yeast extract on cultured ovaries in 4x x 4x

Medium	No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	Av. capsule length (mm)	Av. callus formation	No. of seeds obtained	Seed set (%)	Seed germination (%)
OMYE-1	7	7	19.3	-	0	0.0	-
OMYE-2	7	7	21.9	#	0	0.0	-
OMYE-3	7	7	20.6	±	0	0.0	-
OMYE-4	7	7	23.7	+	0	0.0	-
OMYE-5	7	6	20.5	-	0	0.0	-
OMYE-6	7	7	19.3	-	0	0.0	-
OMYE-7	7	7	20.1	-	0	0.0	-
OMYE-8	7	7	22.3	±	0	0.0	-
OMYE-9	7	7	21.1	-	0	0.0	-
OMYE-10	7	6	20.2	-	0	0.0	-
OMYE-11	7	7	23.3	-	0	0.0	-
OMYE-12	7	7	20.9	#	0	0.0	-
OMYE-13	7	7	20.7	-	0	0.0	-
OMYE-14	7	7	20.9	#	0	0.0	-
OMYE-15	7	6	22.2	-	0	0.0	-
OMYE-16	7	7	22.0	±	0	0.0	-
Total	112	109	21.2		0	0.0	-

1): Refer to Table 34.

Table 51-4. Interacting effects of coconut milk and yeast extract on cultured ovaries in 4x x 2x

Medium	No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	Av. capsule length (mm)	Av. callus formation	No. of seeds obtained	Seed set (%)	Seed germination (%)
CMYE-1	7	7	27.4	-	0	0.0	-
CMYE-2	7	7	25.6	+	0	0.0	-
CMYE-3	7	7	28.3	+	0	0.0	-
CMYE-4	7	7	28.6	+	0	0.0	-
CMYE-5	7	7	27.4	±	0	0.0	-
CMYE-6	7	7	26.9	±	0	0.0	-
CMYE-7	7	6	25.7	±	0	0.0	-
CMYE-8	7	7	26.0	±	0	0.0	-
CMYE-9	7	6	29.2	±	0	0.0	-
CMYE-10	7	7	27.1	-	0	0.0	-
CMYE-11	7	7	25.9	±	0	0.0	-
CMYE-12	7	7	25.9	±	0	0.0	-
CMYE-13	7	7	26.3	±	0	0.0	-
CMYE-14	7	7	26.7	±	0	0.0	-
CMYE-15	7	7	23.9	±	0	0.0	-
CMYE-16	7	7	25.4	-	0	0.0	-
Total	112	110	26.6		0	0.0	-

1): Refer to Table 34.

ココナットミルクとイースト抽出物の相互作用と調査した。その結果を表51-1, -2, -3と-4に示す。莖の長さは  $2x \times 4x$  と  $4x \times 4x$  にはおいてそれぞれ  $21.8\text{mm}$  と  $21.2\text{mm}$  であり、  $2x \times 2x$  では  $20.9\text{mm}$  と短かく、  $4x \times 2x$  では最も長く  $26.6\text{mm}$  であった。切り口におけるカルス形成は僅かにみられたが、ココナットミルクとイースト抽出物の添加量の差によるカルス形成の違いはみられなかった。種子形成については  $2x \times 2x$  の | 区 (CMYE-9) で | 粒得られただけで、他のすべての培地・交雑組合せからは全く種子が得られなかった。

ココナットミルクとカゼイン酸分解物の添加による相互作用： 表35に示した培地を用いてココナットミルクとカゼイン酸分解物の相互作用を調査した。その結果を表52-1, -2, -3と-4に示す。莖の長さは、  $2x \times 2x$  と  $2x \times 4x$  では  $20.5\text{mm}$  と  $20.7\text{mm}$  でありほぼ同じであり、  $4x \times 4x$  では  $23.7\text{mm}$  であり  $4x \times 2x$  が一番長く  $26.5\text{mm}$  であった。

Table 52-1. Interacting effects of coconut milk and casein hydrolysate on cultured ovaries in 2x x 2x

Medium	No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	AV. capsule length (mm)	AV. callus formation	No. of seeds obtained	Seed set (%)	Seed germination (%)
CMC-1	7	7	19.1	-	1	0.7	100
CMC-2	7	7	20.1	±	0	0.0	-
CMC-3	7	7	20.6	+	3	2.1	100
CMC-4	7	7	21.6	+	0	0.0	-
CMC-5	7	7	18.3	±	2	1.4	50.0
CMC-6	7	7	19.4	+	2	1.4	50.0
CMC-7	7	7	19.6	±	1	0.7	100
CMC-8	7	7	22.0	+	2	1.4	50.0
CMC-9	8	8	22.3	-	1	0.7	100
CMC-10	7	7	20.1	±	0	0.0	-
CMC-11	7	7	20.0	+	1	0.7	100
CMC-12	7	6	19.8	+	1	0.7	100
CMC-13	7	7	21.7	-	1	0.7	100
CMC-14	7	7	21.9	+	2	1.4	100
CMC-15	8	8	21.4	++	6	4.2	100
CMC-16	7	6	20.2	-	2	1.4	100
Total	114	112	20.5		25	1.1	88.0

1): Refer to Table 35.

Table 52-2. Interacting effects of coconut milk and casein hydrolysate on cultured ovaries in 2x x 4x

Medium	no. of ovaries cultured	no. of ovaries examined	av. capsule length (mm)	av. callus formation	no. of seeds obtained	Seed set (%)	Seed Germination (%)
CMC-1	7	7	19.7	-	0	0.0	-
CMC-2	8	8	19.8	±	0	0.0	-
CMC-3	7	7	20.6	±	1	0.7	100
CMC-4	7	7	21.6	+	0	0.0	-
CMC-5	7	7	19.3	-	0	0.0	-
CMC-6	7	7	21.0	±	0	0.0	-
CMC-7	7	7	19.1	±	0	0.0	-
CMC-8	7	7	21.0	+	0	0.0	-
CMC-9	7	7	20.7	-	0	0.0	-
CMC-10	7	7	21.6	±	0	0.0	-
CMC-11	7	7	21.7	±	0	0.0	-
CMC-12	7	7	20.9	±	0	0.0	-
CMC-15	7	7	21.9	-	0	0.0	-
CMC-14	7	7	21.9	+	0	0.0	-
CMC-15	7	7	20.6	+	0	0.0	-
CMC-16	7	6	20.3	±	0	0.0	-
Total	115	112	20.7		1	0.04	100

1): Refer to Table 35.

821

Table 52-3. Interacting effects of coconut milk and casein hydrolysate on cultured ovaries in 4x x 4x

Medium	No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	Av. capsule length (mm)	Av. callus formation	No. of seeds obtained	Seed set (%)	Seed germination (%)
CMC-1	7	7	24.6	±	0	0.0	-
CMC-2	7	7	24.9	+	1	0.6	100
CMC-3	7	7	23.7	++	0	0.0	-
CMC-4	7	7	23.0	+	0	0.0	-
CMC-5	7	7	22.7	+	1	0.6	100
CMC-6	7	7	24.0	+	1	0.6	100
CMC-7	7	7	23.9	++	0	0.0	-
CMC-8	7	7	23.0	+	0	0.0	-
CMC-9	7	7	23.0	+	2	1.2	100
CMC-10	7	7	25.4	+	0	0.0	-
CMC-11	7	7	24.1	++	0	0.0	-
CMC-12	7	7	21.9	±	0	0.0	-
CMC-13	7	6	23.3	±	0	0.0	-
CMC-14	7	7	23.7	+	0	0.0	-
CMC-15	7	7	24.7	++	0	0.0	-
CMC-16	7	7	23.7	++	0	0.0	-
Total	112	111	23.7		5	0.2	100

1): Refer to Table 35.

Table 52-4. Interacting effects of coconut milk and casein hydrolysate on cultured ovaries in 4x x 2x

Medium	No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	AV. capsule length (mm)	AV. follicle formation	No. of seeds obtained	Seed set (%)	Seed germination (%)
CMC-1	7	6	26.0	±	1	0.6	0.0
CMC-2	7	6	26.7	++	0	0.0	-
CMC-3	7	7	26.1	++	3	1.8	33.0
CMC-4	8	8	27.0	+++	0	0.0	-
CMC-5	7	7	25.1	+	0	0.0	-
CMC-6	7	7	27.3	+	2	1.2	100
CMC-7	7	7	27.6	++	0	0.0	-
CMC-8	7	7	25.1	++	0	0.0	-
CMC-9	7	7	28.0	+	1	0.6	100
CMC-10	7	7	24.6	+	0	0.0	-
CMC-11	7	7	25.9	++	0	0.0	-
CMC-12	7	7	26.4	+++	0	0.0	-
CMC-13	7	7	27.6	+	0	0.0	-
CMC-14	7	7	31.6	+	2	1.2	50.0
CMC-15	7	7	24.7	+++	0	0.0	-
CMC-16	7	7	24.9	++	0	0.0	-
Total	113	111	26.5		9	0.3	55.6

1): Refer to Table 35.

切11口からのカルス形成はココナットミルク  
 の添加量が增大すると(20%と30%)  
 11ちぢるしく良くなる。2x x 2x と 4x x 4x に  
 おける種子形成はよく、2x x 2x では計25粒、  
 4x x 4x では5粒の種子が得られた。ココナッ  
 トミルクを30%添加した培地でも、2x x 2x では  
 種子形成がみられ、またカゼイニ酸分解物  
 2000 mg/l においても種子形成がみられた。  
 2x x 2x にはあつては、ココナットミルクを20%  
 とんかした培地で最も良い種子形成がみられ、  
 4x x 4x ではカゼイニ酸分解物だけが、ココナ  
 ットミルク10%添加が種子形成に好ましいと思  
 われた。ココナットミルクとカゼイニ酸分  
 解物を添加した16区の実験区のうち、2x x 2x  
 区には4x x 4x 区特に良い種子形成がみられた  
 という区はなかった。得られた種子の発芽率  
 は良く、2x x 2x 区はほとんど100%を示し、  
 4x x 4x 区はすべて100%であった。2x x 4x 区  
 はココナットミルクを20%添加した区におい  
 て1粒、4x x 2x 区も同じ区で9粒得られた。し



かしココナツトミルク30%の添加量において  
 は種子は全く得られなかった。カゼインと酸分  
 解物の添加については、1000mg/lや2000mg/l  
 においても交雑種子は得られたが、1000mg/l  
 以下の方が好ましいように思われた。また  
 $4x \times 2x$ の交配にあつては、その収穫時に種皮  
 の発達は全くなく、胎座に付着した胚のみが  
 大きく成長して"torpedo"型になつてくるもの  
 が存在した。得られた種子の発芽率は $2x \times$   
 $4x$ で1個体、 $4x \times 2x$ で5個体の植物体を得た。  
 得られた雑種植物は平紙をしい下ニヤール  
 で発芽させ、その根端を調べて雑種かどうか  
 の検討を行ない、雑種植物であることを確認  
 した。

ココナツトミルクとカゼインと酸分解物の改良  
 添加による相互作用：表36に示したココナ  
 ツトミルクとカゼインと酸分解物の添加を修正  
 した培地を用いて、相互作用を調査した。そ  
 の結果は表53-1, -2, -3と-4に示す。各日平

Table 53-1. Interacting effects of coconut milk and casein hydrolysate on cultured ovaries in 2x x 2x

Medium	No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	Av. capsule length (mm)	Av. callus formation	No. of seeds obtained	No. of immature seeds	Seed set (%)	Seed germination (%)
CMC-1	8	8	41.6	-	28	3	17.5	89.3
CMC-2	8	8	40.0	-	26	3	16.3	19.2
CMC-3	8	8	42.0	-	35	4	21.9	51.4
CMC-4	8	8	41.5	-	5	9	3.1	80.0
CMC-5	8	8	39.9	-	13	3	3.1	92.3
CMC-6	8	8	38.5	-	9	1	5.6	66.7
CMC-7	8	8	41.3	-	37	6	23.1	67.6
CMC-8	8	8	42.8	+	33	3	20.6	51.5
CMC-9	8	8	37.8	-	20	2	12.5	95.0
CMC-10	8	8	38.8	+	30	1	18.8	60.0
CMC-11	8	7	39.0	+	29	0	18.1	44.8
CMC-12	8	8	38.1	+ <sup>2)</sup>	36	0	22.5	85.3
CMC-13	8	8	34.9	-	7	1	4.4	71.4
CMC-14	8	8	38.8	++	30	1	18.8	70.0
CMC-15	8	8	38.0	++	32	1	20.0	68.8
CMC-16	8	8	39.5	+ <sup>2)</sup>	49	0	30.6	79.6
Total	128	127	39.5		419	38	16.5	66.3

1): Refer to Table 56.

2): Roots were formed from the callus.

Table 55-2. Interacting effects of coconut milk and casein hydrolysate on cultured ovaries in 2x x 4x

Medium <sup>1)</sup>	No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	av. capsule length (mm)	av. callus formation	No. of seeds obtained	No. of immature seeds	Seed set (%)	Seed Germination (%)
CMC-1	8	8	36.4	-	0	15	0.0	-
CMC-2	8	8	34.1	-	0	12	0.0	-
CMC-3	8	8	36.0	-	0	4	0.0	-
CMC-4	9	9	37.3	-	0	18	0.0	-
CMC-5	8	8	32.4	-	0	6	0.0	-
CMC-6	8	8	35.0	-	0	9	0.0	-
CMC-7	8	8	36.9	+	1	32	0.6	0.0
CMC-8	8	8	36.8	+	0	17	0.0	-
CMC-9	8	8	37.6	-	2	33	1.2	50.0
CMC-10	8	8	40.5	-	0	31	0.0	-
CMC-11	8	8	38.9	+	0	36	0.0	-
CMC-12	8	8	39.8	+	1	34	0.6	100
CMC-13	8	8	36.9	-	0	35	0.0	-
CMC-14	8	8	38.4	+	0	28	0.0	-
CMC-15	8	8	37.5	-	3	38	1.9	0.0
CMC-16	8	7	37.0	+	0	4	0.0	-
Total	128	127	37.3		7	325	0.3	28.6

1): Refer to Table 36.

174

Table 53-3. Interacting effects of coconut milk and casein hydrolysate on cultured ovaries in 4x x 4x

Medium	No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	Av. capsule length (mm)	Av. callus formation	No. of seeds obtained	No. of immature seeds	Seed set (%)	Seed Germination (%)
CMC-1	8	7	30.6	-	15	15	8.9	66.7
CMC-2	8	8	32.0	±	5	17	2.6	20.0
CMC-3	8	8	31.8	± <sup>2)</sup>	7	33	3.6	57.1
CMC-4	8	7	29.3	++	1	18	0.6	100
CMC-5	8	8	31.4	-	18	14	9.4	50.0
CMC-6	8	8	32.1	-	7	34	3.6	57.1
CMC-7	8	8	30.1	±	6	27	3.1	33.3
CMC-8	8	7	31.6	± <sup>2)</sup>	3	29	1.7	100
CMC-9	8	8	32.6	±	4	9	2.1	0.0
CMC-10	8	7	36.0	+++	7	27	4.2	14.3
CMC-11	8	7	31.6	+	2	8	1.2	50.0
CMC-12	8	7	33.0	+	2	18	1.2	100
CMC-13	8	8	33.5	-	1	6	0.5	0.0
CMC-14	8	8	38.4	++	3	10	1.6	0.0
CMC-15	8	7	33.9	++	5	13	3.0	60.0
CMC-16	8	8	35.1	++	3	23	1.0	33.3
Total	128	121	32.7		89	301	3.1	47.2

1): Refer to Table 56.

2): Roots were formed from the callus.

Table 53-4. Interacting effects of coconut milk and casein hydrolysate on cultured ovaries in 4x x 2x

Medium <sup>1)</sup>	No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	AV. capsule length (mm)	AV. callus formation	No. of seeds obtained	No. of immature seeds	Seed set (%)	Seed germination (%)
CMC-1	8	8	35.0	-	0	4	0.0	-
CMC-2	8	7	30.3	-	0	0	0.0	-
CMC-3	8	7	33.3	±	0	2	0.0	-
CMC-4	8	8	34.5	+	0	1	0.0	-
CMC-5	8	8	33.9	±	1	3	0.5	0.0
CMC-6	8	8	31.4	±	0	3	0.0	-
CMC-7	8	8	31.5	±	0	1	0.0	-
CMC-8	8	7	33.9	-	0	0	0.0	-
CMC-9	8	8	32.1	±	0	3	0.0	-
CMC-10	8	8	33.9	++	3	3	1.6	66.7
CMC-11	8	8	33.8	++	0	4	0.0	-
CMC-12	8	7	33.6	+++	0	4	0.0	-
CMC-13	8	7	31.3	-	0	2	0.0	-
CMC-14	8	7	33.1	++	1	3	0.6	0.0
CMC-15	8	8	33.3	++	0	3	0.0	-
CMC-16	8	8	32.3	+++	0	3	0.0	-
Total	128	122	33.8		5	39	0.3	60.0

1): Refer to Table 56.

の8個の子房を植之込んだ。莢の長さ、

$2x \times 2x$  2" 39.5 mm,  $2x \times 4x$  2" 37.3 mm,  $4x \times 4x$  2" 32.7 mm,  $4x \times 2x$  2" 33.8 mm 2" あり,  $2x \times 2x$  が

最も長く, 次" 2"  $2x \times 4x$  2",  $4x \times 4x$  が最も短

かかった。切り口からのカルス形成はココナ

ットミルクとカゼイン酸分解物の添加量が増

すにこれと良く存ったが, 其の傾向は

$4x \times 4x$  と  $4x \times 2x$  の組合せにありてはマリシ

2" した。種子形成は, 十分に発達したと思わ

れる種子と, 受精後或る程度発達したはしたが,

発育の途中で止んでしまつた未熟種子とに分け

て調査した。 $2x \times 2x$  には最も良い種子形

成がみられた。基本培地だけの実験区には

2も28粒得られ, 17.5%の着粒率のみみられた。

しかし此の実験区にはあつても十分に発達した種

子が得られた。20%以上の着粒率をみた実験

区は CMC-3, -7, -8, -12, -15 と -16 の6区であつた。

特に CMC-16 では1莢6粒以上の種子が形成さ

れた。全体で得られた種子は419粒であつた。

$4x \times 4x$  では基本培地の CMC-1 2" 15粒, 8.9% の

着粒率であつた。着粒率が3%以上の実験区は、CNC-1, -3, -5, -6, -7, -10と-15と7区であつた。成熟種子は全体で89粒で、未熟種子は301粒であつた。2x x 4xで得られた種子は7粒(CNC 7, -9, -12, -15)で、このうち発芽して3倍量の雑種性を示したものが2粒であつた。未熟種子については、各実験区においゝ多量みられ、合計352粒であつた。これに対し4x x 2xでは成熟種子を5粒(CNC-5, -10, -14)得た。未熟種子は39粒と僅かであつた。得た5粒の種子のうち2個体が発芽して生育した。

得られた交雑種子(図14)とそれから発芽した植物体を鉢植之にして育てた(図15)。雑種の検定は各個体の形態と花粉の細胞とでしかめた。形態的にみると、葉の先端は丸味を帯び、表面に僅かに毛があり、厚味があつた。概略的に示すと表54のようであつた(表54)。

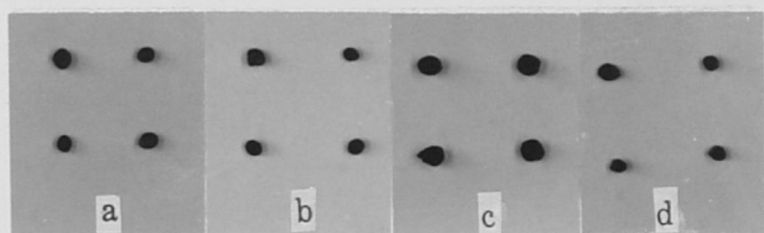


Fig. 14. Hybrid seeds produced by ovary culture. a:  $2x \times 2x$ , b:  $2x \times 4x$ , c:  $4x \times 4x$ , d:  $4x \times 2x$ .

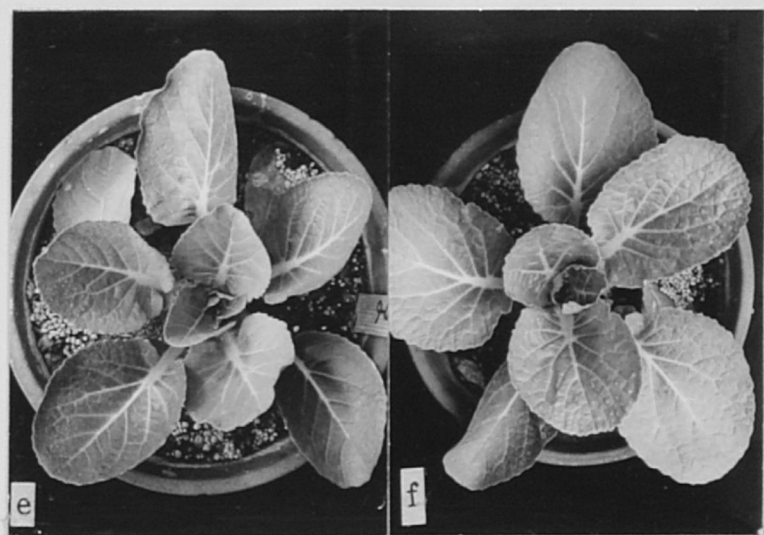
Table 54. Morphology of leaves of the hybrid plants obtained from ovary culture

Plant	Shape of leaf tip		Leaf thickness		Leaf surface		Ploidy
	Notched	Round	Thick	Thin	Rough	Smooth	
$2x \times 2x$		*		*		*	$2x$
$4x \times 4x$	*		*		*		$4x$
$2x \times 4x$		*	*			*	$3x$
$2x \times 4x$		*	*			*	$3x$
$4x \times 2x$		*	*			*	$3x$
$4x \times 2x$		*	*			*	$3x$





Fig. 15. Hybrid plants obtained from ovary culture. a: Diploid B. campestris ssp. chinensis (L.) Makino. b: Autotetraploid B. campestris ssp. pekinensis (Lour.) Olsson. c and d: Two  $F_1$  hybrid from the cross,  $2x \times 4x$ .



e and f: Two  $F_1$  hybrids from the cross,  
 $4x \times 2x$ .

(V) 子房の人工培養による新型ナ  
 プスの育成

冒頭 = 述べたように B. oleracea 群と B.  
campestris 群には多くの亜種が存在し、形態的  
 に多様性に富んでいる。そして B. napus は表え  
 のように B. oleracea と B. campestris の異質倍數体  
 であるので、B. oleracea と B. campestris の交雑に

よる人為合成が試みられてきた。B. napus の人為合成は初めは U (1935) によつて行われ、ついで Mizushima (1950), Rudolf (1950), Koch and Peters (1953), Hoffmann and Peters (1958), Hosoda (1961), Nishi et al. (1962), Sarashima (1964) 等はまづてなされた。しかし人為的にナガス型を造り出すための B. oleracea 群と B. campestris 群の交雑成功率は極めて低く、そのためおがくし「救」の花を交配しなければならぬ。

Håkansson (1956) は B. oleracea と B. campestris の間の不稔現象を組織学的な観察によつて追求している。これによると、B. campestris x B. oleracea におけるとは、胚の発達は "pre-heart" 型まで生長して止つてしまふ、逆交配の B. oleracea x B. campestris におけるとは、胚の発達は "heart" 型まで発達して止つてしまふ、種子の崩壊が起る。これは先述した2倍体 B. campestris と同質4倍体の間の正逆交雑におけるとみられる種子崩壊の現象と類似している。B. campestris の2倍体と同質4倍体との間の正逆交雑では、

が此の場合においても大抵の胚は球型まじりか発達しなかつた。このように受精後の胚発生が発達初期で止まってしまう場合には、これらの胚・胚珠または子房を交配後短時間のうちに切り取って人工培養し、雑種植物を得る方法を研究し、或る程度の成功を得ることを果たした (Inomata 1968, III-A-(2)-(iv) 参考)。

本実験では前章の実験に基づいて種々の B. oleracea 群および B. campestris 群の植物を用いて、ふつうの方法では困難な交雑を成功させ、種々の異質倍数体 B. napus を人為的に育成するための基礎的データを得ることを試みた。よつてその結果を述べる。

## 方 法

B. oleracea 群と B. campestris 群の栽培品種を用いて交雑を行なった。それらを表すに示す。これらの品種の人為的自家授粉と B. oleracea 群品種と B. campestris 群品種との間の正逆交雑を行

なつた。用いた交配方法はすでに方法の項で述べたとおりである。これ等の実験は1969年と1970年の両年度にわたって行なつた。

子房の人工培養に用いた基本培地は、1969年度の実験では Nitsch (1951) のものがあり、1970年度の実験では White (1963) のものがある(表55)。これらの基本培地にはあたりグリニニ 15mg, ナイアミン 2.5mg, サイアミン 0.5mg, ピリドキミン 0.5mg, 蔗糖 50g, 魯天末 9g を添加した。pH は N-HCl と N-KOH を用いて高圧接種前には 5.8 ~ 6.0 に調整した。その他の点は III-A-(2)-(iv) に述べたと同じである。

Table 55. Composition of the White's mineral solution used for the culture

Inorganic salts	Milligrams per 1000 ml	Inorganic salts	Milligrams per 1000 ml
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	720.0	$Fe_2(SO_4)_3$	2.5
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	300.0	$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	7.0
$Na_2SO_4$	200.0	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	3.0
$KNO_3$	80.0	$H_3BO_3$	1.5
KCl	65.0	KI	0.75
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	16.5		

子房の人工培養に当つては上記の培地に種々の栄養物を添加した。前二節で述べた研究結果から、プラス型の雑種育成に用いた培地のうち、1969年度のものゝ表56に、1970年度に行なつたものを表57と表58にそれぞれ示した(表56, 57, 58)。

Table 56. Composition of media supplemented with coconut milk and casein hydrolysate and used for ovary culture

Casein hydrolysate (mg/l)	Coconut milk (%)		
	0	10	20
0	1	2	3
300	4	5	6

Table 57. Composition of media supplemented with casein hydrolysate and yeast extract and used for ovary culture

Casein hydrolysate (mg/l)	Yeast extract (g/l)		
	0	2	5
0	1	2	3
300	4	5	6
500	7	8	9
1000	10	11	12

Table 58. Composition of media supplemented with coconut milk and casein hydrolysate and used for ovary culture

Casein hydrolysate (mg/l)	Coconut milk (%)		
	0	10	20
0	1	2	3
500	4	5	6

Table 59. Cross combinations used in ovary culture for producing interspecific hybrids

Year	<u>B. campestris</u> cultivar	<u>B. oleracea</u> cultivar	Reference
1969	Hatana	Succession	Figs. 56, 60-1, 61
	Nozaki-hakusai	Nakano-wase	Figs. 56, 60-1, 62
	Kanamachi-kokabu	Nakano-wase	Figs. 56, 60-2, 63
1970	Nozaki-hakusai	Nozaki-wase	Figs. 57, 60-2, 64
	Kyoto-hakusai	Nakano-wase	Figs. 58, 60-3, 65
	Wase-komatsuna	Nozaki-chusei	Figs. 58, 60-3, 66
	Nikanme-taina	Succession	Figs. 58, 60-4, 67

表56, 57, 58の培養に用いた交配組4合せの栽培品種名を表59に示す(表59)。

交配後4日目の子房を9%サラシ物水で消毒後、蔗糖50g/lと含有殺菌水で5回洗浄し、試験管に植之込んだ。培養条件および培養子房についての種々の調査の方法は前述のものと同じである。

本実験のうち表62, 64, 65, および67に示したもののから、収穫時の莢の中には交配種子の代りに直接珠柄に附着した発芽状態の成熟胚が多数得られた。これらの胚を無菌的にWhite (1963)の培地に移し、1000ルクスの光の下で生育させ、本葉の展開と発根を待つ2鉢に移し、生育した際の形態を観察するとともに、根端細胞または、PMCを用いて染色体数を決定した。

## 結 果

培養当初における子房の長さ



Table 60-1. Average length of cultured ovaries

Cross	No. of ovaries examined	Av. capsule length (mm)
No. 1. Hatana and Succession		
Hatana x Hatana	10	24.9
Hatana x Succession	10	39.0
Succession x Succession	10	28.3
Succession x Hatana	10	29.3
No. 2. Nozaki-hakusai and Nakano-wase		
Nozaki x Nozaki	10	18.6
Nozaki x Nakano	10	17.9
Nakano x Nakano	10	27.1
Nakano x Nozaki	10	27.9

子房の人工培養

に於ける結果の

うち、植えこみ時

の子房の長さをき

とめて表60に示す

(表60)。表60の

NO.1からNO.3まで

は1969年度の果験

であり、NO.4から

NO.7までは1970

年度における果験

である。NO.1にお

いては畑菜の自殖

が最も短かく、畑

菜にサクセツシヨ

とを交配したもの

が最も長かつた。

その差は約15mm

あつた。サクセツシヨとを母系に用いた場合は

は、いずれも同じ長さを示した。NO.2にお

Table 60-2. Average length of cultured ovaries

Cross	No. of ovaries examined	Av. capsule length (mm)
No. 3. Kanamachi-kokabu and Nakano-wase		
Kokabu x Kokabu	10	36.4
Kokabu x Nakano	10	21.6
Nakano x Nakano	10	26.1
Nakano x Kokabu	10	25.1
No. 4. Nozaki-hakusai and Nozaki-wase		
Hakusai x Hakusai	20	15.1
Hakusai x Wase	20	17.3
Wase x Wase	20	16.4
Wase x Hakusai	20	15.5

いとは、白菜を♀オにした場合にはキャベツを♀オにした場合よりも短かく、約10mmの差異がみられた。

NO.3の場合には、金町小燕を♀オにしたときとは、NO.1の場合の逆で、

金町小燕を自殖し

た場合のオがキャ

ベツを父オに用い

たものよりも15mm

長かった。しかし

キャベツを♀オに

したものでほぼ

同じ長さを示した。

NO.4においては20個体調べた。いずれの組合せにおいても子房の大きさに大した変りはみ

Table 60-3. Average length of cultured ovaries

Cross	No. of ovaries examined	Av. capsule length (mm)
No. 5. Kyoto-hakusai and Nakano-wase		
Kyoto x Kyoto	10	18.9
Kyoto x Nakano	10	20.8
Nakano x Nakano	10	17.5
Nakano x Kyoto	10	16.4
No. 6. Wase-komatsuna and Nozaki-chusei		
Komatsuna x Komatsuna	10	21.1
Komatsuna x Nozaki	10	14.6
Nozaki x Nozaki	10	24.2
Nozaki x Komatsuna	10	18.8

られなかつた。

NO. 5においでは、  
キヤベツに白菜の  
花物を交配したも  
のが一番短かく約  
5mm一番長い組合

せのものより短か  
つた。NO. 6の交配

組合せにおいでは  
小松菜と母ネにし

て野崎中世と花物

親としたものが最  
も短かく、最も長

い組合せと軽げて

約10mmも短かか

つた。NO. 7にお

いでは、サクセツ

シヨウ×体菜の組

み合せが一番短かかつたが、それ以外はいずれも同じ長さを示した。

Table 60-4. Average length of cultured ovaries

Cross	No. of ovaries examined	Av. capsule length (mm)	
No. 7. Nikanme-taina and Succession			ナプス型雑種を得るための子房の人工培養
Taina x Taina	10	18.6	子房の培養によるナプス型雑種畜産の結果と、交配組み合わせの違いによつて、表61, 62,
Taina x Succession	10	17.0	63, 64, 65, 66,
Succession x Succession	10	18.4	67 に示す(表61, 62, 63, 64, 65, 66, 67)。
Succession x Taina	10	14.4	表61は畑菜とサクセツニヨニに於ける結果であつて、表61-1は畑菜を母系にして畑菜の交配とサクセツニヨニの交配を示し、表61-2はサクセツニヨニを母系にしてサクセツニヨニ或いは畑菜の交配結果を示した。植

63, 64, 65, 66, 67 に示す(表61, 62, 63, 64, 65, 66, 67)。

表61は畑菜とサクセツニヨニに於ける結果であつて、表61-1は畑菜を母系にして畑菜の交配とサクセツニヨニの交配を示し、表61-2はサクセツニヨニを母系にしてサクセツニヨニ或いは畑菜の交配結果を示した。植

込んだ子房の数は畑菜と母系に用いたものは平均10個体であつたが、サクセツニヨニを母系に用いたものは、サクセツニヨニを交配

Table 61-1. Interacting effects of coconut milk and casein hydrolysate on cultured ovaries in the crosses between B. campestris cv. Hatana and B. oleracea cv. Succession

Cross	Medium <sup>1)</sup>	No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	AV. capsule length (mm)	AV. callus formation	No. of seeds obtained	No. of immature seeds	Seed set (%)	Seed Germination (%)
Hatana	1	10	10	37.7	—	0	0	0.0	—
	2	10	10	40.8	—	0	1	0.0	—
	3	10	10	38.6	—	0	2	0.0	—
	4	10	10	38.2	—	0	0	0.0	—
	5	10	10	37.5	—	0	0	0.0	—
	6	9	8	37.3	—	0	0	0.0	—
Total		59	58	38.4	—	0	3	0.0	—
Hatana x Succession	1	10	10	54.4	—	1	1	0.3	0.0
	2	10	10	57.9	—	0	1	0.0	—
	3	10	10	56.0	—	0	2	0.0	—
	4	10	10	52.9	—	0	4	0.0	—
	5	10	9	53.8	—	0	0	0.0	—
	6	10	10	54.6	—	0	0	0.0	—
Total		60	59	54.9	—	1	8	0.06	0.0

1): Refer to Table 56.

Table 61-2. Interacting effects of coconut milk and casein hydrolysate on cultured ovaries in the crosses between *B. campestris* cv. Hatana and *B. oleracea* cv. Succession

Cross	Medium	No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	Average capsule length (mm)	Callus formation	No. of seeds obtained	No. of immature seeds	Seeds set (%)	Seed germination (%)
Succession x Succession	1	4	4	47.8	-	6	0	5.0	100
	2	5	5	44.8	++2)	0	0	0.0	-
	3	4	4	42.8	+++2)	2	0	1.7	100
	4	4	4	35.5	±	2	0	1.7	100
	5	6	6	42.7	+++2)	3	0	1.7	100
	6	5	5	54.0	+++2)	1	0	0.7	100
Total		28	28	45.0		14	0	1.7	100
Succession x Hatana	1	7	7	42.4	-	0	2	0.0	-
	2	9	9	50.2	++2)	0	4	0.0	-
	3	9	9	48.2	+++2)	0	5	0.0	-
	4	10	10	53.9	-	0	3	0.0	-
	5	9	9	53.4	+++2)	0	0	0.0	-
	6	10	10	49.0	+++2)	0	3	0.0	-
Total		54	54	51.7		0	17	0.0	-

1): Refer to Table 56.  
 2): Roots were formed from the callus.

Table 62-1. Interacting effects of coconut milk and casein hydrolyzate on cultured ovaries in the crosses between B. campestris cv. Nozaki-hakusai and B. oleracea cv. Nakano-wase

Cross	Medium	No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	Av. capsule length (mm)	Av. callus formation	No. of seeds obtained	No. of immature seeds	Seed set (%)	Seed germination (%)
Nozaki-hakusai x Nozaki-hakusai	1	100	10	27.6	-	8	9	3.3	50.0
	2	100	10	29.1	+	2	8	0.8	100
	3	100	10	32.8	±	8	17	3.3	61.1
	4	100	9	27.0	-	7	2	3.2	57.1
	5	100	10	27.7	+	3	7	1.3	100
	6	100	10	34.1	±	8	8	3.3	87.5
Total		600	59	29.8		36	51	2.5	69.4
Nozaki-hakusai x Nakano-wase	1	100	8	29.6	-	0	6 <sup>2)</sup>	0.0	-
	2	100	10	31.9	+	0	4 <sup>2)</sup>	0.0	-
	3	100	10	29.6	+	0	1	0.0	-
	4	100	10	28.7	-	0	8 <sup>2)</sup>	0.0	-
	5	90	9	28.7	±	0	0	0.0	-
	6	100	10	27.0	++	0	1	0.0	-
Total		590	57	29.4		0	20	0.0	-

1): Refer to Table 56.  
 2): Immature embryo showing no seed formatting.

Table 62 -2.

Interacting effects of coconut milk and casein hydrolysate on cultured ovaries in the crosses between *B. campestris* cv. Nozaki-hakusai and *B. oleracea* cv. Nakano-wase

Cross	Medium	No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	Average length (mm)	Callus formation	No. of seeds obtained	No. of immature seeds	Seeds set (%)	Seed germination (%)
Nakano-wase x Nakano-wase	1	10	10	51.4	-	0	0	0.0	-
	2	10	10	55.2	+ 2)	0	0	0.0	-
	3	10	10	53.5	+++ 2)	0	3	0.0	-
	4	9	9	54.9	±	2	0	0.7	100
	5	10	10	53.9	+++ 2)	0	1	0.0	-
	6	10	9	52.0	+++ 2)	0	1	0.0	-
Total		59	59	52.6		2	5	0.1	100
Nakano-wase x Nozaki-hakusai	1	10	10	53.8	-	0	9	0.0	-
	2	10	10	52.8	+++ 2)	0	12	0.0	-
	3	10	8	51.3	+++ 2)	0	7	0.0	-
	4	10	10	49.0	-	0	13	0.0	-
	5	10	10	52.4	+++ 2)	0	4	0.0	-
	6	10	10	54.1	+++ 2)	0	8	0.0	-
Total		60	58	51.4		0	53	0.0	-

1): Refer to Table 56.

2): Roots were formed from the callus.



196

したもので平均4.6個、烟草を交配したもので9個体であった。收穫時における莢の長さは実験区による相違よりも交配組合せの内の相違のものが大きく、各区の莢の長さの平均は、烟草の自殖で38.4mm、烟草×サクセツニヨニで54.9mm、サクセツニヨニの自殖で45.0mm、サクセツニヨニ×烟草で51.7mmであった。切り口からのカルス形成は、烟草ではみられなかったが、サクセツニヨニを母体を用いたものは、ココナットミルクを10%あるいは20%培地に添加した場合に、著しくカルス形成がみられ、之から根の発生も観察された。得られた種子は烟草の自殖でも1粒の種子も得られなかったが、サクセツニヨニの自殖においては14粒得られた。正交交雑においては、烟草×サクセツニヨニで1粒得られただけであった。サクセツニヨニの自殖においては、培養基組成のちがいによる種子形成の差異ははっきりみられなかった。得られた種子の発芽率は良かった。

(197)

表62は野崎白菜と中野早生の結果で、表62-1は野崎白菜を母方に用いて、これに野崎白菜と中野早生を交配したものであり、表62-2は中野早生を母方にして、中野早生と野崎白菜とそれぞれ交配したものである。植えこんだ子房の数は、いずれの交配組合せにおいても平均10個体であった。各交配組合せによる平均の莢の長さは、野崎白菜の自殖で29.8mm、野崎白菜×中野早生で29.4mm、中野早生の自殖で52.6mm、中野早生×野崎白菜で51.4mmであり、傾向を示した。切り取り口で生じるカルス形成の割合を平均してみると、野崎白菜の場合はココナツトミルウ添加区で僅かに良好であった。一方中野早生の場合には、ココナツトミルウ添加区におけるカルス形成は非常に良く、そこから莢根もみらした。得られた種子は野崎白菜では成熟種子が計36粒、未熟種子5粒であったが、中野早生では2粒の成熟種子しか得られず、未熟種子もほとんどみられなかった。正逆交

雑の野崎白菜 × 中野早生 においては、成熟した種子は 1 粒も得られなかつたが、未熟種子の中には種皮のみ得られ、胚だけ発達した状態で珠柄に付着してゐるものがみられた。これら付着してゐる胚の発達程度は、表中には未熟種子としてまとめられたが、その発達程度は色々あつて最も良く発達したものは、ほとんど成熟に近いものであつた。最も発達の悪い胚が "torpedo" 型であつた。逆交雑の中野早生 × 野崎白菜では、未熟種子が多数みられたが、みづから著しく萎縮してゐて、胚のみ発達してゐるものも認められなかつた。得られた種子の発芽は良かった。

表 63 は金町小燕と中野早生の結果で、表 63-1 は金町小燕を母系に用いて、これに金町小燕と中野早生を交配したものであり、表 63-2 は中野早生を母系にして、中野早生と金町小燕とをこれと交配したものである。植之込んば子房の平均数は各組合せについて 10 個体であつた。収穫時にはける莢の長さは各足

Table 63-1. Interacting effects of coconut milk and casein hydrolysate on cultured ovaries in the crosses between B. campestris cv. Kanamachi-kokabu and B. oleracea cv. Nakano-wase

Cross	Medium	No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	Av. capsule length (mm)	Av. callus formation	No. of seeds obtained	No. of immature seeds	Seed set (%)	Seed germination (%)
Kanamachi-kokabu x Kanamachi-kokabu	1	10	10	44.4	-	2	4	0.7	100
	2	10	10	47.1	+ 2)	3	1	1.1	100
	3	10	10	45.1	±	0	4	0.0	-
	4	10	10	44.7	-	7	6	2.5	71.4
	5	10	10	43.9	+	0	2	0.0	-
	6	10	10	44.6	+	0	1	0.0	-
Total		60	59	45.0		12	18	0.7	75.0
Kanamachi-kokabu x Nakano-wase	1	10	10	25.6	-	0	0	0.0	-
	2	10	10	26.3	-	0	0	0.0	-
	3	10	10	26.1	-	0	0	0.0	-
	4	10	10	27.4	-	0	0	0.0	-
	5	10	10	27.4	-	0	0	0.0	-
	6	10	10	23.4	-	0	0	0.0	-
Total		60	60	26.4		0	0	0.0	-

1): Refer to Table 56.  
 2): Roots were fromed from the callus.

Table 65-2. Interacting effects of coconut milk and casein hydrolysate on cultured ovaries in the crosses between *B. campestris* cv. Kanamachi-kokabu and *B. oleracea* cv. Nakano-wase

Cross	Medicine	No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	av. capsule length (mm)	av. callus formation	No. of seeds obtained	No. of immature seeds	Seed set (%)	Seed germination (%)
Nakano-wase	1	10	10	48.1	-	8	3	2.7	100
	2	10	9	47.6	- 2)	0	2	0.0	-
	3	10	10	44.3	+ 2)	3	3	1.0	0.0
	4	10	10	51.2	-	3	1	1.0	66.7
	5	10	10	43.6	+ 2)	2	3	0.7	100
	6	10	10	44.4	+ 2)	2	2	0.7	100
Total		60	59	45.9		18	14	1.0	77.8
Nakano-wase	1	10	8	46.4	+ 2)	0	1	0.0	-
	2	10	9	46.2	+ 2)	0	1	0.0	-
	3	10	10	46.2	+ 2)	0	0	0.0	-
	4	10	10	44.8	-	0	2	0.0	-
	5	10	10	49.6	+ 2)	0	2	0.0	-
	6	10	8	46.0	+++2)	0	2	0.0	-
Total		60	55	46.6		0	8	0.0	-

1): Refer to Table 56.  
 2): Roots were formed from the callus.

Table 64-1. Interacting effects of yeast extract and casein hydrolysate on cultured ovaries in the cross of B. campestris cv. Nozaki-hakusai

Medium	No. of cultured ovaries	No. of ovaries examined	AV. capsule length (mm)	AV. callus formation	No. of seeds obtained	No. of immature seeds	Seed set (%)	Seed germination (%)
1	15	15	24.1	-	10	29	2.8	80.0
2	15	14	24.6	-	12	16	3.6	33.3
3	15	13	23.0	-	6	20	1.9	16.7
4	15	14	22.4	-	7	11	2.1	42.9
5	15	14	26.1	-	11	22	3.3	45.5
6	15	14	26.3	-	5	38	1.5	40.0
7	12	11	27.7	-	7	7 <sup>23</sup>	2.7	57.1
8	12	12	30.3	-	6	11	2.1	50.0
9	12	10	30.1	-	1	9	0.4	0.0
10	12	10	26.0	-	7	16	2.9	28.6
11	10	10	31.2	-	4	16	1.7	50.0
12	11	10	28.7	-	3	12	1.3	33.3
Total	159	147	26.8	-	79	197	1.9	44.3

1): Refer to Table 57.  
 2): Immature embryo showing no seed forming.

Table 64-2. Interacting effects of yeast extract and casein hydrolysate on cultured ovaries in the cross of B. campestris cv. Nozaki-hakusai x B. oleracea cv. Nozaki-wase

Medium	No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	Av. capsule length (mm)	Av. callus formation	No. of seeds obtained	No. of immature seeds	Seed set (%)	Seed germination (%)
1	12	12	21.7	-	6 <sup>2)</sup>	5 <sup>3)</sup>	2.1	-
2	12	12	23.4	-	4 <sup>2)</sup>	3 <sup>3)</sup>	1.4	-
3	12	12	20.5	-	3 <sup>2)</sup>	1 <sup>3)</sup>	1.0	-
4	12	11	19.7	-	9 <sup>2)</sup>	11 <sup>3)</sup>	3.4	-
5	12	12	19.7	-	4 <sup>2)</sup>	2 <sup>3)</sup>	1.4	-
6	12	11	20.3	-	1 <sup>2)</sup>	0	0.4	-
7	10	10	18.0	-	0	2	0.0	-
8	10	10	15.0	-	0	0	0.0	-
9	10	9	19.4	-	2	5	0.9	50.0
10	10	10	16.6	-	2 <sup>2)</sup>	1	0.8	-
11	10	10	19.9	-	3	8	1.3	100
12	10	10	15.9	-	1	1	0.4	100
Total	132	129	19.8	-	35	39	1.0	83.3

- 1): Refer to Table 57.
- 2): Mature embryo showing no seed formation.
- 3): Immature embryo showing no seed formation.

Table 64-3. Interacting effects of yeast extract and casein hydrolysate on cultured ovaries in the cross of B. oleracea cv. Nozaki-wase

Medium	No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	Av. capsule length (mm)	Av. callus formation	No. of seeds obtained	No. of immature seeds	Seed set (%)	Seed germination (%)
1	5	4	24.0	-	0	0	0.0	-
2	5	5	30.6	+	0	2	0.0	-
3	5	5	29.8	+	0	0	0.0	-
4	5	5	31.2	++	0	0	0.0	-
5	5	4	24.5	-	0	0	0.0	-
6	6	6	27.0	-	1	3	0.6	0.0
7	5	5	30.8	+	1	0	0.7	0.0
8	5	5	33.0	+	0	0	0.0	-
9	5	5	21.2	+	1	0	0.7	0.0
10	5	5	28.8	+	0	0	0.0	-
11	5	5	31.2	+	0	0	0.0	-
12	5	5	23.4	-	0	0	0.0	-
Total	61	59	28.5		3	5	0.2	0.0

1): Refer to Table 57.



Table 64-4. Interacting effects of yeast extract and casein hydrolysate on cultured ovaries in the cross of B. oleracea cv. Nozaki-wase x B. campestris cv. Nozaki-hakusai

Media <sup>1)</sup>	No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	Av. capsule length (mm)	Av. callus formation	No. of seeds obtained	No. of immature seeds	Seed set (%)	Seed Germination (%)
1	5	4	20.5	-	0	0	0.0	-
2	5	4	24.0	+	0	0	0.0	-
3	4	4	26.8	++	0	0	0.0	-
4	5	5	36.4	++	0	0	0.0	-
5	5	5	24.0	-	0	1	0.0	-
6	4	4	17.8	-	0	0	0.0	-
7	13	13	29.8	+	0	0	0.0	-
8	13	11	24.0	-	0	0	0.0	-
9	13	11	26.1	+	0	0	0.0	-
10	13	13	33.2	-	0	0	0.0	-
11	14	13	25.5	-	0	0	0.0	-
12	14	14	28.0	-	0	0	0.0	-
Total	108	101	27.2		0	1	0.0	-

1): Refer to Table 57.

と平均してみると、金町小燕の自殖は  $45.0 \text{ mm}$ 、  
 金町小燕  $\times$  中野早生は  $26.0 \text{ mm}$ 、中野早生の自  
 殖は  $45.9 \text{ mm}$ 、中野早生  $\times$  金町小燕は  $46.6 \text{ mm}$   
 であつた。金町小燕  $\times$  中野早生の組合せにお  
 いては他と較べて著しく莢の発達が悪かつた。  
 カルスの形成については変異の中が大きく、  
 莢根はカルス形成の良好なものをからみられた。  
 中野早生を母系に用いた場合のカルス形成は  
 ココナットミルクの濃度と関係があるように  
 思へた。種子形成は、対照区として自殖した  
 ものでは同程度の割合があつたし、その種子  
 の発芽率も高かつた。種間交配においては、  
 いずれの場合も成熟種子は得られなかつた。

表64は野崎白菜と野崎早生の結果で、培地  
 組成はイースト抽出物とカゼイン分解物を  
 用いた表57の組合せを用いた。

表64-1は野崎白菜の自殖の結果を示し、表  
 64-2は野崎白菜  $\times$  野崎早生、表64-3は野  
 崎早生の自殖、表64-4は野崎早生  $\times$  野崎白  
 菜の結果とそれぞれ示した。収穫時における

菘の平均の長さとは、野崎白菜の自殖で  $26.8\text{mm}$ 、野崎白菜  $\times$  野崎早生で  $19.8\text{mm}$ 、野崎早生の自殖で  $28.5\text{mm}$ 、野崎早生  $\times$  野崎白菜で  $22.2\text{mm}$  であつた。植之じしむ時の平均子房の大きさの一番短かつた野崎白菜の自殖は、野崎早生の自殖に次いで長く、植之じしむ時が一番長かつた野崎白菜  $\times$  野崎早生は一番短かつた。切り口におけるカルスの形成は白菜と母芥に用いたものではまづなくみられなかつたが、キヤベツ（野崎早生）と母芥は用いたものでは若干みられた。得られた種子は野崎早生の自殖では成熟種子 3 粒、未熟種子 5 粒で種子稔性が非常に低かつたが、野崎白菜の自殖では成熟種子 79 粒、未熟種子 197 粒が得られ、非常に高い種子稔性を示した。この場合の種子形成と培地別に見ると、カゼイニ酶分解物  $300 \sim 500\text{mg/l}$  が有効であり、イースト抽出物は  $2\text{g/l}$  まではよく、それ以上の濃度ではかえつて種子形成率が低下した。得られた種子の発芽率は  $50\%$  前後であり、余り良好

ぞは存かつた。種間交雑の野崎白菜×野崎早生においでは、種子から発芽したように発達した胚が、珠柄に付着してゐるのが多数みられ、種皮は全く存かつた。これ等の胚を收穫時に無菌的に取り出し、whiteの培地に移し、1000ルクス連続照射、25°Cの条件下で育てた。また未熟種子の中には、珠柄に胚だけが付着してゐるものもあつたが、これらの胚は発達が早く、"torpedo"型から"late torpedo"型のものでもあつた。野崎白菜の自殖の培地番号No.9の未熟種子においでも、7粒のうち5粒は胚のみ発達したものであり"torpedo"型から"late torpedo"型であつた。交雑種子は6粒得られ、うち5粒が発芽した。これに反して逆交配の野崎早生×野崎白菜においでは、1粒の種子も得られず、また未熟種子も存在しなかつた。

表65は京都白菜と中野早生の結果であり、表58の培地組成に植えたものから得られたものである。表65-1は京都白菜を母系にして、

Table 65-1. Interacting effects of coconut milk and casein hydrolyzate on cultured ovaries in the crosses between *B. campestris* cv. Kyoto-hakusai and *B. oleracea* cv. Nakano-wase

Cross	Medium	No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	AV. capsule length (mm)	AV. callus formation	No. of seeds obtained	No. of immature seeds	Seed set (%)	Seed germination (%)
Kyoto-hakusai x Kyoto-hakusai	1	10	10	22.3	-	0	18	0.0	-
	2	10	10	25.9	-	3	2	1.3	33.3
	3	10	10	25.5	-	1	14	0.4	100
	4	10	10	27.3	-	5	26	2.1	20.0
	5	10	9	26.7	-	0	12	0.0	-
	6	10	8	24.9	-	4	10	1.7	75.0
Total		60	57	25.4		13	82	0.7	46.2
Kyoto-hakusai x Nakano-wase	1	10	10	20.5	-	1 <sup>3)</sup>	2 <sup>4)</sup>	0.4	-
	2	10	10	24.8	-	1 <sup>3)</sup>	0	0.4	-
	3	10	10	22.5	- <sup>2)</sup>	0	0	0.0	-
	4	10	10	25.9	-	2	2	0.8	0.0
	5	10	10	25.4	±	1 <sup>3)</sup>	2 <sup>4)</sup>	0.4	0.0
	6	10	10	22.8	-	1 <sup>3)</sup>	0	0.4	-
Total		60	60	23.7		6	6	0.4	0.0

- 1): Refer to Table 58.  
 2): Roots were formed from the callus.  
 3): Mature embryo showing no seed formation.  
 4): Immature embryo showing no seed formation.

Table 65-2. Interacting effects of coconut milk and casein hydrolysate on cultured ovaries in the crosses between *B. campestris* cv. Kyoto-hakusai and *B. oleracea* cv. Nakano-wase.

Cross Medium	No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	Average capsule length (mm)	Average callus formation	No. of seeds obtained	No. of immature seeds	Seed set (%)	Seed germination (%)
Nakano-wase x Nakano-wase	1	10	42.1	-	6	3	2.0	16.7
	2	10	37.3	-2)	6	2	2.0	16.7
	3	10	39.7	±2)	9	1	3.0	22.2
	4	10	41.1	-	9	1	3.0	11.1
	5	10	33.5	+2)	9	5	3.0	11.1
	6	10	37.4	+2)	3	2	1.0	33.3
Total	66	60	38.5		42	14	2.3	16.7
Nakano-wase x Kyoto-hakusai	1	10	36.4	±	0	1	0.0	-
	2	10	43.5	+2)	0	1	0.0	-
	3	10	40.7	+2)	0	2	0.0	-
	4	10	43.2	+2)	0	6	0.0	-
	5	10	38.9	+2)	0	1	0.0	-
	6	10	36.9	++	0	1	0.0	-
Total	60	60	39.8		0	12	0.0	-

1): Refer to Table 58.  
 2): Roots were formed from the callus.

Table 66-1. Interacting effects of coconut milk and casein hydrolysate on cultured ovaries in the crosses between *B. campestris* cv. Wase-komatsuna and *B. oleracea* cv. Nozaki-chusei

Cross	Medium	No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	AV. capsule length (mm)	AV. callus formation	No. of seeds obtained	No. of immature seeds	Seed set (%)	Seed germination (%)
Wase-komatsuna x Wase-komatsuna	1	10	10	41.6	—	9	46	4.1	0.0
	2	10	10	42.1	—	1	31	0.5	100
	3	10	9	39.9	—	1	18	0.5	0.0
	4	10	8	41.4	—	11	29	6.3	54.5
	5	10	10	40.4	—	2	42	0.9	0.0
	6	10	9	41.3	—	3	36	1.0	0.0
Total		60	56	41.1		27	202	2.2	25.9
Wase-komatsuna x Nozaki-chusei	1	10	10	23.8	—	0	0	0.0	—
	2	10	10	25.8	—	0	0	0.0	—
	3	10	9	23.6	—	0	0	0.0	—
	4	10	10	25.6	—	0	0	0.0	—
	5	10	9	23.4	—	0	0	0.0	—
	6	10	10	24.9	—	0	0	0.0	—
Total		60	58	24.6		0	0	0.0	—

1): Refer to Table 58.

Table 66-2. Interacting effects of coconut milk and casein hydrolysate on cultured ovaries in the crosses between B. campestris cv. Wase-komatsuna and B. oleracea cv. Nozaki-chusei

Cross Medium	No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	AV. capsule length (mm)	AV. callus formation	No. of seeds obtained	No. of immature seeds	Seed set (%)	Seed germination (%)
Nozaki-chusei x Nozaki-chusei	1	10	42.1	-	0	3	0.0	-
	2	10	40.2	++ <sup>2)</sup>	1	0	0.3	0.0
	3	10	39.3	++	0	0	0.0	-
	4	10	38.9	-	0	1	0.0	-
	5	10	35.6	++	1	0	0.3	-
	6	10	36.8	++ <sup>2)</sup>	0	1	0.0	-
Total	60	60	38.8		2	5	0.01	0.0
Nozaki-chusei x Wase-komatsuna	1	10	28.8	+	0	0	0.0	-
	2	10	31.6	++	0	0	0.0	-
	3	10	28.6	+++	0	0	0.0	-
	4	10	30.0	±	0	0	0.0	-
	5	10	26.6	++	0	0	0.0	-
	6	10	30.1	+++ <sup>2)</sup>	0	0	0.0	-
Total	60	60	29.3		0	0	0.0	-

1): Refer to Table 58.  
2): Roots were formed from the callus.



Table 67-1. Interacting effects of coconut milk and casein hydrolysate on cultured ovaries in the crosses between *B. campestris* cv. Nikanme-taina and *B. oleracea* cv. Succession

Cross	Medium	No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	AV. capsule length (mm)	AV. callus formation	No. of seeds obtained	No. of immature seeds	Seed set (%)	Seed Germination (%)
Nikanme-taina x taina	1	10	10	31.6	-	3	23	1.4	0.0
	2	10	10	27.9	-	0	12	0.0	-
	3	10	9	28.3	-	1	20	0.5	0.0
	4	10	10	30.5	-	3	22	1.4	66.7
	5	10	9	31.2	-	0	18	0.0	-
	6	10	6	27.2	-	0	10	0.0	-
Total		60	54	29.6	-	7	105	0.6	28.6
Nikanme-taina x Succession	1	10	10	22.9	-	5 <sup>2)</sup>	0	2.3	-
	2	10	7	22.4	-	3 <sup>2)</sup>	3	2.0	-
	3	10	10	22.9	-	0	4 <sup>3)</sup>	0.0	-
	4	10	10	24.3	-	0	8	0.0	-
	5	10	9	22.1	-	0	8	0.0	-
	6	10	10	23.8	-	8 <sup>2)</sup>	5 <sup>3)</sup>	3.6	-
Total		60	56	23.1	-	16	28	1.3	-

- 1): Refer to Table 58.  
 2): Mature embryo showing no seed formation.  
 3): Immature embryo showing no seed formation.

Table 67-2.

Interacting effects of coconut milk and casein hydrolysate on cultured ovaries in the crosses between *B. campestris* cv. Nikanme-taina and *B. oleracea* cv. Succession

Cross Medium	No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	Average length (mm)	Av. callus formation	No. of seeds obtained	No. of immature seeds	Seed set (%)	Seed germination (%)
Succession x Succession	1	10	36.9	-	2	1	0.7	0.0
	2	10	37.4	+++	0	1	0.0	-
	3	10	37.0	±	1	3	0.3	0.0
	4	10	40.1	-	1	0	0.3	0.0
	5	10	36.1	-	1	1	0.3	0.0
	6	10	32.8	+2)	2	1	0.7	0.0
Total	60	59	36.7		7	7	0.4	0.0
Succession x Nikanme-taina	1	10	40.7	-	0	1	0.0	-
	2	10	34.1	+2)	0	0	0.0	-
	3	10	35.0	+2)	0	0	0.0	-
	4	10	43.1	-	0	0	0.0	-
	5	10	38.0	+2)	0	0	0.0	-
	6	10	39.5	+2)	0	1	0.0	-
Total	60	59	38.4		0	2	0.0	-

1): Refer to Table 58.  
 2): Roots were formed from the callus.

京都白菜と中野早生と交配したものであり、  
 表65-2は中野早生を母系にして中野早生と  
 京都白菜と交配した結果を示した。平均10個  
 体の子房を植之込んだ。平均の莢の長さは、  
 京都白菜の自殖が25.4mm、京都白菜×中野  
 早生が23.7mm、中野早生の自殖が38.5mm、  
 中野早生×京都白菜が39.8mmであつて、傾  
 倒型であつた。カルス形成にうけるには、京都  
 白菜を母系としたものはほとんどみられな  
 かつたが、中野早生を母系に用いたものは、コ  
 ナットミルクを添加した区において、カ  
 ルス形成が良くなり、その大部分のものから  
 根が発生してゐた。種子形成にうけるには、京  
 都白菜の自殖が13粒、中野早生の自殖が42  
 粒得られた。京都白菜の自殖ではカゼイン酸  
 分解物を添加した場合のものが、種子形成は良  
 かつたが、中野早生では差違はなかつた。中  
 野早生においては多数の種子形成がみられ  
 た。京都白菜と中野早生の正逆交雑における

種子形成については、京都白菜×中野早生では3粒の交雑種子が得られたが、11粒も未発芽であった。また種子から発芽したように発露した胚が、珠柄に付着して11個ものかす个体みられた。これ等の胚を収穫時に無菌的に取り出し、whiteの培地に移植した。また未熟種子の中には未発露の胚だけが珠柄に付着して11個ものかみつた。その発露状態は"torpedo"型から"late torpedo"型までのものであった。これに対して中野早生×京都白菜では1粒の交雑種子も得られなかったし、未熟種子も僅かに得られただけであった。

表66は早生小松菜と野崎中世の結果で、表66-1は早生小松菜を母系にして早生小松菜と野崎中世と交配したものであり、表66-2は野崎中世を母系にして野崎中世と早生小松菜と交配した結果を示した。平均10個体の子房を各組合せとも植之込んだ。収穫時における菜の平均の長さは、早生小松菜の自殖が一番長く41.1mm、次いで野崎中世の自殖で

38.8 mm, 一番生長の要かつたのは早生小松菜×野崎中世で24.6 mmであつた。カラスの形成は早生小松菜を母ネに用いたものにおいはみられなかつたが、野崎中世の場合にはコナットミルクの添加により著しいカラス形成がみられた。早生小松菜と野崎中世の自殖の種子形成については、2ク粒と2粒と種子がそれぞれ得られた。この発芽率は尙く早生小松菜でク粒(25.9%)発芽したが、野崎中世のものは発芽種子は得られなかつた。早生小松菜と野崎中世の正逆交雑においは、いずれの組合せにおいても1粒の種子も得られなかつた。また未熟種子も全く存在しなかつた。

表67は二重自体菜とサクセツニヨニの結果で、表67-1は二重自体菜を母ネに用いたものであり、表67-2はサクセツニヨニを母ネに用いて、サクセツニヨニと二重自体菜を花粉親とした結果である。各組合せも各実験区について平均10個の子房を植へ込んだ。收穫時における莢の平均の長さはサクセツニヨニ

ともオに用いたものが、二倍目体菜ともオに  
 用いたものより長かつた。カルス形成と根の  
 発生は二倍目体菜の場合には認められなく、  
 サクセツニヨニのオからだけ認められた。二  
 倍目体菜の自殖の発熟種子は僅かク粒で、未  
 熟種子は105粒得られた。得られた発熟種子  
 ク粒のうち2粒発芽した(28.6%)。サクセ  
 ツニヨニの自殖ではク粒の発熟種子が得られ  
 たが、11が此法で発芽があつた。二倍目体菜  
 とサクセツニヨニとの正逆交雑においては、11  
 が此の組合せには亦ク粒の発熟種子は得られな  
 かつた。二倍目体菜ともオに用いた交配では  
 珠柄に胚だけ付着してゐる、発芽種子のよう  
 に発達した胚が多数みられた。それらをwhite  
 の培地に移植し生育させた。また同じ組合せ  
 において未熟種子の中にも胚だけ発達してゐ  
 るものが珠柄に付着してゐる未発達の胚がみ  
 られた。これらの胚の発達状態は"torpedo"型  
 から"late torpedo"型であつた。

## 得られた雑種植物個体

種子から発芽した幼植物のような胚のみが発達し、珠柄に付着していったものを無菌的に取り出して white (1963) の培地に移し、連続光の下で培養し、本葉の展開と発根を待って、植木鉢に移植した。この実験の結果を表 68 に示す。雑種は 3 つの組合せから得られた。野崎白菜 × 野崎早生の組合せからは、試験管から鉢植にするまでは、ほとんど胚を取り出した数と同じであったが、成体まで育ったものが僅か 3 個体であった。京都白菜 × 中野早生では 3 個体の胚を取り出して、2 個体の成育個体を得た。また 二食自体菜 × サクセツシヨの組合せからは、18 個体の胚を取り出して、生育して開花まで成育したものが 12 個体と、試験管から植木鉢に植えたときの損失が少なかった。よりの実験から得た雑種植物個体は計 19 個体である。

white (1963) の培地に移してからの生育に

Table 68. Number of hybrid plants produced by test-tube culture of developing embryos which were found in cultured ovaries

Cross	Medium	No. of embryos cultured	No. of plants transplanted	No. of plants grown
Nozaki-hakusai	1 4)	6	5	1
x	2	4	4	1
Nozaki-wase	3	3	3	0
	4	10	10	3
	5	4	4	0
	6	1	1	0
	10	2	0	-
Total		30	27	5
Kyoto-hakusai	1 2)	1	1	1
x	2	1	1	1
Nakano-wase	6	1	1	0
Total		3	3	2
Nikanme-taina	1 3)	5	5	3
x	2	3	0	-
Succession	3	1	1	1
	6	9	9	8
Total		18	15	12

- 1): Refer to Table 64-2.  
 2): Refer to Table 65-1.  
 3): Refer to Table 67-1.

には、すぐに本葉を出して生育するもの(図16a)、胚軸の伸長だけが著しいもの(図16b)、子葉の中から数個にも子葉が発生してくるもの(図16c)等の変異がみられた。



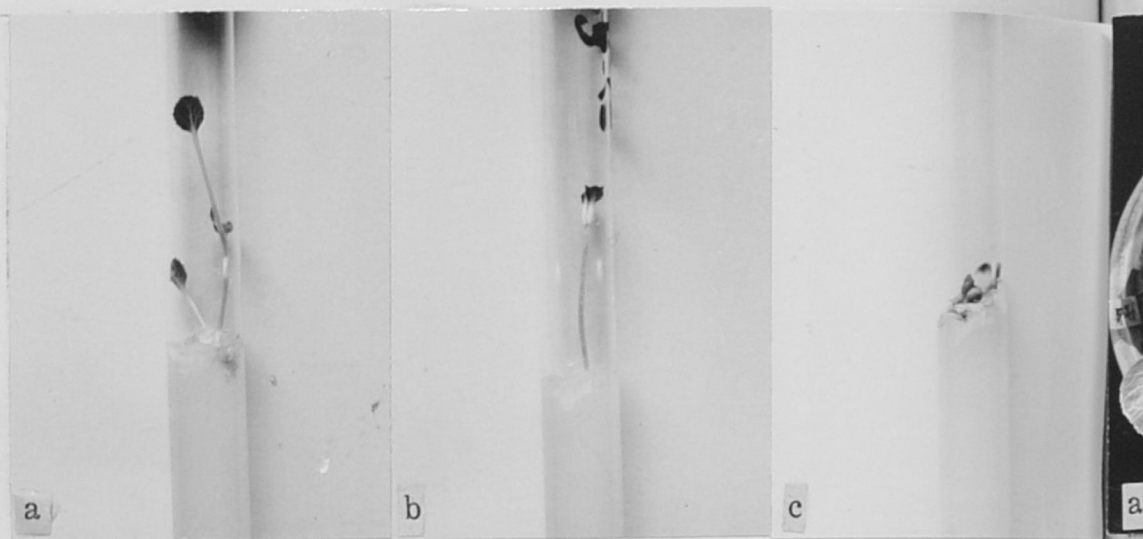


Fig. 16. Test-tube culture of developing embryos, which were formed in cultured ovary.  
 a. Plantlet growing normally.  
 b. Plantlet showing remarkable growth of hypocotyle.  
 c. Plantlet developing many cotyledon-like leaves.

図17は雑種植物体が得られ、親の個体を示したもので、図17aは野崎白菜、図17bは食自体菜で、いずれも母系として用いたものである。図17cは中野早生で花粉親として用いたものである(図17)。

試験管から植木鉢へ移植した発達の途中で、正常に菜莖を続けるものの他に、生長点が2つ取っはさるゝに分岐するものもみられる。鉢に植之て根の活着が始まると著しい生育を示した(図18a, c, e, g)。これらは成長す

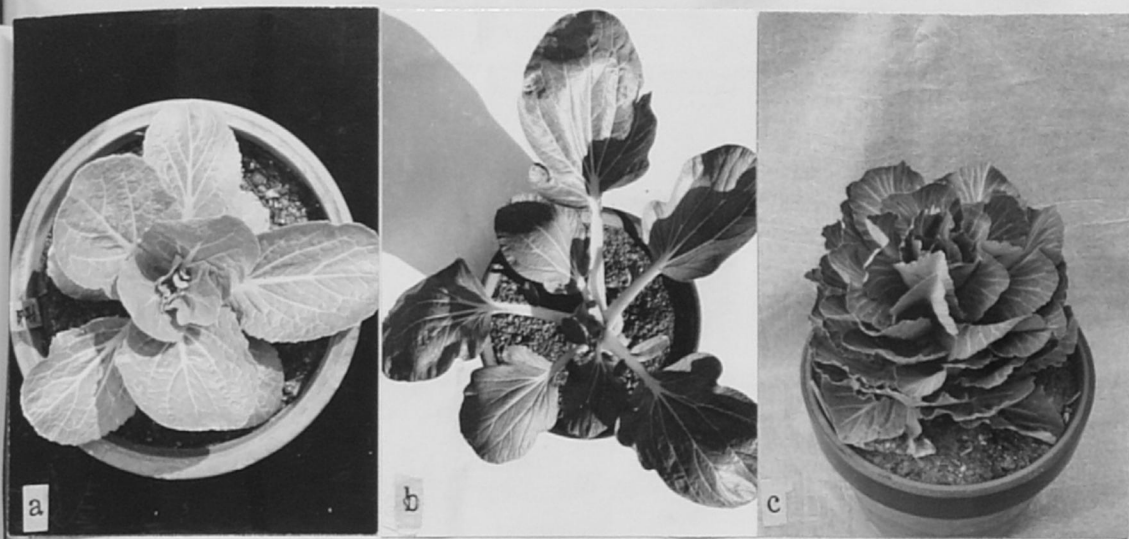


Fig. 17. Maternal plants used in the ovary culture.  
 a. *B. campestris* L. ssp. *pekinensis* (Lour.) Olsson cultivar *Nozaki-hakusai* used as a maternal plant.  
 b. *B. campestris* L. ssp. *chinensis* (L.) Makino cultivar *Nikanme-taina* used as a maternal plant.  
 c. *B. oleracea* L. var. *capitata* L. cultivar *Nakano-wase* used as a paternal plant.

るに従つて、雑種の形態と示した。即ち=食  
 自体菜とサクセツシヨニの中間と示すもの（  
 図18b, c）、白菜と野崎早生の中間と示すも  
 のとがみられた（図18f, g, i）。体菜とキャ  
 ベツの雑種では、葉全体の形は体菜に似てい  
 たが、葉の緑はキャベツのように濃緑色を呈  
 し、葉は厚かつた。12個体生育した個体の中  
 での個体変異はなかつた。白菜とキャベツの

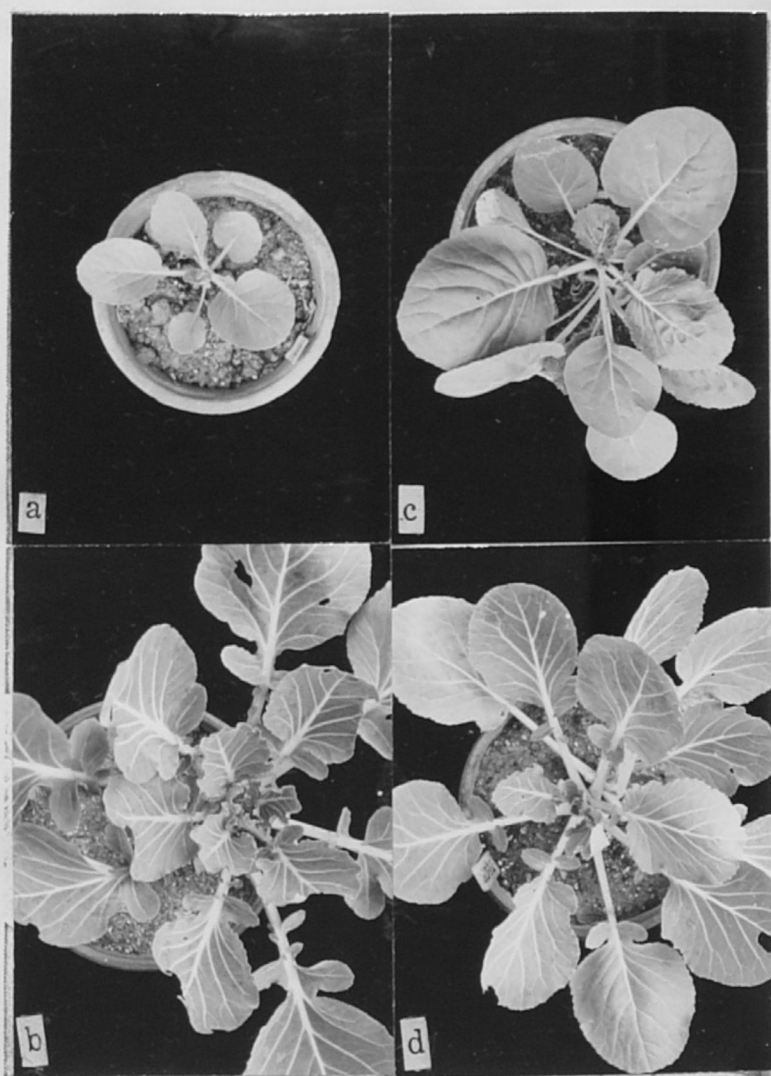


Fig. 18 . Hybrid plants obtained by test-tube culture of developing embryos which were formed in cultured ovary.

- Hybrid plantlet of Nikanme-taina x Succession which was transplanted from test tube.
- Hybrid plant of Nikanme-taina x Succession
- Hybrid plantlet of Nikanme-taina x Succession which was transplanted from test tube and which have two growth points.
- Hybrid plant of Nikanme-taina x Succession which have two growth points.



- e. Hybrid plantlet of Nozaki-hakusai x Nozaki-wase  
 f. Hybrid plant of Nozaki-hakusai x Nozaki-wase  
 g. Hybrid plantlet of Nozaki-hakusai x Nozaki-wase  
 which have two growth points.  
 h. Hybrid plant of Nozaki-hakusai x Nozaki-wase  
 which have two growth points.



i. Another type of hybrid of Kyoto-hakusai x Nakano-wase which has two growth points.



Fig. 19. Chromosome number of hybrid plants ( $2n=19$ ) in the cross between B. campestris and B. oleracea.

雑種でも、両親の  
中間を示した(図  
18 f, g, i)がこれ  
らの中では形態的  
に幾らかの変異が  
みられた。葉柄の  
ところは著しく

むれがみられ、  
葉の周辺のギ  
ザギザが少な  
いもの(図18  
f)から、葉  
全体の形が白  
菜に似ている  
もの(図18 g)  
までみられた。  
葉の緑は、す  
べの場合にお  
いても濃いキ  
ヤベツの形質



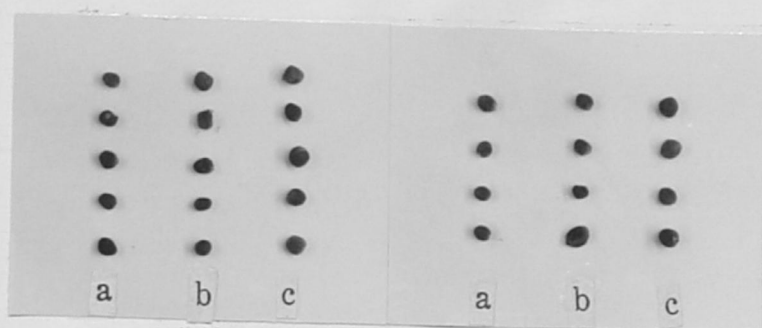


Fig. 20. Hybrid seeds obtained by ovary culture.

- 1a. Seeds of Nozaki-hakusai (control).
- 1b. Hybrid seeds of Nozaki-hakusai x Nozaki-wase.
- 1c. Seeds of Nozaki-wase (control).
- 2a. Seeds of Kyoto-hakusai (control).
- 2b. Hybrid seeds of Kyoto-hakusai x Nakano-wase.
- 2c. Seeds of Nakano-wase (control).

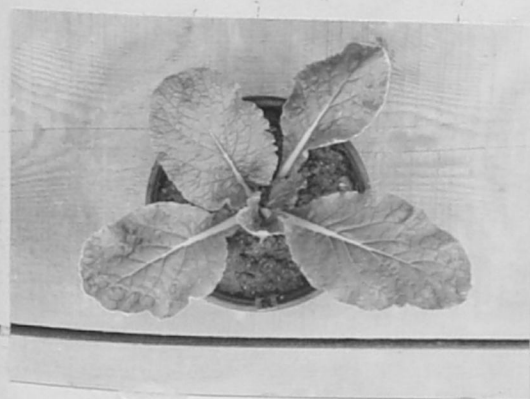


Fig. 21. Hybrid plant obtained from the seed in the cross of Nozaki-hakusai x Nozaki-wase.

を持ち、葉の厚さもキヤベツのよ  
うに厚かつた。

得られた植物体の根端を採り、その体細胞分裂を観察した結果、いずれもナプス型の染色体構成をもつ半

数体 ( $2n=19$ ) であつた (図19)。

野崎白菜 × 野崎早生の場合、特に鉢に移植した個体が生育し、成体までには存つた例数がすくなくつたのは、後の高温によるためと思われる。その結果、(1) 野崎白菜 × 中野早生の組合せから5粒、京都白菜 × 中野早生の組合せから4粒の交雑種子を得たのである (図20)。前者の野崎白菜 × 中野早生からの5粒のうち、1粒だけが発芽したのみ、後は2個体は枯死し、3個体が生長した。これ等は、いずれも同じ形態を示した。白菜とキャベツの中間というより、むしろ白菜に近い形態を示した (図21)。染色体は未だ観察し得ない。どのような染色体構成の雑種か不明である。

後者の京都白菜 × 中野早生から得られた4粒の種子は、いずれも不発芽であつた。

### (3) 交雑不適合性の生理学的研究

## (i) 子房の培養条件の検討

植物の組織培養や根などの器官の培養には古くから White (1963), 或いは Heller (Gautheret 1959) の培地が盛んに用いられてきたし, またこれ等を幾分修正した修正 White 或いは修正 Heller の培地も広く使用されてきた。また近年タニコの髓の組織培養により, 今までよりも生育のよい培地で, 無機塩の濃度も高い培地を造り出した (Murashige and Skoog 1962)。これらの無機塩の培地に添加される有機物としては, グリシン, サイアミン, ピリドキシン, ナイアシン, イノシトール, ビオチン等があるが, これらの添加物のうちサイアミンを欠くと, 長期間にわたっての培養が困難であるが, その他は植物の種類によつて生育に必要なものとはうご存しものがある (Gautheret 1959)。

これらの研究からは比較的無機塩の濃度の低い White の培地, 或いは無機塩濃度の高い Murashige and Skoog の培地等を用いて, Brassica の子房の人工培養にいずれが最も適しているか



を検討すると同時に、添加したアミノ酸、  
ビタミン類によつて種子形成の変化がみられ  
るかどうかと調べた。

糖濃度については、White, Nitsch, Murashige and  
Skoog の各培地はサッカロースの濃度が1リッ  
トル当り20g, 50g, 30gと定められて  
いるが、Brassicaの子房の人工培養におい  
どの糖濃度が適量であるか、また培養条件と  
しこの温度、或いは光の条件によつて種子形  
成に如何なる変化がみられるかを調べた。

次に今までのBrassicaの子房の培養では、交  
配後4日目のものを植え込んでいたが、ま  
れ以前、或いは以後についてこの種子形成に  
ついては未調査である。胚珠培養の成功例とみ  
ると、交配後4日から6日目のものの培養例  
が多い(中島1970)。Brassicaの子房の人工  
培養において、交配後のいろいろな時期に植  
物体から切り取つて、人工培養を行つた、ま  
の種子形成等について調査した。

## 材料および方法

実験に用いた材料は二倍体雪白体菜と同質  
4倍体野崎白菜<sup>2)</sup>、 $2x \times 2x$ と $4x \times 4x$ の交配と  
行なった。

培養基の無機塩の濃度の違いの実験については、  
これは、それぞれ White, Heller, Nitsch と Murashige and  
Skoog の培地を用いた。その塩濃度と種類につ  
いては表69に示した(表69)。糖濃度その他の  
の条件については今までのものと同条件で、  
基本培地に添加したアミノ酸、ビタミン類は  
今まで用いた Nitsch の培地を用いた。その他  
に、双子葉植物の組織培養全般については有効  
であると知られる Morel (Gautheret 1959) の有機物  
を2んかしたものと、その両者と合わせて添  
加した区を作った。その培地と添加した種類  
と量を表70に示した(表70)。

糖濃度の差異による種子形成の相違をみる  
実験には Nitsch の培地に蔗糖を1リットル当り  
10g, 30g, 50g, 70g と90g を添加して培地を調

Table 69. Composition of several solutions used for the ovary culture (mg/l)

Medium	Nitsch (1951)	White (1963)	Heller (1953)	Murashige and Skoog (1962)
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	500	300	-	-
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	125	-	-	170
$\text{KNO}_3$	125	80	-	1900
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	125	720	250	370
$\text{Na}_2\text{SO}_4$	-	200	-	-
$\text{KCl}$	-	65	750	-
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	-	16.5	125	-
$\text{NaNO}_3$	-	-	600	-
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	-	-	75	440
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	-	-	-	1650
$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$	-	2.5	-	-
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	-	-	1	-
Fe citrate	10	-	-	-
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5	3	1	8.6
$\text{H}_3\text{BO}_3$	0.5	1.5	1	6.2
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	3	7	0.1	22.3
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025	-	0.03	0.025
$\text{AlCl}_3$	-	-	0.03	-
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	-	-	0.03	-
$\text{KI}$	-	0.75	0.01	0.83
$\text{H}_2\text{SO}_4$	0.5ml	-	-	-
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.025	-	-	0.25
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	-	-	-	0.025
$\text{Na}_2\text{-EDTA}^*$	-	-	-	37.3
$\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}^*$	-	-	-	27.8

\* 5ml/l of a stock solution containing 5.57g  $\text{FeSO}_4$  and 7.4g  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$  per liter of  $\text{H}_2\text{O}$ .

Table 70. Compositions of the media used for the ovary culture

	1*	2	3	4
Nitsch (1951)	N-1	N-2	N-3	N-4
White (1963)	W-1	W-2	W-3	W-4
Heller (1953)	H-1	H-2	H-3	H-4
Murashige and Skoog (1962)	MS-1	MS-2	MS-3	MS-4

- \* 1): Basal medium only.  
 2): Basal medium plus thiamine 0.5mg, glycine 15mg, niacin 2.5mg and pyrdoxine 0.5mg (Modified White 1963).  
 3): Basal medium plus thiamine 1.0mg, biotin 0.01mg, myo-inositol 100mg and Ca pantothenate 1.0mg (Morel 1948).  
 4): Basal medium plus thiamine 1.0mg, glycine 15mg, niacin 2.5mg, pyrdoxine 0.5mg, biotin 0.01mg, myo-inositol 100mg and Ca pantothenate 1.0mg.

験に供した。

光と温度条件についての実験では、定温室で蛍光灯を用いて連続照明を行ない、室温に置いたものは自然日長と自然光の下で実験を行った。

子房を植えた各時期の違いによる種子形成

の相違の調査は、交配後1日目から順に日を追って10日目まで行なつた。

用いた基本培地はいずれも Nitsch のものである。

## 結 果

### 自然条件下における交雑結果

子房の人工培養を行なうための交配を行ない、植之込んだ以外のものは自然条件下に放置して、対照として種子稔性を調査した。その結果を表71に示す(表71)。表71には3つの対照区を示してあるが、NO.1は培養基組成の差についてこの対照区であり、NO.2は糖濃度と光の条件についてこの対照区であり、NO.3は植之込む時期による種子形成の相違をみるための対照区である。

表71のNO.1の培養基組成の差による種子形成の実験の対照区では、調査した菜の数は雪白体菜が6個体、野崎白菜の4倍体が4個体であった。種子稔性は26%および36.4%と倍が

Table 71. Results of crossing experiment under natural condition

Cross	No. of capsules examined	Av. capsule length (mm)	No. of seeds obtained	Seed set (%)	Seed germination (%)
N o . 1 .					
2x x 2x	6	36.0	11	7.6	100
4x x 4x	4	48.5	32	36.4	100
N o . 2 .					
2x x 2x	5	36.6	10	9.1	80.0
4x x 4x	4	42.0	30	34.1	93.3
N o . 3 .					
2x x 2x	6	55.3	144	96.0	96.5
4x x 4x	9	35.6	25	11.1	96.0

> 下。持て雪白体菜の稔性が要か下。しか  
 し得られた種子の発芽は良好で、いずれも100%  
 であつた。なお種子稔性の計算に用いた胎座  
 の数は調査した胎座数の平均で雪白体菜で22、  
 姫崎白菜で24と各々決めた。

表71のNO.2は糖濃度と光の条件を調べた  
 ときの対照区でNO.1と同じ傾向を示したが、  
 表71のNO.3の植之込ま時期による種子形成の  
 差異の対照区は、NO.1とNO.2の場合と異なる

リ2倍体の雪白体菜の場合は96.0%と非常に良く、4倍体の野崎白菜では逆に種子稔性が下って11.1%であった。得られた種子の発芽はいずれの場合においても良好であった。

### 植え込み時における子房の長さ

培養時における子房の長さを表72と表73に示す(表72, 表73)。表72のNO.1は、培養基組成の違いについての実験のもので、表72のNO.2は糖濃度と光の条件について実験に植え込んだものである。いずれの場合も10個体

Table 72. Average length of cultured ovaries

Cross	No. of ovaries examined	Av. length of ovary (mm)
No. 1.		
2x x 2x	10	23.3
4x x 4x	10	18.6
No. 2.		
2x x 2x	10	25.8
4x x 4x	10	17.2

の子房を測定し

たが、どちら

においても雪白

体菜の場合のよ

りが長く、4倍体

の野崎白菜の場

合より5mmから

8mm長かった

Table 73. Average length of cultured ovaries (mm)

Cross	Days after pollination	No. of ovaries examined	Av. length of ovary (mm)
2x x 2x	1	9	10.7
	2	10	17.5
	3	10	17.5
	4	10	25.3
	5	10	35.3
	6	10	37.4
	7	10	42.1
	8	10	54.4
	9	10	55.6
	10	10	55.0
4x x 4x	1	10	10.7
	2	10	12.6
	3	10	13.1
	4	10	19.4
	5	10	22.8
	6	10	26.6
	7	10	29.7
	8	10	33.3
	9	10	39.4
	10	10	38.2

表73は交

配後1日目  
から日と順  
に遡って10  
日目まで子  
房を植える  
んだときの  
長さとなし  
たものであ  
る。雪白体  
菜のオは、  
交配後1日

目から2日

目、3日目から4日目、4日目から5日目、  
7日目から8日目にかけて莢の全長が著しく  
増すが、8日目以後には莢の全長はほ  
んどなく、収穫期のものと変わらなかった。  
4倍体の野崎白菜のオは、雪白体菜のように  
著しい生長はなく順次生長と続け、8日目に  
達すると収穫時の莢の長さとならな



11 下。

### 培養基組成の違いによる種子形成

表70の培地組成の実験区に植之込んだ子房の種子形成等についての結果のうち、表74には雪白体菜、表75には4倍体野崎白菜についてのものとする(表74, 表75)。各組み合わせとも平均10個の子房を植之込んだ。收穫した莢の長さは2倍体の雪白体菜の方が、4倍体の野崎白菜よりも長く、培地組成による差異は認められなかった。得られた種子数とその発芽率についてみると、基本培地だけの培地組成においても、他の培地組成に較べてかなり良い種子形成がみられ、その種子の発芽率も良かった。添加された有機物の種類と濃度による種子形成の差異はなく、むしろ2倍体と4倍体との間において、種子形成の差異がみられた。

各培地組成について検討を行なうと、Nitschを基本培地としたものでは、基本培地だけの

Table 74. Effects of certain media on cultured ovaries in the cross of diploid *B. campestris* cv. Seppaku-taina

Medium	No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	Av. capsule length (mm)	Av. callus formation	No. of seeds obtained	No. of immature seeds	Seed set (%)	Seed germination (%)
N-1	10	10	37.6	-	18	3	8.2	94.4
N-2	10	10	41.3	-	18	8	8.2	66.7
N-3	10	9	27.9	-	2	1	1.0	50.0
N-4	10	10	31.2	-	11	4	5.0	100
Total	40	39	34.5	-	49	16	5.7	83.7
W-1	10	10	34.6	+	17	3	7.7	88.2
W-2	10	10	41.3	-	29	11	13.2	100
W-3	10	10	44.3	-	22	20	10.0	86.4
W-4	10	10	37.5	-	2	20	0.9	100
Total	40	40	39.4	-	70	54	8.2	92.9
H-1	10	10	41.8	-	17	33	7.7	76.5
H-2	10	10	44.0	-	12	31	5.5	83.3
H-3	10	10	41.8	-	10	32	4.5	80.0
H-4	10	10	37.3	-	7	21	3.2	57.1
Total	40	40	41.2	-	46	117	5.2	76.1
MS-1	10	10	38.7	-	6	18	2.7	50.0
MS-2	10	10	32.2	-	4	9	1.8	100
MS-3	10	10	34.1	-	6	4	2.7	30.0
MS-4	10	10	42.9	+	16	27	7.3	88.0
Total	40	40	38.6	-	32	58	3.6	71.9

1): Refer to Table 70.

Table 75. Effects of certain media on cultured ovaries in the cross of autotetraploid B. campestris cv. Nozakki-hakusai

Medium	No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	Av. capsule length (mm)	Av. callus formation	No. of seeds obtained	No. of immature seeds	Seed set (%)	Seed germination (%)
N-1	10	10	30.9	-	16	20	6.7	37.5
N-2	10	9	28.3	-	2	17	0.9	100
N-3	10	10	25.6	-	7	19	2.9	42.9
N-4	10	9	26.2	-	9	9	4.2	44.4
Total	40	38	27.9	-	34	65	3.7	44.1
W-1	10	9	27.8	-	7	25	3.2	85.7
W-2	10	9	31.1	-	8	20	3.7	75.0
W-3	10	10	31.9	-	7	33	2.9	85.7
W-4	10	10	29.5	-	5	30	2.1	80.0
Total	40	38	30.1	-	27	108	3.0	81.5
H-1	10	10	32.7	-	5	39	2.1	20.0
H-2	10	10	33.1	-	5	22	2.1	60.0
H-3	10	9	29.2	-	4	22	1.9	50.0
H-4	10	9	33.1	-	5	31	2.3	20.0
Total	40	38	32.0	-	19	114	2.1	36.8
MS-1	10	9	31.2	-	3	10	1.4	33.3
MS-2	10	10	31.3	-	13	13	5.4	69.2
MS-3	10	9	32.8	-	20	20	7.3	80.0
MS-4	10	9	35.1	-	14	25	6.5	50.0
Total	40	37	32.6	-	50	68	5.0	66.0

1): Refer to Table 70.

とき (N-1) が、2x, 4x の自殖とも種子形成は一番良く、次には2倍体の雪白体菜では white の有機物を添加したもの (N-2) が、4倍体の野崎白菜では N-4 が良かった。

white を基本培地としたときは、2倍体の雪白体菜の場合は white の有機物を添加したとき (W-2) 最高の種子稔性 (13.2%) がみられ、次は W-3 の Morel の有機物添加のときであった。基本培地だけの区 (W-1) でも 7.7% の種子稔性のみられ、white と Morel の有機物を混合して用いた実験区 (W-4) は最も低い種子稔性であった。4倍体野崎白菜においては、W-2 が最も良く、次いで W-1 があり、W-4 は最も種子稔性は低かった。

Heller を基本培地に用いたものは、雪白体菜の方の種子形成とその発芽率は、基本培地の場合 (H-1) が最も良く、種子の有機物を添加するにつれて低くなり H-4 が最も低くなった。これに対し4倍体の野崎白菜では、おりの実験区においても種子稔性は異なる

く2%前後を示した。

Murashige and Skoog と基本培地としたもののうち、雪白体菜の示は MS-1, MS-2, MS-3 と稔性が低く、種々の有機物を添加した MS-4 において 7.3% の種子形成がみられた。4倍体の野崎白菜では、基本培地だけの MS-1 が一番悪く、有機物の添加によつて種子形成は良くなつてきた。

対照区の種子稔性は、2倍体雪白体菜では 7.6%、4倍体野崎白菜では 36.4% であつた(表71)ので、雪白体菜では人工培養し方が、自然条件よりも良いとみられたが、4倍体の野崎白菜の示は自然条件よりも培養した子房の種子形成が著しく低くなつた。

糖濃度と光の種々の条件による種子形成の差異

培地に添加した糖濃度は、今まで用ゐてきた 50g/l を対照区として、10g, 30g, 70g と 90g とをそれぞれ 1 リットルあたり添加し

子房の人工培養における種子形成の程度を調査した。その結果を表76に示す(表76)。光などの条件については、300-500ルクスで $22 \pm 2^\circ\text{C}$  (N)を対照区として、暗黒下(D)、2000ルクス(L)と自然日長で $13^\circ\text{C}$ から $30^\circ\text{C}$ の室温(R)の条件について、種子形成の程度を調査した。結果を表77に示す(表77)。

糖濃度については、各実験区において平均10個の子房を植えた。莢の長さ、カルス形成については糖の濃度は関係がなように思えた。2倍体の雪白体菜のオが4倍体の野崎白菜よりも、種子形成は全体的によく、得られた種子はそれぞれ224粒と36粒であった。種子稔性については、雪白体菜のオでは糖濃度30g/lが最も良く、29.5%であり、次いで50g/lの22.7%であった。また10g/l取いは90g/lという低い或いは高い濃度においても種子稔性はみられ、特に高濃度においては50g/lのものと著しい差異はなかった。培養された子房に

Table 76. Effect of saccharose concentrations on cultured ovaries in the crosses of diploid B. campestris cv. Seppaku-taina and autotetraploid B. campestris cv. Nozaki-hakusai

Cross	Medium	No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	Av. capsule length (mm)	Av. callus formation	No. of seeds obtained	No. of immature seeds	Seed set (%)	Seed Germination (%)
2x x 2x	1	10	10	40.4	-	27	6	12.3	92.6
	2	10	10	44.9	-	65	5	29.5	93.5
	3	10	10	44.8	-	50	9	22.7	90.2
	4	10	10	44.0	-	39	15	17.7	100
	5	10	9	40.0	-	43	29	21.7	100
Total		50	49	42.8		224	64	20.8	96.4
4x x 4x	1	10	9	29.8	-	2	7	0.9	50.0
	2	10	9	32.6	-	8	22	3.7	75.0
	3	10	10	34.1	-	15	43	6.3	73.3
	4	10	9	32.4	-	10	22	4.6	60.0
	5	10	10	33.0	-	2	46	0.4	50.0
Total		50	47	32.4		37	140	3.3	67.6

1, 2, 3, 4 and 5: each medium contains 10g/l, 30g/l, 50g/l, 70g/l and 90g/l saccharose respectively.

Table 77. Effect of physical factors on cultured ovaries in the crosses of diploid *B. campestris* cv. Seppaku-taina and autotetraploid *B. campestris* cv. Nozaki-hakusai

Cross	Medium	No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	Av. capsule length (mm)	Av. callus formation	No. of seeds obtained	No. of immature seeds	Seed set (%)	Seed germination (%)
2x x 2x	N	10	10	45.7	-	64	14	29.1	100
	D	10	10	42.2	-	54	12	24.5	78.0
	R	10	10	49.7	-	45	15	20.5	75.6
	L	10	10	46.0	-	37	33	16.8	75.5
Total		40	40	45.9		200	74	22.7	84.0
4x x 4x	N	10	9	32.2	-	13	33	6.0	53.8
	D	10	7	30.9	-	2	19	1.2	0.0
	R	10	10	32.5	-	9	24	3.8	55.6
	L	10	10	31.8	-	4	25	1.7	50.0
Total		40	36	31.9		28	101	3.2	50.0

1), N: 300-500 luxes continuous illumination by fluorescent lamp at 22±2°C  
D: Continuous darkness at 22±2°C.  
R: Room temperature ranged from 13°C to 30°C and 300 luxes at maximum.  
L: 2000 luxes continuous illumination by fluorescent lamp at 22±2°C.



おける種子形成は、対照及の自然条件のもの  
 (9.1%)よりも、いずれも良い種子形成がみ  
 られた。得た種子の発芽率は自然条件下のもの  
 のとほぼ同じであつた(表7, NO2)。野崎  
 白菜の種子稔性は、雪白体菜の場合に較べて  
 全般的に低かつたが、50g/2のときが最も良く、  
 70g/2, 30g/2の順に続き、10g/2と90g/2には  
 は僅かに0.9%と0.4%の種子稔性を示した。  
 対照及に較べて著しく低い種子稔性であつた。  
 得た種子の発芽率は最高75%であり、自然条  
 件のものより幾分低かつた。

光や温度条件に關しては、菜の長さ等には  
 切り口のカルス形成への影響は無く、2倍体  
 と4倍体との間に差異がみられた。得た種  
 子は2倍体が200粒、4倍体が28粒であつ  
 た。雪白体菜の種子稔性は300~500ルクスの  
 条件のときが最も良く、次いで暗黒条件下  
 であり、室内の自然光に次いで2000ルクス  
 の強い光の順に存り、2000ルクスは種子形  
 成に有効でなかつた。こゝろ得られた種子稔

性は、対照区のものより良く、その発芽率も対照の自然条件のものと同様であった(表7, NO. 2)。野崎白菜の種子形成については、全般的に低かったが、その中でも300~500ルクスの光の条件が最も良く、室内条件のときがこれに続き、2000ルクスの光条件は有効がないと思えた。自然条件下における対照実験区と較べると、種子稔性は著しく低い値を示した。

### 子房の植之込と時期による種子形成の差異

交配後1日目から10日目にはたつて、順次日を追って子房を植之込み、種子形成等について調査した結果を表8に示す(表8)。各区平均10個の子房を植之込み、收穫期における莢の長さを見れば、雪白体菜、野崎白菜のいずれにおいても交配後9日目までのものは、培養された時から莢の生長が認められ、それ以後に存ると植之込ごからの莢の

Table 78. Interaction between seed formation and date of ovary culture after pollination in the crosses of diploid *B. campestris* cv. Seppaku-taina and autotetraploid *B. campestris* cv. Nozaki-hakusai

	Days after pollination	No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	Average capsule length (mm)	Average callus formation	No. of seeds obtained	No. of immature seeds	Seed set (%)	Seed germination (%)
2x x 2x	1	10	10	25.9	-	9	11	5.0	100
	2	10	10	32.2	-	44	4	20.0	100
	3	10	10	32.5	-	25	11	11.4	92.0
	4	10	10	41.2	-	70	11	31.8	100
	5	10	10	46.8	-	58	22	26.4	96.6
	6	10	10	43.3	-	74	31	33.6	95.9
	7	10	10	49.1	-	113	17	51.4	96.5
	8	10	10	57.4	-	130	16	59.1	95.4
	9	10	10	56.4	-	131	3	59.5	95.1
	10	10	9	55.7	-	164	22	32.8	91.5
Total		100	99	44.1		818	148	37.6	95.1
4x x 4x	1	10	10	13.4	-	5	4	1.7	60.0
	2	10	10	17.5	-	3	4	1.3	100
	3	10	9	18.1	-	1	2	0.4	100
	4	10	10	23.6	-	2	19	0.8	0.0
	5	10	10	26.4	-	7	8	2.9	28.6
	6	10	9	30.7	-	7	28	3.2	57.1
	7	10	9	34.0	-	20	27	9.3	85.0
	8	10	9	35.5	-	27	39	11.3	66.7
	9	10	8	40.5	-	32	29	16.7	81.3
	10	10	9	38.3	-	30	29	13.9	73.3
Total		100	94	27.8		134	189	5.9	71.6

生長が止まつてしまつてゐた。これは自然条件下における生長と似てゐた(表ク3)。

菜の生長の割合は、交配すればから植之込まれるまでの時期の短い方が著しかつた。特に雪自体菜には、これは約15mmの生長のみであつた。カラスの形成はほとんど必ず此の実験及びこれにも認められなかつた。雪自体菜の種子形成については、818粒得られたがこれは大体1次直線を増加してゐた。交配後7日目になると50%以上の種子稔性であつた。また交配後1日目に植之込まれた子房には、これに9粒(5%)の種子を得た。その種子の発芽率は、いずれも良く、90%以上を示した。

野崎白菜の種子形成については、全般的に悪く、種子稔性は16.4%と低かつた。交配後8日目以後に植之込んだものでは、自然条件下のものに越えるものもあつた。交配後1日目に植之込んだものの種子形成の示が、2日目、3日目、或いは4日目の種子形成より良く、5日目以後には順次種子稔性は上

昇した。

(ii) 2倍体 Brassica campestris L.

ssp. chinensis (L.) Makino と同質

4倍体 Brassica campestris L. ssp.

pekinensis (Lour.) Olsson の間の

交雑不適合性における遊離ア

ミノ酸の消長

ニニズは Brassica における  $2x$  と  $4x$  の交配種子の崩壊の過程における遊離アミノ酸の消長と、これと組織学的に観察された胚発生の異常との時間的關係について調べた。

材料および方法

この実験に用いた材料は2倍体=食目体菜と同質4倍体4-1白菜Z, 茲れ茲れ  $2x \times 2x$ ,  $2x \times 4x$ ,  $4x \times 4x$  と  $4x \times 2x$  の交配を行なつた。

遊離アミノ酸の消長を調べる研究は、交配後9日目から12日目に胚発生の異常が著しく出現する結果に基づいて(A-(1)-(i)参考)、交配後9日目、12日目と15日目の3区において調査した。その方法は交配後9日目、12日目と15日目の各莢を植物体から切り取り、莢から莢達途上にある未熟種子を取り出し、直ちに95%熱エタールで固定した(西山市三編 1961)。その後石炭粉を加えて乳鉢ですつと、遊離アミノ酸の抽出を行なった。抽出に用いた各交配組合せの胚珠の生体量は500mgから1000mgで、その胚珠数は数えられたが、交配に用いた花数は80花から150花であった。

遊離アミノ酸の抽出液は濃縮後、各交配組合せの濃度が一定量になるように調整して、その一定量の液をペーパークロマトグラフ法によつて分析した。用いた濾紙は東洋濾紙NO.51(40cm×40cm)であり、その一端にドライヤーを用いて点滴した。添加した試料を乾燥

した後、濾紙を円筒形にし、大型シャーシの中に入れて、外側をガラスの器でおおって、1~2時間後に展開液の蒸気でガラス器内を満たしてから展開を行なった(柴田村治1957)。15から18時間室温で展開した後、即ち溶媒が原点から約23cm上昇したとき展開を止め、風乾した。一次元の溶媒にはメチノール:氷酢酸:水(4:1:2)を用い、二次元には水飽和のフェノールをアンモニアガスの中を用いた。なお特定のアミノ酸を分けるのに一次元には水飽和コリガン、二次元には水飽和ベンザルピロコロールとメチノールを用い、下降法を使用した(Consider et al. 1944)。

展開したクロマトグラムの着色には、水飽和のメチノールに0.2%のニヒドリンを溶かしたものを用以て、撒布後110°C 10分間で染色させた。定量は着色後濾紙からスポットを切り取り、細片して、50%エタノールで1時間から4時間抽出して室温で抽出し、プロリンの440 m $\mu$ 以外は550 m $\mu$ の吸光度

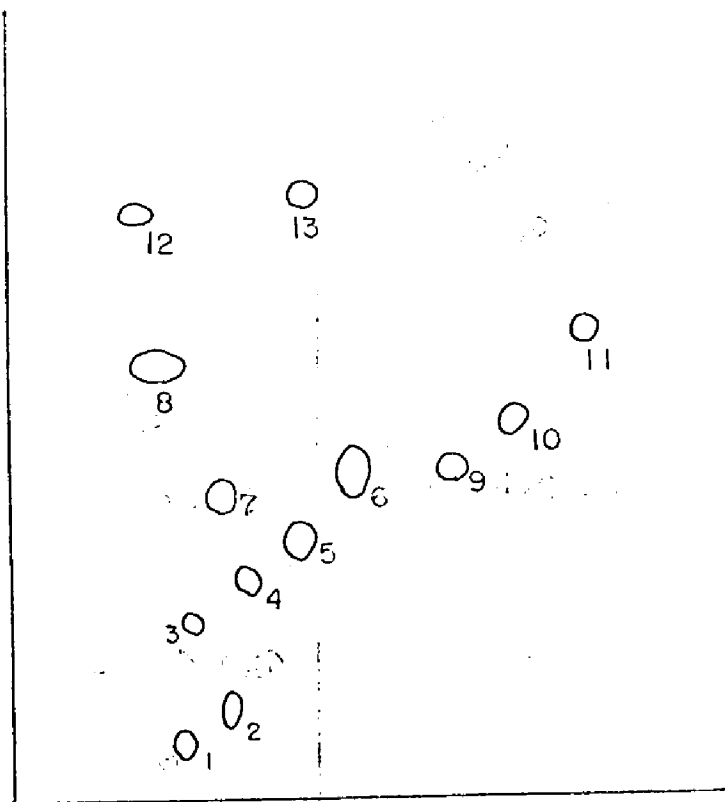
を測定した。いずれのアミノ酸の定量的場合もブランクと対照とした(日本化学会誌 1957)。測定に用いた装置は島津の分光光度計である。

## 結 果

アミノ酸の標準試薬の混合液を原点につけて二次エレクトロトグラフを行い、標準のR<sub>f</sub>の値をあらかじめ調べた。実験材料を検査された総2の遊離アミノ酸とその名称を図22に示す(図22)。

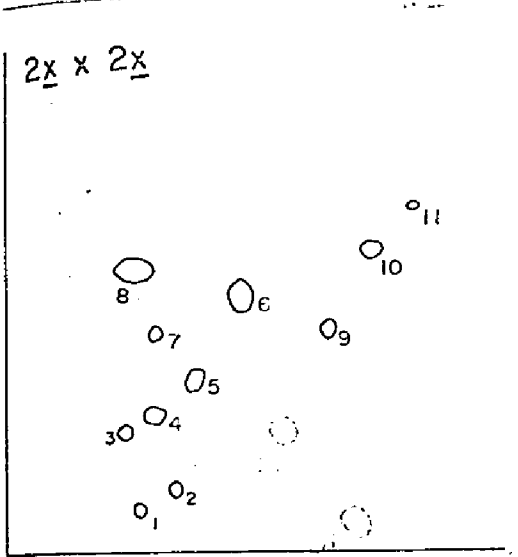
交配後9日目と12日目の各組合せにおける遊離アミノ酸の定性と2x x 4xの15日目のものの定性を模式的に図23に示す。図23-1は2x x 2xと4x x 4xの9日目と12日目のものを示し、図23-2と23-3には、2x x 4xの9日目、12日目と15日目および4x x 2xの9日目と12日目を示す(図23-1, 23-2, 23-3)。図23-1に示すように、2x x 2xと4x x 4xの9日目



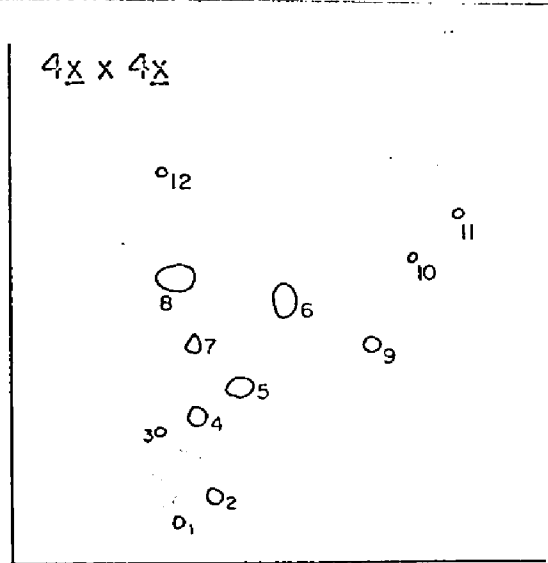
Phenol - water (NH<sub>3</sub>)BUOH: AcOH: H<sub>2</sub>O (4:1:2)

- 1, Asparatic acid. 2, Glutamic acid.  
 3, Serine. 4, Glycine. 5, Threonine.  
 6, Alanine. 7, Asparagine. 8, Histidine.  
 9, Tyrosine. 10, Valine and Methionine.  
 11, Leucine. 12, Arginine. 13, Proline.

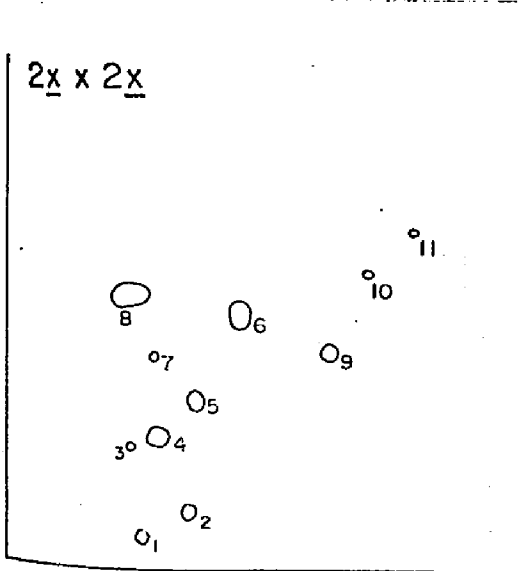
Fig. 22. Schematic chromatogram detecting free amino acids in immature ovule of Brassica.



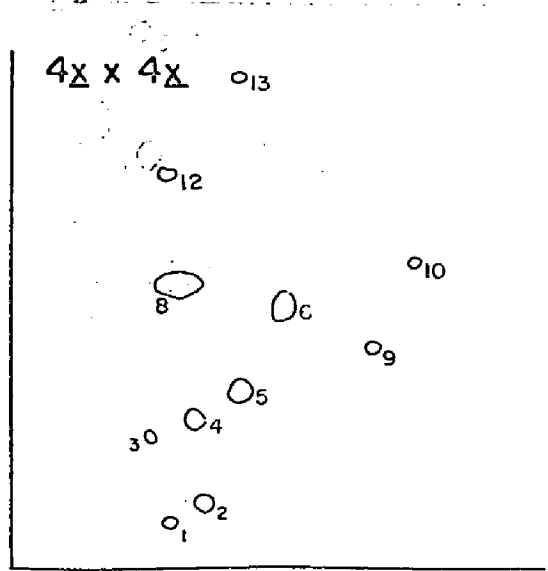
9 Days after pollination



9 Days after pollination



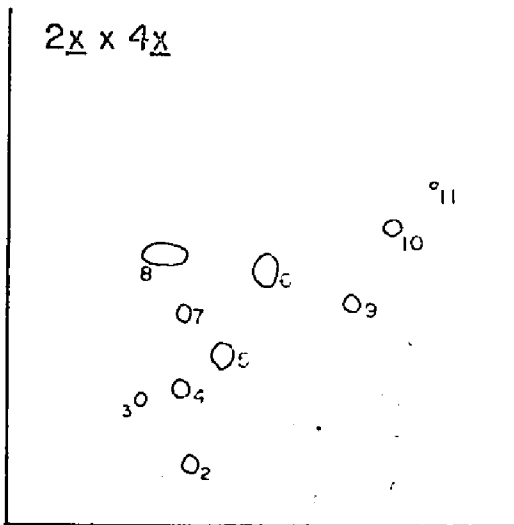
12 Days after pollination



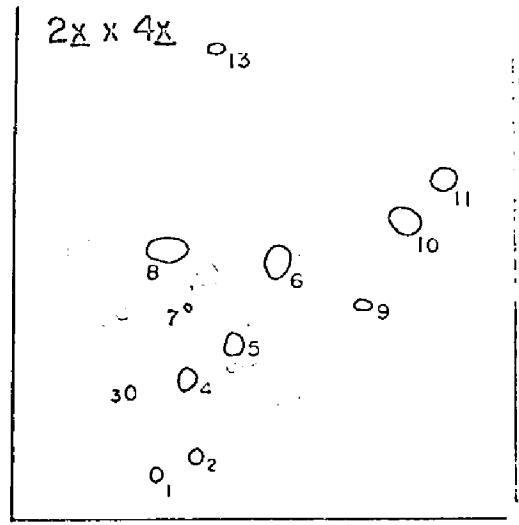
12 Days after pollination

Fig. 23-1. Schematic chromatogram of free amino acids at 9 and 12 days after pollination in the crosses of  $2\underline{x} \times 2\underline{x}$  and  $4\underline{x} \times 4\underline{x}$ .

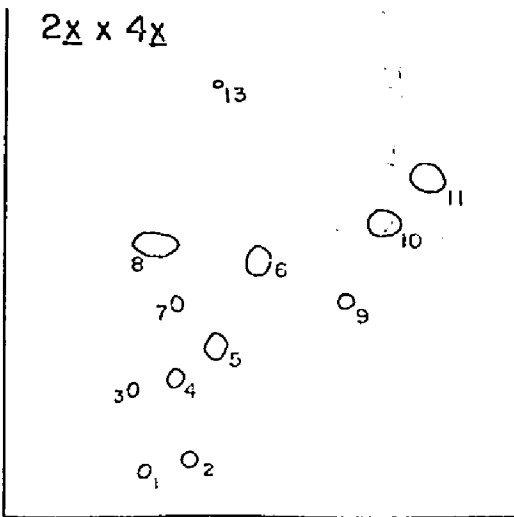
254.



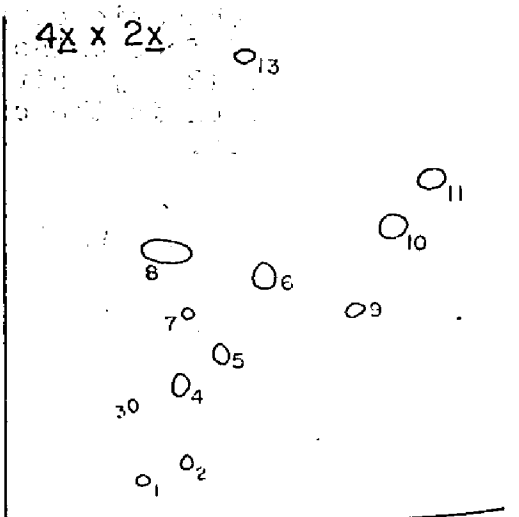
9 Days after pollination



15 Days after pollination

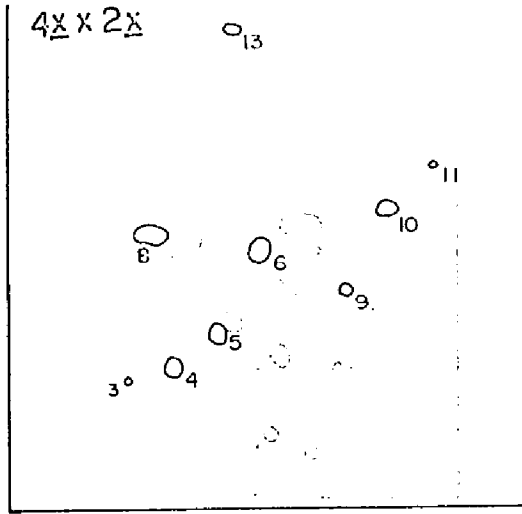


12 Days after pollination



9 Days after pollination

Fig. 23-2. Schematic chromatogram of free amino acids at 9, 12 and 15 days after pollination in the crosses of  $2x \times 4x$  and  $4x \times 2x$ .



12 Days after pollination

Fig. 23-3. Schematic chromatogram of free amino acids at 12 days after pollination in the cross of  $4x \times 2x$ .

と12日目にはあつて著しい差異はみられなかったが、 $2x \times 2x$ にはあつては試料として添加した量では、アロギン(12)の点が検

出されなかった。

$4x \times 4x$ では交配後

12日目になるとプロ

ロギン(13)の点

が検出された。いずれのアミノ酸にはあつても交配後9日目と12日目にはあつて、量的な著しい差異のみられるものはなかった。 $2x \times 4x$ と $4x \times 2x$ にはあつては、いずれにはあつても交配後9日目と12日目、或いは $2x \times 4x$ の15日目と日を追うことによつて、アミノ酸の量的な差異が現われた。 $2x \times 4x$ では、交配後12日目と15日目にはあつてプロロギン(13)が出現した。また、4オニンとバアリン(10)とロイニン(11)

に関しては、9日目から12日目になると著しい増加がみられ、これは15日目になっても継続して下。その他のアミノ酸についてはこの量的な変化は余りみられなかった。4x x 2x においては、9日目と12日目の比がほぼ2もプロリン(13)が出現した。またメチオニンとバアリン(10)とロイシン(11)については、9日目において多量検出され、2x x 4x の12日目あるいは15日目のものと同じ程度であったが、12日目になると減少してしまった。ここには他のアミノ酸についても量的に減少し、検出されなかったものもみられた。

定性的に調べた遊離アミノ酸検出に用いた展開液では、交配後の日数によって量的に変化したメチオニンとバアリン(10)とロイシン(11)の点のうち、メチオニンはバアリンと、ロイシンはイソロイシンとほぼ同じRfの値を持つていることから、これらこれらのアミノ酸の分離と行なうためには他の展開液と展開液を用いて、メチオニン、バアリンとロイシン

とイソロイミンの同定を行なつた結果、 $\times 4$ オニの点にはバアリンを含ま、ロイミンの点にはイソロイミンを含まないことが分つた。即ち(10)の点は $\times 4$ オニとバアリンの混合物として出現し、(11)の点はロイミン単独の点であつた。

定性についでの研究では、 $2x \times 2x$ 、 $4x \times 4x$ と $4x \times 2x$ では交配後9日目と12日目を調べ、 $2x \times 4x$ では15日目までを調べたが、定量にあつたのは $2x \times 2x$ と $4x \times 4x$ の15日目の定量も行なつた。なお $4x \times 2x$ の15日目の胚珠は枯死して11日、褐変して11日たつて調査が出来なかつた。

その結果、量的な変化のはつきりみられる $\times 4$ オニとバアリン(10)とロイミンについでの結果を表24に示した(表24)。破線と記号の記入して11日たつたものは定性のときと比べると程度程度の点として認められたが、量的には測定出来なかつたものを示して11る。 $2x \times 2x$ と $4x \times 4x$ には11日は、交配後9日目から15日目になるに従つて $\times 4$ オニとバアリンの量的変化はほと

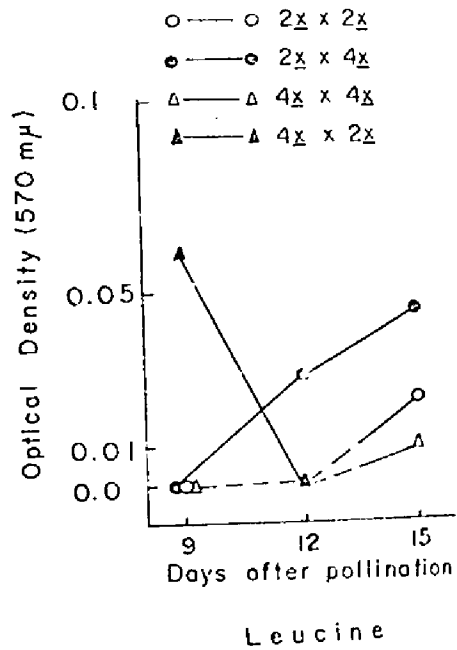
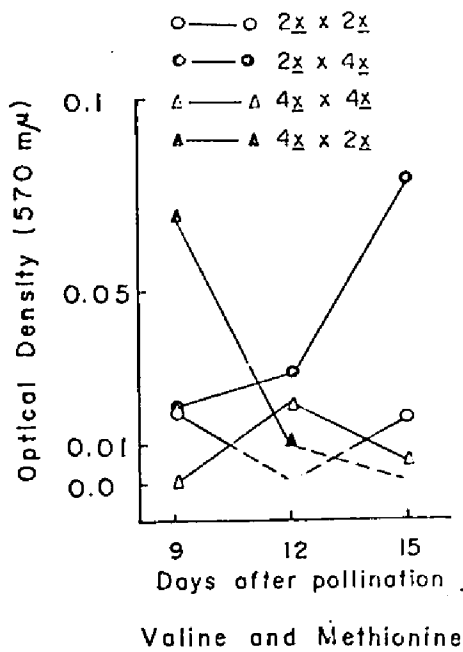


Fig. 24. Quantitative analysis of chromatogram of valine and methionine, and leucine at certain days after pollination.

して認められなかったが、 $2x \times 4x$  と  $4x \times 2x$  には  
 2は、対照的も差異があった。即ち  $2x \times 4x$  2  
 は9日目から15日目にかけてこれらのアミノ酸は順次増加  
 するが、 $4x \times 2x$  2は9日目には最も高濃  
 度で存在し、 $2x \times 4x$  の15日目に相当して11  
 2はその後急速に消失した。ロイニニトフ  
 112みても、同じような傾向をもつて112、

$2x \times 2x$  と  $4x \times 4x$  では余り量的変化がなかったのに対し、 $2x \times 4x$  では9日目にはほとんど認められなかったのに、12日目、15日目と日が進むにつれて、著しく量の増大がみられた。

$4x \times 2x$  では9日目に多量存在したのが、日を追うに従って著しく減少を示した。

#### (4) 考察および論議

##### (i) 胚発生学的研究

胚発生学的研究は大きく2つに分けられる。1つは自然条件下における観察であり、1つは人工的に培養したときの種子形成とその発達過程の観察である。

##### 自然条件下における胚発生

Brassica campestris L. ssp. pekinensis (Lour.) Olsson の同質4倍体 ( $4x=40$ ) と2倍体 B. campestris L. ssp. chinensis (L.) Makino ( $2x=20$ ) の正逆交雑が成功しないのは、受精した胚珠が発生の初期に死滅することによって起こる。この致命的な



胚珠中の組織学的変化は、正逆交雑にはおいて、異なつてゐる。2x(♀) x 4x(♂) における種子崩壊の最初の徴候は、交配後9日目には、胚乳の細胞に多数の空胞が出現することである。この空胞化は、純粋雑種の胚乳の生理学的な異常を引き起こすようである。純粋212日目には胚乳の空胞化が著しくなると共に核の崩壊が起つた。著しい核の崩壊をまぬかれ巨細胞では、15日目から18、21日目の間に巨大核の形成或は染色質顆粒の凝集などが見られ、胚乳の膜形成はついに起らなかつた。また胚の発達も通常球型或は、まれには"flat top"型の段階で止まつてしまつた。

4x(♀) x 2x(♂) の交雑では、雑種の胚乳は正常な4/4構成の胚乳よりも1/4/4構成の胚乳形成になつてゐる。交配後6日目には胚乳の膜形成が始まるが、胚乳自体の量が少く、しかし胚乳の退化は交配後12日目になつて始まる。その時期には、胚珠の中には胚乳が見当らなもので、しかも胚だけが残存してゐるものが

多数観察された。次の時期には胚珠は空になり、内皮も退化を始めるのがみられる。

正交交雑の胚の生育はその両親の胚の発育と初期においてはおなじであるが、交配後9日から12日目になると生育は止まってしまう。これは胚自体に原因があるのではなく、胚乳の異常な発育によって引き起こされるものであろう。

Lilium と Hyacinthus との胚の発生において、胚乳核の染色体切斷が雑種では頻繁に、自家稔性の種の交配にあつても時々出現して、胚乳の退化と胚の消失とをともたうること報告されている (Brock 1954a, b, 1955)。 Avena strigosa ( $2n=14$ ) x A. fatua ( $2n=42$ ) の交雑では、胚乳核の体細胞分裂の異常又は染色質の大きな固まりの形成による胚珠の退化が Kihara and Nishiyama (1932) によつて報告された。また Triticum の正交交雑 (Wakakuwa 1934, <sup>Boyes and</sup> Thompson 1937) と Aegilops の正交交雑においても同じような胚乳の異常が報告されている (Katayama 1933)。 Hordeum jubatum

( $2n=28$ ) x Secale cereale ( $2n=14$ ) の交雑の胚乳で、鉄鉤鈴形 (dumb-bell-shape) の核を具は高倍数性の核の出現を Cooper and Brink (1944) は報告している。ここに行なつた Brassica の観察では、上述のような種の胚乳核の異常は、いずれの正逆交雑においても、退化の最初の段階では見られなかつた。

興味あることには、 $2x \times 4x$  では 3 倍体の雑種が得られなかつたが、 $4x \times 2x$  では少数の 3 倍体雑種が得られた。 $4x \times 2x$  では胚乳の発達は貧弱であるが、その発達は致命的と思われる異常があるで、初期の胚乳の退化から免れ胚珠から 3 倍体雑種を形成するものと考えられる。専ら Avena の  $6x \times 2x$  の交雑 (Kihara and Nishiyama 1932) や Raphanus の  $4x \times 2x$  の交雑 (Inomata 1970) では、同じような胚乳の発達過程が観察されている。そして低い稔性で  $F_1$  の雑種種子が得られた。ここに行なつた  $4x \times 2x$  の交雑では、稀に  $F_1$  雑種の種子が得られたが、 $4x \times 4x$  で得られるものと同じ大きさのものがあった。

(表 6, 7)。

Brink and Cooper によつて報告された胚嚢に接して母体組織の異常増殖の為に種子の胚発生の途中で崩壊が起つて、不稔種子に存する "somatoplastic sterility" と呼ばれる現象は、

Lycopersicon pimpinellifolium (Cooper and Brink 1945)

の 2 倍体と 4 倍体との正逆交雑や、Medicago

(Brink and Cooper 1939), Primula (Woodel 1960a, b) の種

間雑種においても観察される。また Datura

(Satina et al. 1950, Sansome et al. 1942) の或る交雑

では胚珠内に腫瘍のような出来物、これが胚嚢一

杯に広がりその結果不稔種子に存するものと報

告されている。ここで行なつた Brassica の交雑

では、胚嚢に接して母体組織の内皮の異常増

殖は正逆交雑とその両親の交配のいずれにも

認められなかった。

Avena strigosa ( $2n=14$ ) と A. fatua ( $2n=42$ ) の交雑で、

卵細胞はそのいずれの両親の自殖よりも急速

に分裂することが Kihara and Nishiyama (1932) によ

つて報告されている。そして胚乳もまた初期

から急速に増大してくる。これが次の段階において異常な核分裂や胚乳の崩壊を引き起こし、胚珠は空になつてしまふ。更に *A. fatua* x *A. strigosa* の交雑では、胚の細胞分裂は遅れ、胚乳の生育もまた非常に貧弱であるが、膜形成は他の交雑組合せよりも早く起る。その結果出来る種子は通常その両親の自殖したもののよりも小さくなる。Kihara and Nishiyama の考へに従えば、雄の配偶子が雌のそれよりも高い「倍数性を持つて」るときには過剰の刺激力 (stimulative strength) が受精した卵や極核の体細胞分裂を始動させる。その結果胚乳や胚の核分裂が異常な速度で起るようになる。一方雄の配偶子が雌のそれよりも低い「倍数性を持つて」場合は、雄の核の "stimulative strength" が小さいので、胚や胚乳の生育が抑えられてしまふ。*Brassica* の正逆交雑においては、*Avena* においてみられたと同じ現象が、はつきりと交配後6日目の胚乳の核分裂とその发育速度から分かつた (図3)。しかしながら胚の発達にはあつ

これはどのような傾向はほとんど認められなかつた。9日目の胚乳の発育の差異は、共に胚乳の異常な発達によつて影響を受けた二次的なものと考えられる。

緒言に挙げた文献以外にも種間雑種又は染色体の異なる倍數性間の雑種の若し胚珠の崩壊の報告は多数みられる。この不稔現象は、被子植物が重複受精を行なうことと密接な関係がある。そして更に正逆交雑において雑種種子の出来る交雑は種によつて異なるので、これを記すと下記の如くなる。

$2x(\text{♀}) \times 4x(\text{♂})$	$4x(\text{♀}) \times 2x(\text{♂})$	例
+	+	<u>Spinacea</u> , <u>Beta</u> ,
+	-	<u>Oenothera</u> ,
-	+	<u>Avena</u> , <u>Raphanus</u> ,
-	-	<u>Brassica</u> (with aa genomes), <u>Oryza</u> , <u>Capsium</u> ,

+ 成功, - 不成功

これらの事象から、交雑種子の発達又は組織学的な差異は両親の染色体関係の不均衡や異なるゲノム構成による対応の差によつて起るようである。これらのことを考

慮すると、交雑種子の崩壊には1つ又は2個のゲノムが重要な役割をしていると思われる。極核の受精においては2個の雌性のゲノムと1個の雄性のゲノムが融合し、この割合が胚乳の均衡のとれた機能によって必要なものと考えられる。もしもこの2:1の割合が変わると胚乳の健全な機能は失われ、胚乳の異常な発達が起こってくるのである。

### 人工培養による胚発生

人工培養では、胚珠の培養と子房の培養を行なった。胚珠の人工培養ではどの培地組成からも生育可能な種子は得られなかった。IAA, カイネチン, ジベレリン, トマトジューズ, イースト抽出物等の効果については明らかにはできなかった。生育可能な種子が全く得られなかったのは、Brassicaの胚珠培養において培養基組成の問題と技術的な問題とが、全く未解決であることを意味する。

培養基に関しては、Gynandropis gynandra L. と Impatiens balsamina L. の胚珠培養で発芽種子が得

られているし (Chopra and Sabharwal 1963), また Anthum graveolens L. (Johri and Sehgal 1963) と Brassica (Inomata 1963) の子房の培養から芽種子が得られている。明らかに培養胚珠の栄養要求性は高等植物の種によつて異なる。 B. oleracea においては、胚珠の培養の時に1%の塩化カルシウムで胚珠を処理してから人工培養に拗して、75粒中2粒の芽種子を得ている (Kameya et al. 1966)。そこで用いた白菜と千一フ白菜にこのような処理を施せば生育可能な種子が得られるかもしれない。胚珠の培養技術によつていえば、胚珠が胚柄から取られて培養基の上に置かれるので、好ましくないと生理的要因が働くかもしれない (中島、松本 1969)。自然条件下では、胚珠は子房の中で胚柄を通して栄養を供給されているが、人工培養下では、栄養分は必ずしも胚柄から供給されるとは限らず、取るものは胚珠の表面から供給されることになる。このようなことが人工培養の不成功の原因の一つになつてい



ることも考えられる。

Capsells-Bursa-pastoris の in vitro における胚培養  
 においては、自然条件に較べて栄養が過剰な  
 り、変異が多く、分化が遅れてくる。そして  
 培養した胚では形態的な異常もみられる  
 (Monnier 1968)。そこで行なった研究においては  
 異常な胚や分化の遅れた胚、或は異常な胚柄  
 が観察された。しかしながらこれらの異常は  
 生長調整物質によってもたらされたものな  
 か、培地に加えた他の栄養物によってもたら  
 されたものなのか、或はまた栄養初期の人工  
 培養によるものかは決定出来なかった。

子房の人工培養を行なったものの胚発生に  
 は、胚珠の人工培養のように全く発達しない  
 ものだけでなく、種々の段階のものを観察し  
 た。

Datura stramonium の球型胚は "heart" 型の幼  
 胚を胚珠から無菌的に取り出して、人工培地  
 上で生育させるとき、高圧滅菌をしなかつた  
 ナットミルクを培地に添加すると幼胚の着し

11 生育がみられ、新しい個体をつくることか  
 出来る。また高圧滅菌したココナットミルク  
 と添加した培地でも、或いはビタミン類だけ  
 を添加しても、胚の発達程度に種々の段階が  
 みられ、同程度発達したもののでも形態的な差  
 異がみられる (Van Overbeek et al. 1941)。また

Brassica oleracea (♀) × B. campestris (♂) の交配では  
 通常雑種が得られる。この場合、幼胚の形  
 成は始まるが、やがて退化してしまふ。胚の  
 発達状態を調べてみると、交配後30日目にな  
 っても、発育の途中にあり、奇型を呈してゐる  
 (Nishi et al. 1959)。こゝで行なつた Brassica の人  
 工培養した子房の観察でも胚柄の異常 (図6c  
 ), 分化に入るべき球型胚での細胞分裂の継  
 続 (図6d), 子葉部位の異常発達 (図6u),  
 奇型胚の形成 (図6e, p) 等の異常が観察され  
 たが、これらの異常は観察した胚の数に較べ  
 れば少なかった。最もふつうに観察されたの  
 は、奇型や異常ではなく、球型胚は "heart"  
 型胚での発達の停止であつた。

胚乳の発達に關していへば、胚珠中には全く存在しないもの、崩壊が起つて僅かに残存するもの、種々の異常を呈するもの等がみられた。胚乳の膜形成についてみれば、"heart"型或は"torpedo"型の胚をもつ胚珠であるにも拘らず、胚乳が全体的に未だ膜形成を起してないもの、其の逆に胚は未だ発達の球型であるにも拘らず、胚乳の膜形成は既に全周にみられるもの(図6b), 或いは胚が豊富でないのに胚乳の膜形成だけが、全面的に観察されるものなどが観察された。自然条件下における胚珠では、胚乳の膜形成は胚が球型から"heart"型に分化するときに、胚の周辺部から始まるが、人工培養のものでは、胚と胚乳の発達がちぐはぐのものが見られた。人工培養で見られる胚乳の種々の異常は、自然条件下の $2x \times 4x$ で出現するものに似ていた。即ち胚乳の空胞化と著しい巨大核の出現(図6c, d, s, v, x), 核の崩壊とその偏在(図6e, m, o, s, v)等がある。 $2x \times 4x$ の胚乳に出現した=

此等の異常は  $4x \times 2x$  では観察されず、自然条件下でみられるように染色体不良に伴う消失が観察されるに過ぎない (図 6g)。  $4x \times 2x$  において交雑種子の得難いのは、胚乳の異常によるのではなく、胚乳の染色体不良に伴って胚の発達が停止するためと考えられる。  $2x \times 2x$  では胚乳の異常は観察されなかったが、  $4x \times 4x$  では、交配後 12 日目の  $2x \times 4x$  に観察されたような異常 (図 6h, l) や、子房の人工培養でみられたような異常 (図 6o, v)、または "basal endosperm" の崩壊 (図 6l)、などが観察された。これらのことから  $2x \times 4x$  の場合と同じように、胚乳の崩壊が  $4x \times 4x$  の不稔現象に関係していることが分かった。このような胚乳の異常に伴う不稔種子形成は Brassica の他に Lilium と Hyacinthus においても報告されている (Brock 1954a, b, 1955)。またエニハク (Kihara and Nishiyama 1932)、オオムギ (Cooper and Brink 1944)、ホトケトケ (Wakakuwa 1934) の雑種においても、胚乳核分裂の異常が詳細に記述されている。

ココナツトミロウの添加培地から2粒の交雑種子( $2x \times 4x$ )が得られ、いずれも生育して、雑種固有の葉色体積成と形態的特徴をもつ植物がえられた(Inomata 1968)。しかし、ここで行なった組織学的な観察においては、胚乳に膜形成はまったくみられず、胚乳はいずれも粒々の異常を呈してゐた。このことから子房の人工培養によつて、 $2x \times 4x$ の交雑種子を容易に得ることは現在の技術をもつてしては依然として困難である。

Papaverの胚珠の人工培養では、培地には IAA とカイネチンを添加すると、胚の発達が良くなり、自然条件よりも良い発育がみられる(Maheshwari 1958)。また Anthurumの子房の人工培養でも IAA とジベレリンの添加で成熟種子が得られた(Johri and Sehgal 1963)。Gynandropisの胚珠培養では基本培地には IAA を添加するとよい生育がみられた(Chopra and Sabharwal 1963)。

Capsellaの幼胚を胚培養すると、自然条件下のものよりも生育が速くなり、胚珠中で生育し

胚に較べて変異が大きく、令化能が低下する  
 ことが知られてゐる (Monnier 1968)。本実験で  
 組織学的並かに発生学的に Brassica の人工培養  
 子房を調査した結果、IAA, ジベレリン, カイ  
 ネチン等の作用物質を単独、或いは複合的に  
 加へても、無添加のものとの差異がなことを、ま  
 してすべしの胚生育は自然条件下のものより  
 も3日から1週間早いことが観察された(図  
 7)。また基本培地にイースト抽出物, ココ  
 ナットミルク, カゼイン酸分解物を添加する  
 と、胚発達の良好な胚珠が基本培地の場合よ  
 りも数多くみられたが、成熟種子になると思  
 われる胚の発達程度は変わりなく、自然条件  
 下のものよりも3日から1週間早い発達程度  
 を示した(図7)。またこの成熟種子になると  
 思われる胚の良好な発達は、交配の組合せ  
 に関係がなかつた。このように Brassica の子房  
 の人工培養においては、成熟種子まで発達出  
 来ると思われる胚の発育程度に対しては、成  
 長調整物質, イースト抽出物, カゼイン酸分

解物, ココナツトミルク等の効果は認められ  
なかつた。しかしながら, イースト抽出物,  
カゼイン分解物, ココナツトミルク等の添  
加によつて, 発達良好な種子形成の割合は明  
らかに増大した。

## (ii) 器官の人工培養による雑 種植物の育成

人工培養による雑種植物の育成に関しては  
4つに分けて実験を行なつた。胚培養, 胚珠  
培養, 子房の培養と子房培養による合成ナブ  
ス型植物の育成である。

### 胚培養

Brassica の  $2x \times 4x$  取 II は  $4x \times 2x$  の組織学的な  
研究において, 不稔種子の形成は胚に直接的  
原因があるのではなく, 胚乳の発達異常によ  
り胚の崩壊が起るためであることが分かつ  
た。これに基づいて雑種胚の人工培養を行な  
つた。修正 white の基本培地に Lupinus の未熟種

子から得た "embryo factor" を添加することによつて雑種個体を得ることに成功した。こゝで用いた "embryo factor" は Datura や Pharbitis などの胚発生に著しい効果を示したものである (Matsubara 1962, 1964), かつ本実験の Brassica の  $2x \times 4x$  と  $4x \times 2x$  胚の発育にも効果があつた。

Datura の胚培養では, "heart" 型胚 (0.15-0.2 mm) の培養が Van Overbeek らによつて可能となつた (Van Overbeek et al. 1942), また 100  $\mu$  以下の球型胚では, 胚培養は非常に困難であることから "heart" 型段階が人工培養の限界であるといわれてゐる (Wardlaw 1955)。最近 Brassica の種間交雑した不稔個体から, 胚を摘出し培養が試みられた (Nishi et al. 1959)。そのときの胚は "late torpedo" 型期のものであつた。"late heart" 型期以前の胚の人工培養はまだ試みられてゐない。本実験で試みた Brassica の  $2x$  と  $4x$  間の正逆交雑では, 組織学的観察から明らかによろしく,  $2x \times 4x$  および  $4x \times 2x$  とともに稀に "heart" 型に達するものがあるが, ほとんどの



胚は球型の状態までしか発達せず、退化してしまふ。このことからより早い時期に胚珠から胚を摘出し人工培養することが必要となつてゐた。Lupinus の未熟種子から抽出した "embryo factor" はこの点有効であることが分かつてゐた。またこの "embryo factor" は  $1.0 \text{ kg/cm}^2$  の圧力が10分間減菌してもその効果が減少しないので、簡便に使用出来る利点を兼ねてゐる (Matsubara 1964)。

### 胚珠の培養

IAA, カイネチン, ジベレリン, トマトジュースとイースト抽出物の添加によつても、生育出来る種子はまったく得られなかつた。また交雑した胚珠の培養に対するこれらの添加物の効果の有無も、明らかであることが出来なかつた。 $2x \times 2x$  或いは  $4x \times 4x$  の胚珠の培養においても、発芽する種子が得られなかつたことは、用いた培養基に欠陥があるか、Brassica の胚珠の培養が技術的に困難であるためかの何れかによると思われる。

そのうち、培養基の組成に関しては、既に胚珠培養を試み、生育する種子を Papaver (Maheshwari 1953), Gynandrocis gynadra L., Impatiens balsamina L. (Chopra and Sabharwal 1963) から得られるし、Anthum graveolens L. (Johri and Sehgal 1963) と Brassica (Inomata 1968) では子房の培養によつて、発芽可能な種子とつくることに成功してゐる。胚珠の栄養要求が種によつて異なるかもしれないが、ここでも用いた培地には必ずしも欠陥があったとは思われない。

胚珠培養の技術的な面についてみると、胚珠を培地に植之込むとき、胚珠を胚珠柄から切り取り、培地上に置床した。このことが物理的、或いは生理的に影響を与えたことも考えられる。また自然条件下においては、胚珠は胚珠柄から栄養分を取つて生長してゆくが、培地に置床した胚珠は必ずしも胚珠柄から養分を吸収するとは限らず、種柄から吸収することも有り得る。これらのことが、胚珠の初期の発達に影響をもたらしたもののとも

考えられる。栄養初期の胚珠の人工培養にあつては、食塩に胚珠柄を除いたものと、部分的に付けたものでは、生育可能な種子の形成率が異なつてくる(中島・松本 1969, Nakajima et al. 1969, 中島 1970)。このことから Brassica の胚珠の培養において生育可能な種子の形成がみられなかつたのは、胚珠培養の技術的な問題が原因であると思われる。

### 子房の培養

種属間雑種や倍数性の異なるものの交配における交雑不和合性の研究については、組織学的或いは発生学的研究は数多く為されてくるが、これ等の生理学的或いは生化学的研究はほとんどなされてきていない。Aegilops squarrosa x Triticum dicoccum の交雑においては正常な種子が栄養しない。これは受精後の胚発生の初期の段階で、胚乳の著しい異状が起るためである。この胚乳の異常に伴う生長素の活性を測定した結果、交配後3日目から7日目まではつねに Aegilops x Triticum の交雑の

方が、その対照区である Aegilops x Aegilops よりも生長素の活性が高かつた (Nishikawa 1959)。植物ホルモンの研究では Das et al. (1956) がタバコの髓の組織培養で、IAA とカイネチンの両者が培地に存在するときだけ真の細胞分裂が起ることを観察した。またタバコカルスの人工培養から新たに器官形成を誘起させる際、IAA とカイネチンの量的な差異によつて、芽と根の再分化を制御出来ることが分かつた (Skoog and Miller 1957)。ジベレリンの研究のうち細胞分裂の誘起については Hyoscyamus, Samolus (Sachs et al. 1959), Hyoscyamus (Sachs and Lang 1957), Citrus (Schroeder and Spector 1957), Phaseolus (Greulach and Haesloop 1958) 等には、細胞分裂や細胞伸長が認められたという報告がある。また大麦の胚乳にジベレリンを添加するとα-アミラーゼの活性が高まる研究もある (Varner and Chaud 1964)。 Allium cepa の leptotene-zygotene 期の薬の培養にカイネチンとジベレリンを基本培地に添加すると、花粉四分子まで繁殖す

る (Vasil 1957)。このように種々の組織に対し  
てカイネチン, ジベレリン, オーキニンの作  
用がいろいろ調べられてきている。また,  
Papaver の胚珠の発露初期のもの の培養には,  
IAA とカイネチンの添加が良好結果を与えてい  
る (Maheshwari 1958)。また Anethum の子房の人工培  
養では IAA とジベレリンと添加した培地から  
成熟胚が得られた (Johri and Sehgal 1963)。このよ  
うに, 胚珠や子房の人工培養に IAA, カイネ  
チン, ジベレリンが有効であるという報告が  
多い。

これらの研究に基づいて, 本実験においては  
は生長調整物質として, IAA, カイネチン, ジ  
ベレリンと選んだ Brassica の交雑不和合種子の子  
房の人工培養に対する効果を検討した。カル  
スの形成に関しては, カイネチンが IAA の存  
在下で大きな効果を示した。種子形成に関し  
ては, 全体的に  $4x \times 4x$  の方が  $2x \times 2x$  よりも良  
かった。特に IAA とジベレリンを添加した区  
においては,  $4x \times 4x$  の方が  $2x \times 2x$  よりもはる

かに良い結果を示した。しかしながら全体的にはみると、IAA, カイネチン, ジベレリン等の生長調整物質の直接的な効果はみられなかった。交雑種子の形成もみられたが、これも生長調整物質の濃度と平行的な関係を示さなかった。直接には生長調整物質が作用していると考えられることは必ずしもない。

Nitsch (1954) に依ると、カルスの生育に対しトコトジューズはココナットミルクと同じようによい効果を示す。またトコトジューズは見熟あるいは未熟果実のいずれからつくられるものであっても、カルスの生育や胚珠の発達に効果を示す (Ranga Swamy 1959, Nitsch 1963)。イースト抽出物は Zea mays の胚乳カルス (Straus and La Rue 1954, Tabata and Motoyoshi 1965) や Pisum sativum の根起原のカルス (Torrey and Shigemura 1957) の培養に必要である。また Ginkgo biloba の花芽培養に用いられて成功をみている (Tulecke 1957)。カゼインと酸分解物は胚培養 (Zieber et al. 1950) や Haplopappus gracilis のカルスの培養 (Blakely and

Steward 1961) に有効である。ココナツトミルクは、発生初期の胚の培養に特に有効であり (Van Overbeek et al. 1941), カルスの生育にも非常に効果がある (Caplin and Steward 1948, Shantz and Steward 1959, etc.)。また Ginkgo biloba の花粉培養では、カルスの形成もみられたが正常な花粉の発達は観察された (Tulecke 1957)。さらに Anethum graveolens の胚珠の人工培養において、ココナツトミルクが胚珠の正常な発達に効果があった (Johri and Sehgal 1963)。基本培地にココナツトミルクとカゼイン酸分解物を添加することによつて、ココナツトミルクだけの場合よりも良好なカルスの生育が示された (Shantz and Steward 1959)。

これ等の研究をもとにして、トマトジュース、イースト抽出物、カゼイン酸分解物、ココナツトミルクを種々の生長調整物質とともに基本培地に添加し、交雑不和合性の Brassica 子房の人工培養を試みた。その結果、培養基組成による相乗がみられた。カルスの形成に

フルニは、基本培地よりも、トマトジュース、  
 イースト抽出物の添加したものがよく、さ  
 らにココナットミルク単独、あるいはココナ  
 ットミルクとカゼイン酸分解物を併用したも  
 のが勝れた。種子形成にフルニは、トマ  
 トジュースは有害であった。しかし対照（  
 生長調整物質のみ）に比較し種子形成率は、  
 イースト抽出物、ココナットミルクの添加に  
 よって2倍半に、カゼイン酸分解物あるものは  
 それとココナットミルクの併用によつて3倍  
 半にし4倍半に向上した。これらの種子の  
 発芽率は対照に比較し変わらなかった。ただ  
 し、イースト抽出物添加の区のものはいく少低  
 かった。2x x 2x と 4x x 4x の種子形成にフルニ  
 みると、イースト抽出物とココナットミルク  
 を添加したものは同じような傾向がみられ、  
 2x x 2x の方が4x x 4x よりも良かった。カゼイ  
 ン酸分解物単独、あるいはカゼイン酸分解物  
 とココナットミルクを併用したものは逆に  
 4x x 4x の方が2x x 2x よりも良くなった。



$2x \times 2x$  と  $4x \times 4x$  の種子形成率が培地組成で異なるのは興味深い。3倍体の交雑種子が得られたのは、 $2x \times 4x$  ではココナットミルク添加区、 $4x \times 2x$  ではイースト抽出物添加区とカゼイン分解物添加区であった。同一培地から  $2x \times 4x$  と  $4x \times 2x$  の交雑種子は得られなかった。これは交配種子の発露において、正逆交雑で栄養要求性に違いがあることを示唆するものと思われる。

莢の大きさについても、生長調整物質を添加したもののでも、また種々の栄養を添加したもののでも差異はなく、2倍体を母ネに用いた交配 ( $2x \times 2x$ ,  $2x \times 4x$ ) は4倍体を母ネに用いた交配 ( $4x \times 4x$ ,  $4x \times 2x$ ) よりも、莢の長さは必ずこの場合においても短くなる傾向がみられた。

Brassica の子房の人工培養では、生長調整物質として用いた、IAA, カイネチン, ジベレリリン等を培地に添加したもののよりも、栄養物として用いたイースト抽出物, カゼイン分解

物、ココナツトミルク等を添加したものの外が、種子形成には良い結果を与えた。これらの結果によつて、イースト抽出物、カゼイン酸分解物、ココナツトミルクの3種類を各々種々の濃度で2つずつ組み合わせる培地をつくり、種子形成に対する効果を調査した。

前回に較べて全般的に種子形成は低かつたが、種子形成に対する栄養物添加の量による傾向はみられた。イースト抽出物を5g/l 或いは10g/l と高濃度に添加すると、Brassicaの種子形成には好ましくなかつた。イースト抽出物とカゼイン酸分解物との組み合わせ、或いはイースト抽出物とココナツトミルクの組み合わせにおいては、用いた濃度の範囲内での種子形成はいずれも低く、特に後者の場合に低かつた。之れを反して、カゼイン酸分解物とココナツトミルクを組み合わせた種々の培地では、種子形成はかなり良かつた。2x x 2x においてはココナツトミルクの20%添加では、4x x 4x ではカゼイン酸分解物単独

区のものか、珉<sup>1</sup>はココナツトミルク10%添加  
 区にお<sup>1</sup>て、種子形成は最も良かった。2x  
 x 4x 区<sup>1</sup>は 4x x 2x における種子形成に  
 つ<sup>1</sup>ては、2x x 4x z<sup>1</sup> 1粒 (CMC-3) と 4x x 2x z<sup>1</sup> 9  
 粒<sup>1</sup>があり、そのうち発芽したものは 2x x 4x z<sup>1</sup>  
 1粒、4x x 2x z<sup>1</sup> 4粒 (CMC-3, -6, -9, -14) z<sup>1</sup> あ  
 った。

4x x 2x の交雑にお<sup>1</sup>て、収穫時の調査のと  
 きに、種子全体の発育は止んで<sup>1</sup>いるが、胎座  
 に付着した胚のみが大きく成長して<sup>1</sup>いるもの  
 がみ<sup>1</sup>られた。その中には成熟胚のように発  
 達して<sup>1</sup>いるものから "torpedo" 型までみ<sup>1</sup>られた。  
 他の交配組み合わせからは、このような胚は出  
 現しな<sup>1</sup>かった。これは人工培養の途中で種皮  
 胚乳の発達と胚のそれとのバランスが崩れ、  
 胚だけ生育し続け<sup>1</sup>て残ったものと思われた。

Brassica の子房の人工培養による種子形成に  
 つ<sup>1</sup>ては、ココナツトミルクとカゼイン酸分  
 解物が効果があることが分<sup>1</sup>ったが、これを更  
 にく<sup>1</sup>わしく調べるために種々の培養条件と交

配組み合せを用いて調査した。使用した培養基はカゼイン酸分解物について4濃度(0, 300, 500 および 1000 mg/l)と、ココナツトミルクについて4濃度(0, 10, 15 および 20%)を組み合わせるに種類で、それぞれに子房を植え込んだ。その結果からみると、 $2x \times 2x$  ではカゼイン酸分解物を含まないものか、或いは 300 mg/l 添加したものが、500 mg/l 或いは 1000 mg/l 添加した区より、種子形成は少なかった。しかし、 $4x \times 4x$  では逆に、無添加か或いは 300 mg/l 添加の方が良かった。ココナツトミルクの添加については、 $2x \times 2x$  では 15% 或いは 20% 添加が 0% 或いは 10% 添加区よりも良く、逆に  $4x \times 4x$  では 0% 或いは 10% 添加の方が良かった。この実験に用いた Brassica の子房の人工培養には、 $2x \times 2x$  と  $4x \times 4x$  の両者に適した培地はなく、交配組合せごとに見ると最適な培地が存在すると思われる。

交雑種子を得る組合せの  $2x \times 4x$  と  $4x \times 2x$  に

つりとは、計12粒の種子が得られた。2x x 4x  
 ではウ粒得られたが、カゼイン分解物を  
 500mg/l 加えただけの2から2粒得られた以  
 外はココナツトミルクを15% 或いは20% 含む  
 培地から得られたものであつた。4x x 2x では、  
 得られた種子の5粒のうち、1粒はカゼイン分解  
 物を300mg/l 含む培地からであり、他4粒はカ  
 ゼイン分解物を500mg/l と1000mg/l, ココナツト  
 ミルクを10% 含む培地からであつた。ニ  
 のことからも多雑種子を得るには、組合せ  
 にも適つた最適培地が存在すると考えられる。

### 子房培養によるナプス型植物の育成

子房の人工培養の対照区として、自然条件  
 下における莢の長さ、種子稔性を調査した。  
 中野早生は各実験区において、莢の長さ、種  
 子稔性が異なつてゐた。特に種子稔性は0%  
 から78.9%まで著しい変異を示した。また野  
 崎中世とサクセツシヨニもその自殖において、  
 14.7%から81.1%と大きな種子稔性の変異を  
 示した。キャベツは他殖性作物であるので、

遺伝的に純系を保つことが困難であり、種子稔性の著しい変異は交配時の温度や品種の差異の他に、個体間変異も影響してゐることが考えられる。

また *B. cannestris* 群の対照区においても種子稔性は2.1%から93%と著しい変異を示した。同じ二重自体菜の種子を用いたにも拘らず、種子稔性は16.7%~72.8%と大きな変異を示した。これらの変異もまた、交配時にあける温度や栽培品種による差異の他に、個体変異も関係してゐるものと思われる。

一般的に得られた種子の発芽率は種子稔性の良否に拘らず良かった。早生小松菜は高い種子稔性を示したが、その発芽率は8.9%と著しく低かった。

試験管に植之込んだ当初の子房の長さは花粉親には関係なく、母体に用いた植物によつて決まつてゐた。しかしキヤベツでは約5mm、畑菜では約14mm、金町小蕪では約14mm、早生小松菜では約6mmの差が花

物親によつて理ゆれず。子房の生育は品種や個体の違いよりも、交配後の温度に著しく影響されるものと思われぬ。

キヤベツの自殖においては、交配後4日目の子房は全く生長せずに褐変してしまつたものが多数みられた。これは交配組合せによる不和合性のため、受粉を行なつても受精しなかつたものと思われぬ。

人工培養した子房の收穫時における莖の長さについては、多くの培地と品種について調査した。莖の生長は培地による差異を示さなかつた。また植之じみ当初の子房の長さ<sup>1</sup>と收穫時の莖の長さとの間には、はっきりした関係がなかつた。これに対して、自然条件下と人工培養したものの收穫時における莖の長さの間には、全般的に平行関係がみられた。

植物体から切り取つた切り口におけるカルス形成については、*B. campestris* 群では一般にカルス形成が豊く、培地に栄養物等を添加してもほとんどカルス形成はみられなかつた。一

オ B. oleracea 群ではカルス形成はよく、特にココナットミルクの添加が著しくカルス形成を促した。しかしその形成程度には大きな変異がみられた。カルスからの根の発生は多数観察された。

B. campestris 群と B. oleracea 群との自殖、交雑種子の形成について全体的にみると、両者とも自然条件下における種子形成と関連があるように思われる。自然条件下において種子形成の良かった交配組合せは人工培養においても種子形成がよかった。逆に自然条件下で種子形成の悪かったものは、人工培養においても良くならなかった。また一般的に、B. campestris 群と B. oleracea 群の自殖を比較した場合、前者の種子形成のオが良かった。B. oleracea 群については同じ栽培品種を幾度か別の実験に供したが、その度に種子稔性は変化した。これは、人工培養においても個体間差異があることを示すものと思われる。培養基組成による種子形成の差異は、はっきりとしなかった。つぎ



は、交雑子房の種子形成については、  
B. campestris (♀) x B. oleracea (♂) の交雑からは数  
 種の種子が得られ、発芽して雑種植物を生じ  
 た。しかしながら逆交雑の B. oleracea (♀) x B.  
campestris (♂) においては、ほとんど種子の発  
 達のみならず、未熟種子さえ得られなかつた。  
 更に特徴的なことは B. campestris (♀) x B. oleracea  
 (♂) の交雑においては、胚珠は発達せず胚だけが  
 胚柄に付着した状態の "torpedo" 型から発  
 達の状態にまで発達したものがみられたことである。と  
 して後者の方がかなり多数得られた。これは  
 基本培地のみならず、特にカゼイン分解物を  
 300 mg/l 添加した上で 11 日培養した。こ  
 の一ースト抽出物は Brassica の 2x x 4x あるいは  
 4x x 2x の交雑種子を得るのにほとんど効果か  
 なかった (Inomata 1968) が、ここには 2/8 の  
 添加によつてかなり良い胚の発達を認められた。  
 Nishi et al. (1959) は B. oleracea (♀) x B. campestris  
 (♂) の交雑の困難を解決するため、これらの  
 胚を収める発達時期に取りまして胚培養を試み

雑種個体と得られる。しかし従前の得た交雑  
 個体はいつでも B. oleracea x B. campestris の組み  
 合せからであり、この交雑からはまったく  
 雑種と得ることが出来なかつた (Nishi et al.  
 1959)。ここで行なつた B. campestris と B. oleracea  
 の正逆交雑においては、交雑種子および夏熟  
 種子のように発達した胚も、これ等から得ら  
 れた雑種個体も総て B. campestris (♀) x B. oleracea  
 (♂) からであり、逆交雑においては胚珠の発達  
 が初期の段階で終わつたと思われけるものばかり  
 しか観察されなかつた。通常、B. campestris  
 と B. oleracea の交雑における胚発生は、いつも  
 の交雑においても胚の発達は胚珠の発達初期  
 に止んでしまう (Håkansson 1956) のであるが、  
B. campestris x B. oleracea の交雑においては胚だけ  
 認められたのは、この交雑の胚珠は発達初期  
 においては、正常であることと示唆すると考  
 えられる。胚珠の発達が進まにつれて、胚乳  
 や種皮の発達が不十分となり、胚のみ正常に  
 発達するものと考えられる。

收穫時に胚だけ良好に発達したものを胚培養して雑種を得た。胚培養した個体は全部で51個体であったが、生育した雑種は合計19個体であった。これは植物個体の発達の悪さのためではなく、夏の高温・多湿に起因すると考えられる。この点に注意を払えば更に多数の雑種個体を得ることは容易なものと考えられる。

Brassica napus ( $2n=38$ ) は Brassica 属のカーロシ類 ( $C$  ゲノム) とハクサイ類 ( $A$  ゲノム) の間の複二倍体植物であることは Morinaga (1929) によつて明らかになれ、U (1935) によつて最初人工的につくられた。しかしながらカーロシ類とハクサイ類の交雑は極めて困難であり、あつたがしい数の交配を行つても同時に、受粉法の工夫 (Hosoda 1961, Sarashima 1964) や接木 (Hosoda 1961) などが試みられてきている。また母体を倍数体にしてからの交雑や、二倍体と4倍体の交雑が試みられてきている。B. campestris 群と B. oleracea 群の交雑についての

今までの主な報告のうち、2倍体 *B. campestris* 群と2倍体 *B. oleracea* 群の交雑についてはこの研究を Sarashima (1964) から引用して表79に示す(表79)。U (1935) の得た4個体の植物のうち、ナブス型の半数体雑種 ( $2n=19$ ) は1個体で

Table 79. Historical review of the results of crosses between *B. campestris* and *B. oleracea*\*

Authors	No. of flowers pollinated(A)	No. of hybrids obtained (B)	B/A x 100
diploid ( $n=10$ ) x diploid ( $n=9$ )			
U (1935)	732	4	0.545
Mizushima (1946)	300	2	0.153
F (1955)	230	1	0.434
Hoffmann et al. (1958)	8330	20	0.240
Olsson (1960)	10359	16	0.153
Hosoda et al. (1961, 1963)	1121	22	1.962
Nishi et al. (1962)	4496	8	0.177
diploid ( $n=9$ ) x diploid ( $n=10$ )			
U (1935)	380	0	0.0
Hoffmann et al. (1958)	9703	64	0.659
Olsson (1960)	4074	0	0.0
Hosoda (1961)	247	0	0.0
Nishi et al. (1962)	3187	0	0.0

\* Sarashima (1964)

あり、他は  $2n=29$  (aac),  $28$  (acc), および  $2n=38$  (aacc) があった。これらの植物はオオカブトは父方の2倍性の配子交雑による交雑種と考えられる。Hosoda (1961) も B. campestris x B. oleracea から  $2n=19$  (ac) の他に  $2n=28$  (acc) を得ている。また Sarashina (1964) も B. campestris x B. oleracea の 1,505 花の交配から 5 粒の交雑種子を得たが、そのうち 4 個体は  $2n=19$  (ac) 2, 他の 1 個体は  $2n=29$  (aac) があった。B. campestris 群と B. oleracea 群の交雑の中でも特に B. campestris 群のなかのハクサイ (ssp. pekinensis (Lour.) Olsson) と B. oleracea 群のカンラン (var. capitata L.) の交雑は困難で、この組合せの成功例は Mizushima (1952) の 4-7 白菜 x サクセツニヨニ, および Hosoda (1961) の 4-7 白菜 x 野崎夏まきカンランの 2 例 2 個体があるにすぎない (Nishi et al. 1962)。B. oleracea x B. campestris の組合せにおいても多くの人々によって種々の試みが行われているが、Hoffmann et al. (1958) が約 1 万花の交配から 64 個の雑種

を得ることはできなかった。また Nishi et al. (1962) も約3000花の交配を行なったが、交雑個体は得られず、これを胚培養する方法が試みられた (Nishi et al. 1959)

ここに報告した実験の結果を表80-1のよう  
にまとめると、B. campestris x B. oleracea の結  
果を表80-1に、B. oleracea x B. campestris の結果  
を表80-2にそれぞれ示した (表80-1, 表80-2)。

新しいナブス型の植物を得るための子房の人  
工培養においては、ハクサイ x カーロン (B.  
campestris L. ssp. pekinensis (Lour.) Clsson x B.

oleracea L. var. capitata L.) の組合せからは約  
30個体の幼植物を得て鉢植し、そのうち7  
個体が生育した。また白菜 x カーロン (B.

campestris (L.) ssp. chinensis (L.) Makino x B. oleracea

L. var. capitata L.) からは15個体の幼植物を得、  
そのうち12個体が生育した。ところが比較的  
交雑種子の得やすいといわれるカブの類とカ

ーロン類の交雑からは雑種植物を得ることは  
出来なかった。今まで困難とされてきたハク

Table 80-1. Production of the hybrid plants in the crosses between *B. campestris* and *B. oleracea* by ovary culture

Cross	No. of flowers polli- nated(A)	No. of hybrids obtain- ed (B)	B/A x 100
· diploid ( $n=10$ ) x diploid ( $n=9$ )			
Hatana x Succession	59	0	0.0
Nozaki-hakusai x Nakano-wase	57	0	0.0
Kanamachi-kokabu x Nakano-wase	60	0	0.0
Nozaki-hakusai x Nakano-wase	129	8	6.20
Kyoto-hakusai x Nakano-wase	60	2	3.33
Wase-komatsuna x Nozaki-chusei	58	0	0.0
Nikanme-taina x Succession	56	12	21.43
Total	479	22	4.59

サイ類とカニラニ類の交雑から得た雑種植物も、体菜とカニラニの交雑から得た個体も総て  $2n=19$  (ac) の異質半数体であった。本実験で成功した子房の培養方法を用いればナス型作物の育種に新しい局面が開ける可能性

Table 80-2. Production of the hybrid plants in the crosses between B. campestris and B. oleracea by ovary culture

Cross	No. of flowers pollinated(A)	No. of hybrids obtained (B)	B/A x 100
diploid ( $\underline{n}=9$ ) x diploid ( $\underline{n}=10$ )			
Succession x Hatana	54	0	0.0
Nakano-wase x Nozaki-hakusai	58	0	0.0
Nakano-wase x Kanamachi-kokabu	55	0	0.0
Nakano-wase x Nozaki-hakusai	101	0	0.0
Nakano-wase x Kyoto-hakusai	60	0	0.0
Nozaki-chusei x Wase-komatsuna	60	0	0.0
Succession x Nikanme-taina	59	0	0.0
Total	447	0	0.0

がある。すなわち、B. campestris 群と B. oleracea 群の多様性を考慮すると、B. napus 型植物には大きく分けてつぎの3つが考えられる (Hosoda 1961) (1) 結球性ナブス、(2) 根菜ナブス、および (3) 油飼料ナブス。本実験結果は、



(3) 型のみならず(1), (2) 型トナスの育成に大きな可能性を開くものである。

(iii) 交雑不和合性の生理学的研究

子房の培養条件の検討

Nitsch (1951), White (1963), Heller (1953) と Murashige and Skoog (1962) の各々の培地を基本にして, アミノ酸, ビタミン等の有機物を添加した種々の培地に *B. campestris* の 2 倍体, 栽培品種名雪白体菜, と同質 4 倍体, 栽培品種名野崎白菜の子房の人工培養を試み, 種子形成等について調査した。全般的に  $2x \times 2x$  の種子稔性のものが  $4x \times 4x$  のそれよりも良いように思われた。無機塩の濃度差と収穫時にはおける長さについてこの関係はみられず, むしろ栽培品種による差異があった。種子稔性についてみると, 無機塩の濃度差による違いがあった。white, Nitsch 等の比較的無機塩の濃度の低い培地の

方が、比較的高濃度の Heller, 特に Murashige and Skoog の培地よりも種子稔性は良好であり、  
 以上の種子の発芽率も低くなかった。特に 2x  
 の自殖の W-2 と W-3 には、他に較べて  
 良かった。4x の自殖では、MS-62 を除いて、N-1  
 の種子稔性も良かったが、その発芽率が悪く、  
 W-1, W-2 の方がよい結果になった。無機塩の  
 基本培地は White の有機物、Morel の有機物或  
 は両者を混合したものの等についてみると、上  
 記の有機物を添加しないものでも、いずれ  
 の区にはおいてもかなりの種子稔性が見られ、  
 N-1, W-1 と H-1 では高かった。Nitsch, White,  
 Heller についてみると、有機物の添加が多種  
 類になるとかえって種子形成は低くなる傾向  
 を示した。しかしながら MS-62 の場合には、有  
 機物の添加が多くになると 2x, 4x のいずれにお  
 いても種子形成が上昇した。特に 4x の場合は、  
 他の培地の種子形成と較べて良好な種子形成  
 がみられた。

胚培養, 特に幼胚と胚珠から取り出し培養

養するばありにば、無機塩に糖を添加し下培地は勿論、種々のアミノ酸等の有機物を添加し且培地においても、生育を続けられた物体に生長することは非常に困難である。基本培地にココナットミルクを添加すると、幼胚の生長を著しく助け、植物体まで生長させることが出来る。ココナットミルクには幼胚を生長させる物質 "embryo factor" が存在してゐる (Van Overbeek et al. 1942)。この研究を発端にして、"embryo factor" の研究が盛んになり、種々の植物の抽出物や、イースト抽出物、麦芽抽出物等の幼胚に対する効果が研究されてきた。このように幼胚の人工培養には各種のアミノ酸を添加しても、生育は十分で存し。 Daucus carota のカルスでは、IAAの他にサイアミンとニステインを含む培地で12年間の継代培養が可能であるのに、Salix のカルスの培養では、18ヶ月たつと枯死してしまふ。 Daucus carota のカルス培養の培地にカルシウムピントテン酸とピオクニを加えると長期培養が可能と存る。

(Gautheret 1950)。またタバコの體からのカルスではサイアミンが必須であり、その上イノシトールを添加するとカルスの増殖は著しくなる(Linsmaier and Skoog 1965)。このように組織培養に用いられる培地にはサイアミンの添加が必須であり、その他カルスの種類によつて添加すべき有機物が各々多少異なつてゐる。

ここで行なつた Brassica の子房の人工培養においては、糖と無機塩だけの培地でも種子形成がみられた。また MS-62 を除くときは、多くの種類の有機物の添加は阻害的に作用すると思われた。無機塩の比較的うすい White の培地を基本培地に用いるのが好ましいと思われる。

糖濃度と種子形成に関しては、2x の自殖と 4x の自殖においては多少異なつてゐたが、2x x 2x では 1 リットル当たり 30g の蔗糖のとき最も良い種子形成がみられ、4x x 4x では 50g のとき良い種子形成がみられた。培地に添加される糖濃度が低い場合 (10g/l)、或いは高い場合 (70g/l, 90g/l) のいずれにおいても、種

子形成の低下がみられ、特に  $4x \times 4x$  においては効果が著しかった。

Daucus carota の組織培養における糖濃度とカルスの生長の割合をみると、3% 蔗糖の場合が一番生長が良く、それより高濃度になると生長は抑えられた (Gautheret 1959)。また Zea mays の胚乳からのカルスの生長で、蔗糖 2% のとき生体重が最高であったが、乾物量は 8% のときに最も高い値を示した (Straus and La Rue 1954)。

Brassica の子房の人工培養において 3% から 5% の糖濃度が好ましいと思われた。

光の条件については子房の人工培養では、300-500 ルクス程度の光の状態の時が最も良く、暗黒状態、変温での室温状態、2000 ルクスを与えた状態はそれぞれ劣っていた。暗黒状態から得られた  $4x \times 4x$  の種子は 1 粒も発芽しなかった。2000 ルクスという光は Brassica の子房の人工培養においては、光による物質の消費の方が大きくなるためと思われる。

交配後 1 日目から 10 日目まで順に日を遡る。

人工培養を試み、種子形成の割合とみづが培養する時期が遅くなるに従って種子形成の割合は上昇する傾向にあった。4x x 4x では交配後5日目からは種子形成は順次よくなるが、4日目までは交配後1日目よりその割合は劣った。

胚珠成は子房の人工培養によつて、種子形成を調べた研究には多数の報告がある。それの中には日を追って種子形成の割合を調べたものも見当らぬ。Nakajima (1970) のまとめで最近の報告によると、胚珠培養の成功例は受粉後の日数で見ると、これらのほとんどが4日目以後であり、その時の胚の発達状態は球型状のものである。胚の細胞数が4細胞以下であるものは僅かに存在するだけである。

Brassicaの交配後の胚発生についてみると、交配後1日目には、2x x 2x では未だ受精の行なわれず胚珠は見当らぬ、4x x 4x では10個の子房を調べたなかで僅かに2粒の胚珠が受精してゐた。3日目には、胚は1〜

2細胞の状態であつた (Nishiyama and Inonata 1966)。 Brassica の子房の培養に於いては、交配後1日目から発芽種子を得た。 Brassica に於いて今まで行なわれてきた培養時期よりも、更に発達初期の未受精の状態からの培養が可能となつた。

胚珠の培養に於いて、生育種子を得るには、胎座を付けてそのまま培養するか否かが大きく影響し、胎座を付けた場合に良い種子形成をみた (Nakajima and Matsumoto 1969)。更に (Nakajima 1970) は胚珠の培養での胎座の役割の重要性を論じている。 Brassica に於いても交配後9日目の胎座から胚珠を取りはさし、寒天培地上で培養した胚珠から発芽する種子は得られなかった (A-2-iii)。また寒天上に置床した胚珠を交配後15日目に固定し、胚珠の発達状態を調べたものでも、培地上に置床してからの胚珠の中の胚・胚乳の発達はほとんどなかった (A-1-ii)。ここで行なつた実験では、受精以前の状態から培養した場合に於いても発

芽種子が得られ、交配後9日目では  $2x \times 2x$  で 59.5%、 $4x \times 4x$  で 16.7% の種子を得た。その 93% と 81% の種子がそれぞれ発芽した。

Brassica においとも、Nakajima (1969, 1970) が指摘するようには胚珠の発達初期は、胚珠が胎座に付着してゐることから種子形成に大切であると推測される。

### 交雑不適合性における遊離アミノ酸の消長

胚珠の発生初期の崩壊に供する遊離アミノ酸の消長を調べた。対照として  $2x \times 2x$  と  $4x \times 4x$  を調べた結果、お互いの間の遊離アミノ酸に量的な差異がみられた。これは倍數性の差によるもの、或いは栽培品種の差によるものと思われる。 $2x$  と  $4x$  の正逆交雑の組織学的観察によれば、 $2x \times 4x$  では交配後12日目から胚乳の崩壊が起るが、一方  $4x \times 2x$  では交配後6日目には胚乳の膜形成が始まり、9日目では胚は球型にも拘らず、胚乳全体の膜形成が観察され、12日目になると崩壊が著しく起った (Nishiyama and Inomata 1966)。このよ



うに形態的存変化をみると、 $2x \times 4x$  と  $4x \times 2x$  における種子崩壊は全く別のものと考へられたが、遊離アミノ酸の段階では、この両者の種子崩壊の現象が類似してゐた。遊離アミノ酸の中でも特にメチオニンとバリン、とロイシンにおける著しい量的変化がみられたが、 $2x \times 4x$  と  $4x \times 2x$  の遊離アミノ酸の著しい量的変化はメチオニンとバリン、とロイニンであり、種子崩壊の時期と組織学的な観察から考慮すると、その消長は類似してゐた。 $4x \times 2x$  の12日目では、遊離アミノ酸の検出が少なかったが、これは胚珠全体が枯死に近づいてゐるためである。

Triticum と Zea の雄性不稔の系統の花粉の遊離アミノ酸を調べると、正常のものに較べ、アスパラギン酸が異常に増加して、プロロニンの減少がみられた (Fukasawa 1954)。Brassica の交雑不稔の場合にはメチオニンとバリン、とロイニンが急激に増加したので、雄性不稔の現象とは異なつてゐた。

交雑不稔におけるメチオニンとバアリン、  
とロイシンの関係が明らかになつたが、これ  
等の遊離アミノ酸の蓄積は、アミノ酸から蛋  
白質への取り込みが阻害されるために生じる  
のか、或いは胚・胚乳の崩壊に伴つて、蛋  
白質が分解するために生じるのかは明らか  
にできなかった。

## B Raphanus sativus L. の 2 倍体とその同質 4 倍体の交雑不和合性に関する研究

### (1) 胚発生学的研究

Brassica campestris の 2 倍体 ( $2n=20$ ) とその同質  
4 倍体 ( $2n=40$ ) の正逆交雑では、いずれも受精  
後或る程度の胚の発達は見られるが、途中で  
胚珠が崩壊し生育出来る種子の形成はみられ  
ない (Nishiyama and Inomata 1966)。 Raphanus sativus に  
おいては  $2x(\text{♀}) \times 4x(\text{♂})$  では交雑種子が得られず、  
 $4x(\text{♀}) \times 2x(\text{♂})$  では小さい生育出来る種子が得ら  
れた (Nishiyama 1952a, b)。しかしながらこの胚発

生学的研究は未だ存在してゐない。

こゝでは Raphanus sativus の 2 倍体と同質 4 倍体の正逆交雑における胚発生と、発生学的並びに組織学的に観察した。

### 材料および方法

Raphanus sativus L. の 2 倍体と同質 4 倍体の 1 栽培品種、聖護院大根を用いた。用いた交配組を合せは  $2x \times 2x$ ,  $2x \times 4x$ ,  $4x \times 4x$  および  $4x \times 2x$  である。除雄後 2 日目にはガラス室内で新鮮な花粉を用いて開花受粉したのち、交配後 3 日, 6 日, 9 日, 12 日, 15 日, 18 日と 21 日目に子房を固定し、パラフィン埋蔵後 11~15  $\mu$  のパラフィン切片をつくり、ハイデンハイム鉄ヨロバンフメトキシリンで染色し、検鏡した。固定、パラフィン埋蔵、染色の方法、検鏡のスケッチ等は、Brassica の組織の観察と同じ方法を用いた。

## 結 果

## 交雑結果

正逆交雑ととの対称区の自然条件での種子稔性と成熟莢を用いて調査した(表81)。

Table 81. Results of crosses between diploid and tetraploid Raphanus sativus

Cross combination	No. of flowers pollinated	No. of capsules examined	No. of seeds obtained	Seed set (%)	Av. capsule length (mm)
$2x \times 2x$	37	32	148	85.2	57.0
$2x \times 4x$	36	35	1*	0.5	45.8
$4x \times 4x$	6	6	9	75.0	38.3
$4x \times 2x$	7	7	7**	70.0	33.9

\* One seed was diploid.

\*\* All seven seeds were hybrid.

$2x \times 2x$  と  $4x \times 4x$  は種子稔性が良く75%以上であった。  $4x \times 2x$  については7つの莢を調べ、7粒の菜芽種子を得た。種子稔性は70%であった。逆交雑の  $2x \times 4x$  については35莢を調べたが、受精して成る程度胚珠が萎縮したと思われる不良種子(いずれも菜芽せず)が多数

クを添加したものは良かった。得られた種子は、 $2x \times 2x$  で 8粒、 $2x \times 4x$  で 1粒、 $4x \times 4x$  で 8粒、 $4x \times 2x$  で 15粒であった。得られた種子の発芽率は50%から100%の間であったが、 $2x \times 4x$  から得られた種子は  $2x \times 2x$  或いは  $4x \times 4x$  と同じ大きさで充実にしてゐたが不発芽であった。また  $4x \times 2x$  の交雑からはそれぞれの組み合わせよりも良い種子稔性が得られたが、これは充実種子の大きさが早熟区 ( $2x \times 2x$ ,  $4x \times 4x$ ) の約  $\frac{1}{4}$  の大きさのため、限られた環境では早熟種子が得やすいと考へられた (図30)。

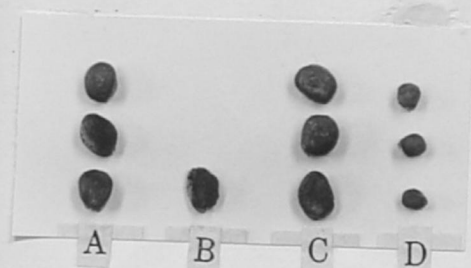


Fig. 30. Seeds produced by ovary culture.

- A:  $2x \times 2x$ .  
 B:  $2x \times 4x$ .  
 C:  $4x \times 4x$ .  
 D:  $4x \times 2x$ .

(3) 考察および  
 論議

### 胚発生学的研究

$4x \times 2x$  から得られ

る *Raphanus sativus* の 3

倍体雑種は生育して、

雑種植物をつくらせた。この交雑から得られた

の数も表 82 に示す (表 82)。球型胚までの発達については胚全体を測定した。それ以後の胚については子葉部分に存るべき部分を除いた残りの部分の大きさを測定した。4つの組み合わせの胚の発達状態には、交配後12日目までは差異がみられなかった (図 26)。

Table 82. Number of ovules used for studying growth rate of embryo

Cross	Days after pollination						
	3	6	9	12	15	18	21
$2x \times 2x$	0	4	7	7	3	3	4
$2x \times 4x$	1	3	7	10	2	1	2
$4x \times 4x$	1	6	6	4	4	2	2
$4x \times 2x$	1	8	9	5	5	3	1

$2x \times 2x$  と  $4x \times 4x$  の胚は12日目以後は急速に大きくなったが、 $2x \times 4x$  の発達は15日目以後は止まってしまし、或る胚珠では胚は消失してしまつてゐた。  $4x \times 2x$  では  $2x \times 2x$  或いは  $4x \times 4x$  に較べると15日目では発達が遅くもつた。18日以後では、 $4x \times 2x$  の胚の発達はほとんど止まってしまつたが、 $2x$  と  $4x$  の胚は正常に生育を

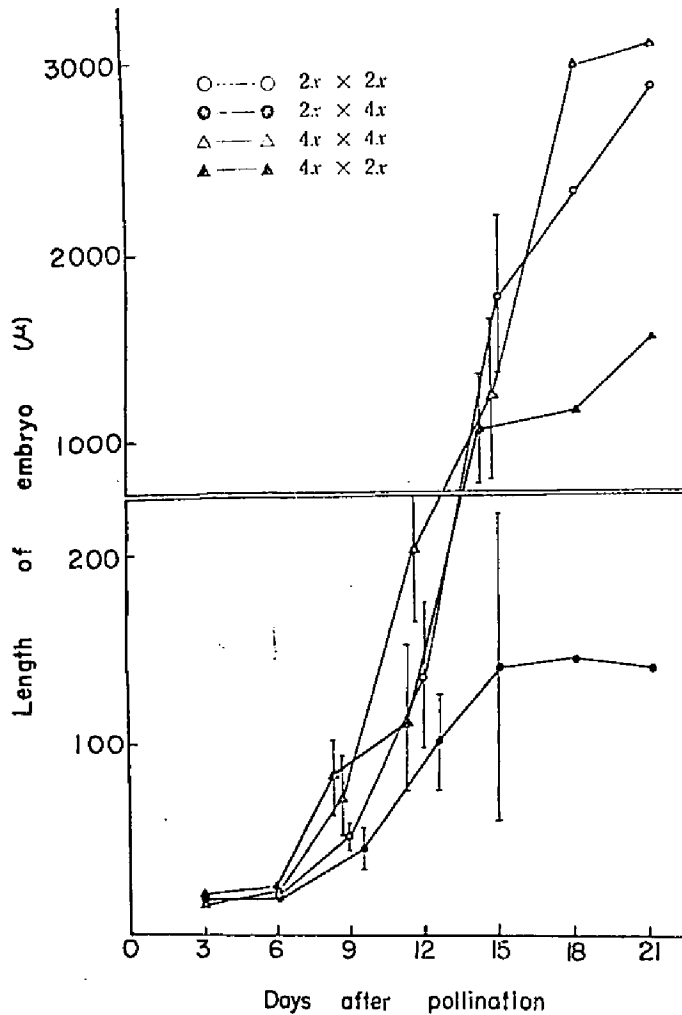


Fig. 26. Growth rates of embryos in reciprocal crosses between  $2x$  and  $4x$  of *Raphanus sativus*, —: 95% fiducial interval.

続け。交配後21日自らは、3つの交配( $2x \times 2x$ ,  $4x \times 4x$ ,  $4x \times 2x$ )にはおいて胚は完成したが、 $4x \times 2x$ の胚の大きさは両親( $2x$ と $4x$ )の大きさの約半分であった。胚の発達については、種

種と両親の明瞭な差異は、 $2x \times 4x$ では12日目  
に、 $4x \times 2x$ では15日目に現われることが分か  
った。

### 交雑種子の発生学的研究

I.  $2x \times 2x$  と  $4x \times 4x$  : 通常1つの子房に  
は4つから6つの胚珠が含まれてゐるが、交  
配後3日目には、そのうち1つから4つの胚  
珠が受精してゐた。受精してゐた胚珠の中で、  
1細胞の接合体が観察出来たのは唯1つの胚  
珠だけで、後は胚の状態は分らなかつた。

交配後6日目になると、胚の細胞数は $2x \times$   
 $2x$ では3から8細胞、 $4x \times 4x$ では4から8細胞に  
発達してゐるのが観察された。胚乳は全体に  
僅かしか発達してゐないが、胚の周り、特に  
胚柄の周りは胚乳の発達が良かった(図27a,  
e)。

交配後9日目では、 $2x \times 2x$ の胚は球型で  
その細胞数は、中心の胚軸に添つて縦が5から



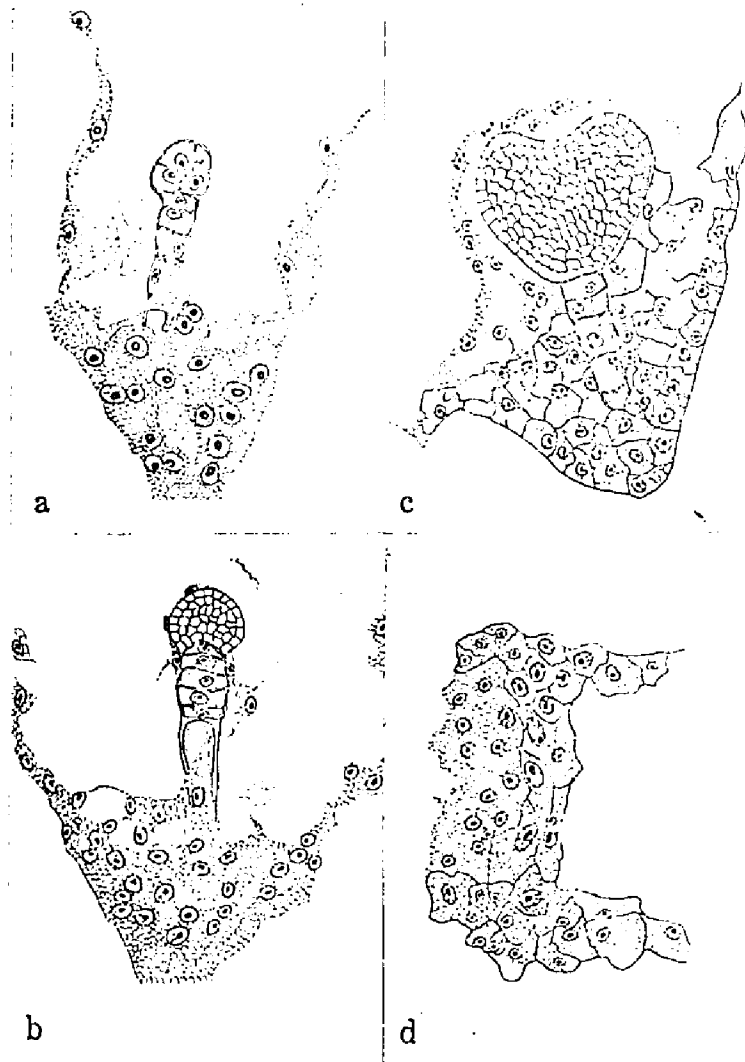
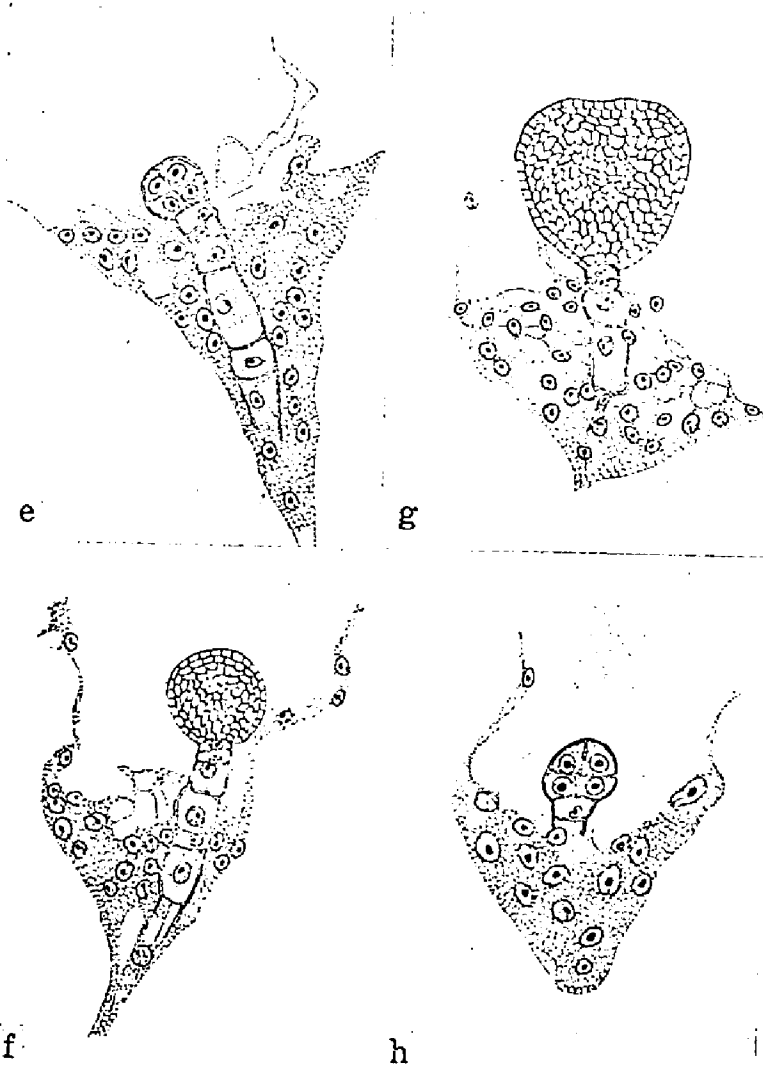
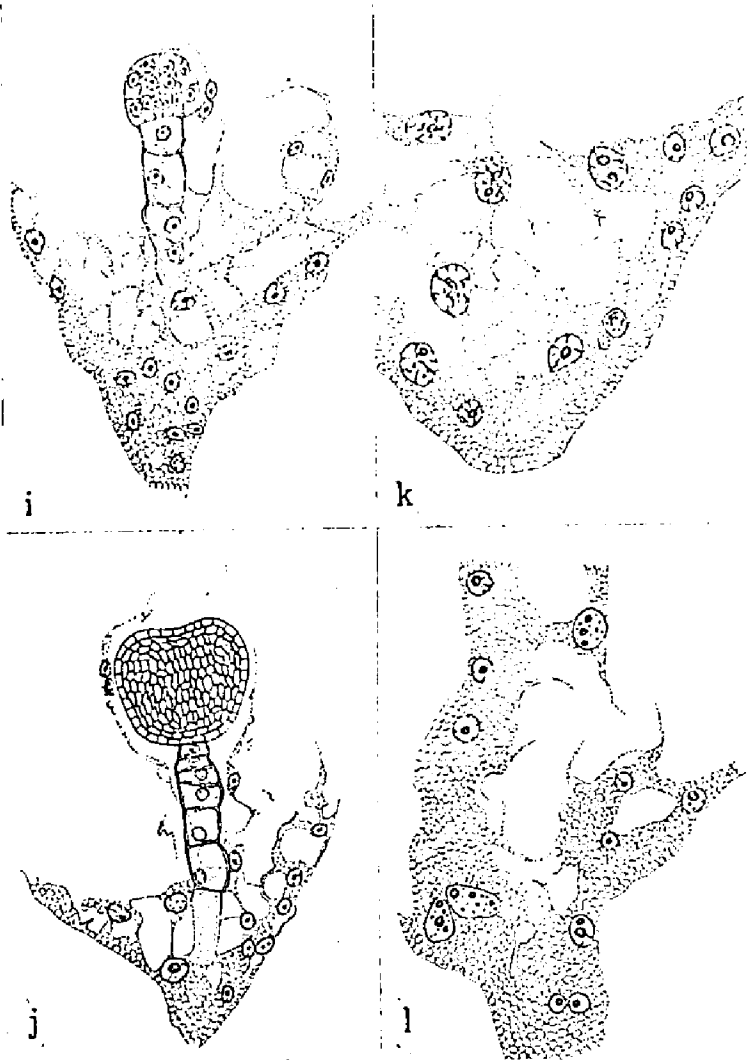


Fig. 27. Embryo and endosperm in various developmental stages.

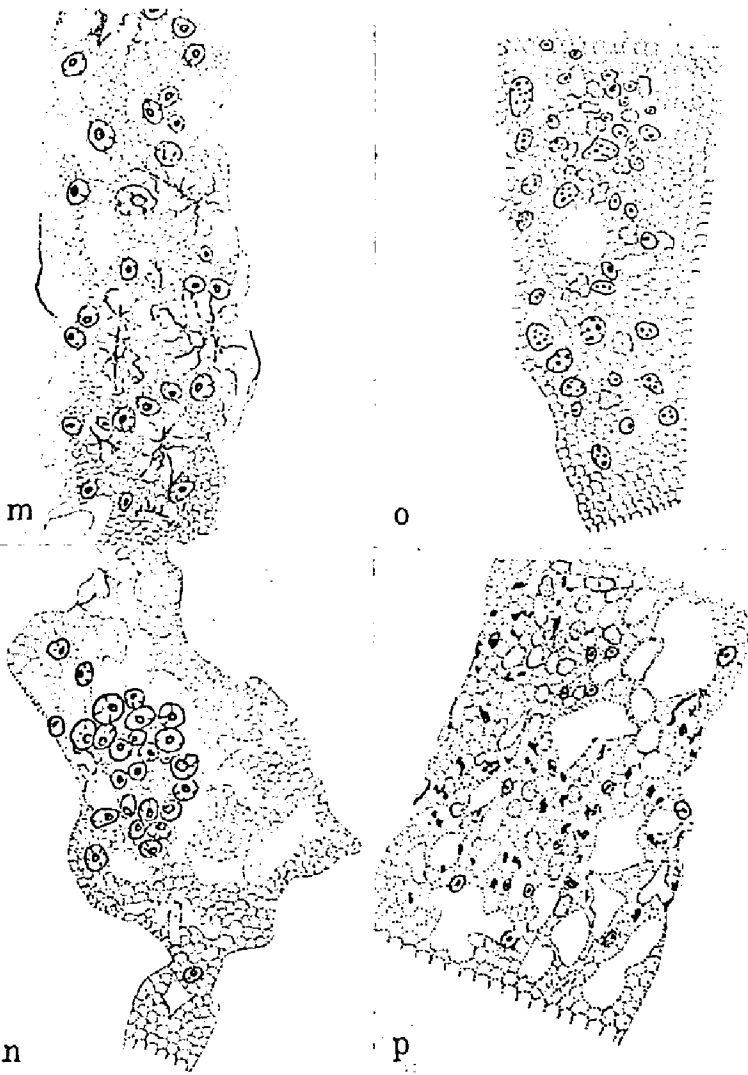
- a:  $2x \times 2x$ , 6 days after pollination; 4-celled proembryo.
- b:  $2x \times 2x$ , 9 days after pollination; Embryo at globular stage.
- c:  $2x \times 2x$ , 12 days after pollination; Heart-shaped embryo and cell wall formation in the endosperm.
- d:  $2x \times 2x$ , 15 days after pollination; Partial cell wall formation of basal endosperm.



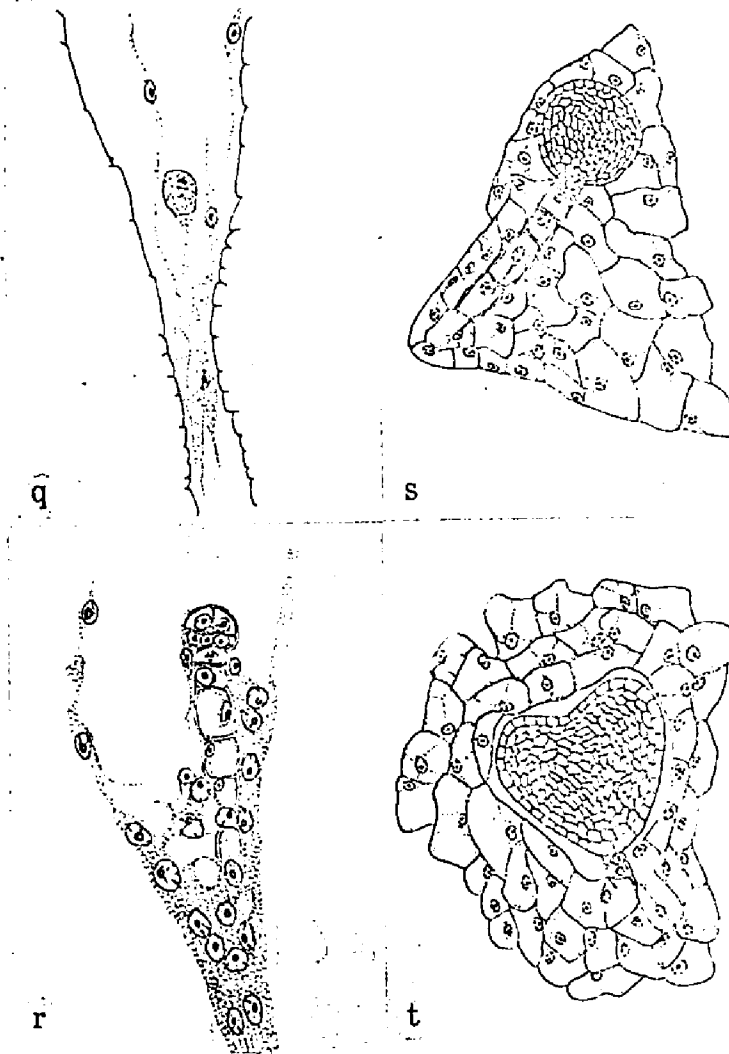
- e:  $4x \times 4x$ , 6 days after pollination; 4-celled proembryo.  
 f:  $4x \times 4x$ , 9 days after pollination; Embryo at globular stage.  
 g:  $4x \times 4x$ , 12 days after pollination; Pre-heart-shaped embryo and cell wall formation occurred in endosperm near the embryo.  
 h:  $2x \times 4x$ , 6 days after pollination; 4-celled proembryo.



- i:  $2\times$  x  $4\times$ , 9 days after pollination; Degeneration occurring in endosperm.
- j:  $2\times$  x  $4\times$ , 12 days after pollination; Conspicuous degeneration occurring in endosperm.
- k:  $2\times$  x  $4\times$ , 12 days after pollination; Extremely large nuclei observed in endosperm near embryo.
- l:  $2\times$  x  $4\times$ , 12 days after pollination; Abnormal nuclei found in other parts of endosperm.



- m:  $2x \times 4x$ , 15 days after pollination; Collapsed endosperm.
- n:  $2x \times 4x$ , 15 days after pollination; Nuclei gathered in a particular part.
- o:  $2x \times 4x$ , 15 days after pollination; Nuclei varying in size.
- p:  $2x \times 4x$ , 18 and 21 days after pollination; Collapse of endosperm in all parts of the ovule.
- q:  $4x \times 2x$



- q:  $4\times \times 2\times$ , 3 days after pollination; One-celled proembryo.
- r:  $4\times \times 2\times$ , 6 days after pollination; Vacuoles in endosperm near embryo.
- s:  $4\times \times 2\times$ , 9 days after pollination; Embryo at globular stage and cell wall formation in endosperm.
- t:  $4\times \times 2\times$ , 12 days after pollination; Embryo at heart-shaped stage and cell wall formation in endosperm.

9細胞, 横が4から8細胞であり,  $4 \times 4$ では縦方向に4から12細胞, 横方向に4から7細胞が各々数えられた。胚乳は全体的に発達してはいるが, 胚珠自身が大きくなるまでこのので, 胚乳核は胚のうの内側に沿って12の例に並んではいるだけで, 中央部は大きくなった細胞のまま残されてはいた。胚乳の膜形成は胚および胚極の周辺部においてもみられなかった(図27b, f)。

交配後12日目では, 胚は  $2 \times 2$  あるいは  $4 \times 4$  において分化を始めはいるのが観察された。球型から "heart" 型になった胚の回りでは胚乳の膜形成が始まっていた(図27c, g)。

$2 \times 2$  と  $4 \times 4$  のよく発達した胚は "early torpedo" 期に達し, これらの胚乳の膜形成は "basal endosperm" の部分を除く全面に起っていた。

15日目になると, 11ずれの交配において胚は著しく発達し, "late torpedo" 型から "upturned U" 型にまで達するものが見られた。

しかし胚珠によつて胚の発達に遅れがみられた。胚乳の膜形成は全面に広がり、発達の良い胚を持つ胚珠の "basal endosperm" は一部膜形成を起して二子のが観察された (図27d)。

18日目と21日目になると、胚の発達は更に著しく、"upturned U" 型からほとんど成熟した胚にまで達した。特に子葉部分の生長が著しく、ほとんど成熟した胚は胚珠全体を埋めこいた。これらの胚珠では胚乳は著しく退化し、全体にわたって膜形成した "basal endosperm" と共に、僅かしか存在しなかつた。

II.  $2x \times 4x$  と  $4x \times 2x$  : 交配後3日目に観察した1子房の中は1~5個の受精した胚珠がみられた。これらの胚の発達状態は観察しにくかつたが、いずれの交雑でも1個の胚珠と接合体の状態が観察された (図27g)。

6日目には、胚の細胞数は  $2x \times 4x$  では2から4細胞となり、 $4x \times 2x$  では4から8細胞が観察された。対照区 ( $2x \times 2x$ ,  $4x \times 4x$ ) の胚の細胞数と較べると  $2x \times 4x$  の胚の発達は少し遅れて11

さよりに思われた。胚乳の発達は胚および胚柄の周りの胚乳以外は全体的に僅かしか発達してはなかつた。2x x 4x の胚乳においては対照との違いと変わりかゝつた(図27b)が、4x x 2x では胚の周りの胚乳に多少空胞化がみられた。これは胚乳の膜形成と関係があるように思われる(図27r)。しかし膜形成はこの段階でははっきりとは観察されなかつた。

9日目になると、胚の発達状態は4x x 4x, 4x x 2x のオが2x x 2x 或いは2x x 4x よりもよかつた(図26)。胚は球型でその細胞数は2x x 4x では中心の胚軸に沿つた縦方向では5から9細胞、横方向では4から9細胞であり、4x x 2x の胚では縦が12から15細胞、横が14から15細胞であつた。このことから胚の発達程度は4x x 2x のオがよゝゝとかがなかつた。胚乳の発達に関しては、2x x 4x では胚、特に胚柄の周りで胚乳の崩壊が始まるのが観察された(図27i)。この場合、図27cや図27gと同じような空胞化がみられたが、後者の空胞の



周囲には胚乳核が存在してゐるので、膜形成の起る前段階のものであると考えられるが、前者の場合には、空胞化した胚乳の周りにはどこにも核が見出されなかつた。一方逆交雑の  $4x \times 2x$  の胚乳は胚が球型であつても全面にわたつて膜形成が観察された (図275)。

12日目になると、 $2x \times 4x$  の胚においては球型から、最も良く発達したもので "late torpedo" 型のものまでみられ、球型の胚のうちには、細胞数が縦が8細胞、横が8細胞という交配後9日目からほとんど発達してゐる胚を持つ胚珠も観察された。 $4x \times 2x$  の胚では発達のよい球型から "torpedo" 型までの胚がみられた。胚乳の状態は  $2x \times 4x$  では、胚の周りの胚乳では崩壊が更に進んで空胞化が目立つてきた (図276)。しかしこの胚の周辺の胚乳にも同じように崩壊する胚乳がみられた。また胚乳核の大きさと著しく異なるものが胚の周辺部 (図276) や、胚珠中には僅かに存在する胚乳でも観察された (図277)。これは核分裂の

異常，核の融合等によつて処理したものである。4x x 2x の胚乳ではどの胚珠でも膜形成がみられ（図27a）。

15日目には，2x x 4x の胚の発達は完全に止まつてしまつたように思われる（図26）。組織学的観察にあつても交配後12日目に見られたと同じ球型或いは"heart"型の胚が観察された。一方4x x 2x にあつては，胚の大きさは対照（2x, 4x）のそれよりも多少小さいが，形態的にはほとんど成熟に近しい胚から"upturned U"型までと，対照との交配後18日目から21日目にみられるような胚が胚珠中に存在した。胚珠全体が小さいので，それらのよく発達した胚は胚珠中一杯に広がつていた。胚乳の状態は2x x 4x では膜形成はみられず部分的に著しい崩壊を起してゐるもの（図27m），胚乳の機能を失つて残存する核が極在してゐるもの（図27n），また全体的に大小さまざまに核が散在してゐる胚乳（図27o）等，種々の異常が観察された。一方4x x 2x では胚の発

速に伴つて、膜形成さし以下胚乳は対照区の胚の発達の18日目或いは21日目と同じように僅か残つてゐるだけであつた。また "basal endosperm" の全部はわけて膜形成をみられた。

18日目と21日目では  $2x \times 4x$  の胚は12日目のものとの発達程度が変わらず、球型と "heart" 型の胚が胚珠中に存在してゐるのがみられた。 $4x \times 2x$  の胚は対照区のものに較べ発達の速度が著しくなつたが、ほとんど成熟した胚を観察され、その大きさは対照区の約半分であつた(図26)。胚乳に關しては  $2x \times 4x$  では種々の異常がみられた。交配後12日目なにして15日目にかけて部分的にみられた胚乳の崩壊消失が全体にわたつて起つてゐるのがみられた(図27p)。また胚乳の崩壊が著しいので既に胚珠中に胚乳の存在してゐるものも観察された。 $4x \times 2x$  ではほとんど成熟した胚のため膜形成を起した胚乳は既にほとんど存在せず、胚珠内部と胚が全部占めてゐるのがみられた。

各交雑における胚乳の発達段階の変化を表  
83にまとめを示す(表83)。

Table 83. Embryo and endosperm development in 3-21 days after pollination in the  $2x$  and  $4x$  parents and their reciprocal hybrids

Cross	Days after pollination					
	3	6	9	12	15	18 and 21
<i>Embryo</i>						
$2x \times 2x$	globular shape		globular~ early "torpedo"		"walking stick"	"upturned U"
$4x \times 4x$	"		"		late "torpedo"	"
$2x \times 4x$	"		globular~ heart shape		globular~ early "torpedo"	
$4x \times 2x$	"		globular~ early "torpedo"		(almost disintegrated) "upturned U"	
<i>Endosperm</i>						
$2x \times 2x$	developing endosperm		initiating cell wall formation		cell wall formation throughout	digested
$4x \times 4x$	"		"		"	"
$2x \times 4x$	developing endosperm		initiating abnormal vacuoles	beginning to collapse	abnormalities of nuclei and cytoplasm	
$4x \times 2x$	"		cell wall formation throughout			digested

## (2) 子房の人工培養

*B. campestris* の2倍体と之の同質4倍体の正  
交雑には、11す"此の組み合わせには  
2も交雑種子は得られず"(Nishiyama and Inomata  
1966)。また *Raphanus sativus* の2倍体と之の同質

4倍体の正交交雑において、 $2x \times 4x$  では交雑種子は得られないが、 $4x \times 2x$  では  $2x \times 2x$  あるいは  $4x \times 4x$  の交配種子の約  $1/4$  の大きさの発芽種子が得られる (Inomata 1970)。また B. campestris と B. oleracea の種間交雑においても種子の発達は途中で止んで不稔種子になる (Håkansson 1956)。Brassica における不稔種子の形成の組み合わせにおいて、子房の発達初期からの人工培養を試み、交雑種子および雑種植物を得た (A-II-iv)。

これらの結果に基づいて、Raphanus sativus においても子房の人工培養を試みた。

### 材料および方法

Raphanus sativus L. 栽培品種、みの早生大根の2倍体と同質4倍体を実験に供した。交配組み合わせは、 $2x \times 2x$ 、 $2x \times 4x$ 、 $4x \times 4x$  および  $4x \times 2x$  の4通り、交配は除雄後2日目には開花した花に、新鮮な花粉を用いて行なった。

子房の人工培養には Nitsch (1951) の基本培地に グリニン, ナイアシン, ピリドキシン, サイアミンを添加したものを基本培地とした (A-II-III)。子房の培養にはこの基本培地に イースト抽出物, カゼイン酸分解物, ココナットミルク等を添加した (表 84)。

Table 84. Composition of media supplemented with yeast extract, casein hydrolysate and coconut milk for culturing ovaries

Basal only	Yeast extract (g/l)		Casein hydrolysate (mg/l)		Coconut milk (%)	
	2	10	300	2000	10	30
B-1	YE-1	YE-2	CA-1	CA-2	CM-1	CM-2

子房の培養時期は, Brassica の場合と同じように交配後 4 日目のものを用いて, 植物体から切り取り, 投蕾後試験管に植之込んだ (図 28)。また植之込んだ後の条件等は A-II IV の場合と同じである。

## 結 果

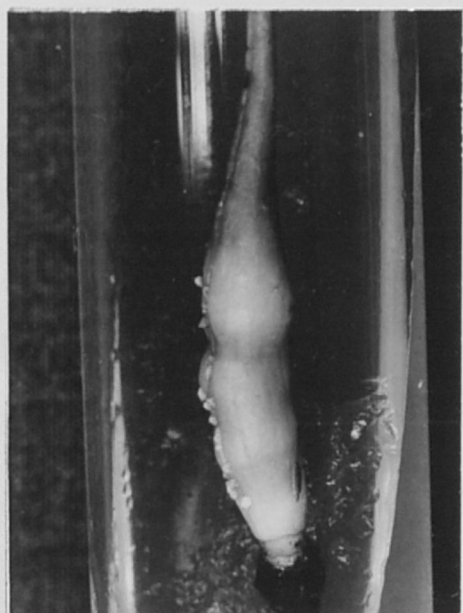


Fig. 28. Explanted ovary in test tube.

自然条件下における交雑結果

自然条件下における交雑結果を表85に示す(表85)。 $2x \times 2x$  においては、莢の長さは61.4 mm といずれの組み合わせよりも長かつた。得られた種子は  $2x \times 2x$  2" 40粒、 $4x \times 4x$  2" 19粒、

$4x \times 2x$  2" 10粒2" あつた。種子稔性は  $2x \times 2x$  と  $4x \times 4x$  はいずれも86%以上であり、 $4x \times 2x$  2"

Table 85. Results of crossing experiments under natural condition

Cross	No. of capsules examined	Av. capsule length (mm)	No. of seeds obtained	Seed set (%)	Seed germination (%)
$2x \times 2x$	11	61.4	40	87.0	92.5
$2x \times 4x$	6	48.5	0	0.0	-
$4x \times 4x$	11	46.5	19	86.4	84.2
$4x \times 2x$	10	39.7	10	47.6	70.0

47.6%と低かつたが、小粒の充實した種子が得られず(図25D)。4x x 2x から得た種子の発芽率は70%とかなり良かった。尚種子稔性は收穫した莢の胎座の数の平均を基礎として求めた。2x と 4x のいずれを母方にしたときにも胎座数を1莢当たり4個とした。

### 培養時における子房の長さ

交配後4日自ら子房を植物体から切り取って人工培養したが、その時の子房の長さを表86.に示す(表86)。2x x 2x と 2x x 4x とにはほぼほとんど差異はなく、4x x 2x は最も長い21.3mm

Table 86. Average length of explanted ovary

Cross	No. of ovaries examined	Av. length of ovary (mm)
2x x 2x	15	15.3
2x x 4x	15	15.9
4x x 4x	16	18.0
4x x 2x	16	21.3

も長い21.3mm

であった。

子房の人工培養

による種子形成

子房の人工培



養による種子形成の結果を表87に示す(表87)。表87-1は $2x \times 2x$ と $2x \times 4x$ の結果で、表87-2は $4x \times 4x$ と $4x \times 2x$ の結果である。各はく個の子房を植えた。平均の莖の長さは $4x \times 2x$ において最も長く、 $4x \times 4x$ で最も短かった。培養基組成の差異による莖の長さの相違はみられなかった。植物体の切り口のカルス形成の程度については図29に示す(図29)。いずれの交配組み合わせについても、ココナットミルクを30%添加した培地では非常に良いカルス形成がみられた。他の培地組成

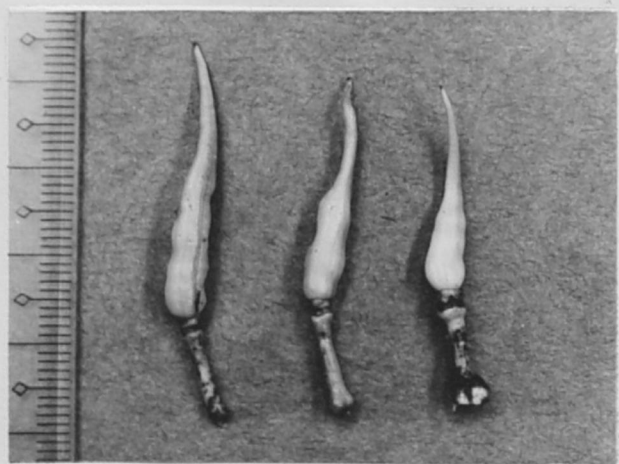


Fig. 29. Callus formation at the cut end of cultured ovaries, left to right; -, +, ++.

の区においては、カルス形成はほとんどみられなかった。種子形成についてもみると、対照区においても種子形成はみられた。

カゼイン酸分解物とココナットミルク

Table 87-1. Effects of yeast extract, casein hydrolysate and coconut milk on cultured ovaries in the cross of  $2x \times 2x$  and  $2x \times 4x$  of Raphanus sativus

Cross	Medium	No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	Av. capsule length (mm)	Av. callus formation	No. of seeds obtained	Seed set (%)	Seed germination (%)
$2x \times 2x$	B-1	7	7	24.4	+	4	14.3	50.0
	YE-1	7	7	21.7	-	0	0.0	-
	YE-2	7	7	21.3	-	0	0.0	-
	CA-1	7	6	26.0	+	0	0.0	-
	CA-2	7	7	25.7	+	0	0.0	-
	CM-1	7	7	21.1	+	2	7.1	50.0
	CM-2	7	7	24.4	+++	2	7.1	50.0
Total		49	48	23.5		8	4.2	50.0
$2x \times 4x$	B-1	7	7	23.9	+	0	0.0	-
	YE-1	7	6	24.7	-	0	0.0	-
	YE-2	7	7	20.3	-	0	0.0	-
	CA-1	7	7	25.1	+	1	3.6	0.0
	CA-2	7	7	30.6	+	0	0.0	-
	CM-1	7	7	27.4	+	0	0.0	-
	CM-2	7	7	24.9	+++	0	0.0	-
Total		49	48	25.3		1	0.5	0.0

1): Refer to Table 84.

Table 87-2. Effects of yeast extract, casein hydrolysate and coconut milk on cultured ovaries in the cross of  $4\bar{x} \times 4\bar{x}$  and  $4\bar{x} \times 2\bar{x}$  of Raphanus sativus

Cross	Medium <sup>1)</sup>	No. of ovaries cultured	No. of ovaries examined	Av. capsule length (mm)	Av. callus formation	No. of seeds obtained	Seed set (%)	Seed Germination (%)
$4\bar{x} \times 4\bar{x}$	B-1	7	7	21.6	-	2	7.1	50.0
	YE-1	7	7	19.1	-	0	0.0	-
	YE-2	7	7	20.9	-	0	0.0	-
	CA-1	7	7	23.0	-	2	7.1	50.0
	CA-2	7	7	21.1	-	1	3.5	100
	CM-1	7	7	22.4	+	1	3.5	100
	CM-2	7	7	24.3	+++	2	7.1	50.0
	Total	49	49	22.7		8	4.1	62.5
$4\bar{x} \times 2\bar{x}$	B-1	7	7	28.1	-	4	14.3	50.0
	YE-1	7	7	27.1	-	2	7.1	50.0
	YE-2	7	7	22.7	-	0	0.0	-
	CA-1	7	7	29.7	-	2	7.1	50.0
	CA-2	7	7	30.4	-	2	7.1	100
	CM-1	7	7	30.1	+	5	17.9	80.0
	CM-2	7	7	31.6	+++	0	0.0	-
	Total	49	49	28.6		15	7.7	66.7

1): Refer to Table 84.

得られ、これに混つて僅か1粒の発芽種子が得られた。その大きさは  $2x \times 2x$  と同じであった。生育した個体の形態的な特徴は全く  $2x$  の親と同じで、花粉母細胞の染色体数からも  $2x$  であることが確認された。このことから、この種子は自殖に由来したものである。

$4x \times 2x$  から得られた種子は両親のものに較べて約  $1/4$  の大きさであった (図25)。得ら

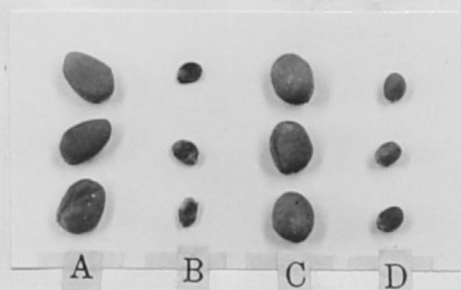


Fig. 25. Seeds produced by artificial pollination

- A: normal seeds from the cross,  $2x \times 2x$ .  
 B: hybrid seeds from the cross,  $2x \times 4x$ , extremely shrivelled.  
 C: normal seeds from the cross,  $4x \times 4x$ .  
 D: viable hybrid seeds from the cross,  $4x \times 2x$ .

れたい種子は皆発芽

し、これから3倍

体雑種が得られた。

莢の長さは、 $2x \times 2x$

が最も長く、 $4x \times 2x$

が最も短かつた。

胚の発達割合の比

較

胚の発達を交配後3日目から21日目までの間にわたって調べた。この研究に用いた胚珠

種子の大きさは対照区の  $2x \times 2x$  と  $4x \times 4x$  に較べて約  $\frac{1}{4}$  であつた。組織学的な観察結果からこの種子は雑種胚の大きさによることが明らかになつた。種子発生の過程において、胚乳の塊形成が対照のそれより早く起る以外は、特別の異常胚にも胚乳にもみられなかつた。

逆交雑の  $2x \times 4x$  にあつては、胚の発達は交配後12日目までは他の交雑した個体の胚の発達と同じようであつたが、これ以後になつて発達は完全に止まつてしまつた。胚乳の異常は交配後9日目から起るということが分かつた。この結果から  $2x \times 4x$  における胚の発達の停止は胚乳の異常発達に起因してゐると考えられる。

$4x \times 2x$  の交雑では、胚乳の塊形成は両親の交配 ( $2x \times 2x$ ,  $4x \times 4x$ ) よりも早く起るということが認められたが、Brassica の同じ  $4x \times 2x$  の交雑においても同じ現象がみられる (Nishiyama and Inomata 1966)。Raphanus の交雑胚の発達割合は、発達初期においては Brassica のそれと同じであ

つたが、これ以後では Raphanus の胚の方が Brassica よりもより発達を示した (Nishiyama and Inomata 1966)。Raphanus の胚乳の発達は Brassica のそれより全段階と通して速く、発達する胚乳の核を数えることは困難であった。

Avena strigosa ( $2n=14$ ) と A. fatua ( $2n=42$ ) の間の正交交雑の研究から、Kihara and Nishiyama (1932) は、雄の配偶子が雌のそれよりも高い染色体を持つてゐるとすれば、過剰の刺激力 "stimulative strength" が受精した卵や極核の体細胞分裂を始動させる。その結果胚乳や胚の核分裂が異常な速度で起る。一方雄の配偶子が雌のそれよりも低い染色体数を持つ場合 (A. fatua x A. strigosa) には "stimulative strength" が少ないので、胚や胚乳の生育が抑えられると考えた。こゝで行なつた Raphanus の正交交雑では、胚の初期の発達について "stimulative strength" を支持する結果は得られなかつた。しかしこの交雑において胚の発達には差がみられるなかつた。また胚の大きさは交配後15日目までは全く対

照<sub>2</sub> ( $2x \times 2x$ ,  $4x \times 4x$ ) と変わりらず、これ以後になつて生育に大きな変化がみらるゝので、これは配根子の直接的な刺激作用によると思われ得る。

胚のうに挿した胚珠皮組織の異常増殖のためには種子の胚発生の途中に崩壊が起る "somatoplastic sterility" が Medicago (Brink and Cooper 1939), Lycopersicon pimpinellifolium の 2 倍体と同値 4 倍体の交雑 (Cooper and Brink 1945) や Frimula の種間雑種の胚発生 (Woodel 1960a, b) にもおいて報告されてゐる。また Datura の或る交雑では、胚乳に腫瘍が出来るだけ胚珠皮を埋め尽くしてしまつて、不稔種子になることが報告されてゐる (Satina et al. 1950, Sansome et al. 1942)。ここで行なつた Raphanus sativus の 4 つの交配の研究では胚のうの内皮の異常増殖や胚乳の腫瘍化を起すものはみつからなかつた。

Lilium と Hyacinthus の胚発生で、胚乳の染色体切断が雑種にあつては頻繁に、自家稔性の交配にあつては時々出現して、稔性が低くなる

ことが報告されている (Brock 1954a, b, 1955)。  
 また Triticum の正逆交雑 (Wakakuwa 1937), Aegilops  
 の正逆交雑 (Katayama 1933) と Hordeum jubatum ( $2n=28$ )  
 x Secale cereale ( $2n=14$ ) (Cooper and Brink 1944) の交  
 雑等の胚乳で、胚乳の異常、染色体橋、高倍  
 数性を持つ小粒の出現による不稔現象が報告  
 されている。 Raphanus の正逆交雑の一つ ( $2x \times 4x$ )  
 においては、胚乳の異常、高倍数性と思われ  
 る核が、胚乳の崩壊と共に観察された。

Brassica においてはみられた胚乳の空胞化にひき  
 続いた起る若しは崩壊 (Nishiyama and Inomata  
 1966) は Raphanus のこの交雑不適合種子の発生学  
 的研究ではみられなかった。胚の発達も  
Brassica の交雑胚よりも Raphanus のそれの方が良  
 かったし、胚乳の空胞化に続いた起る胚乳  
 の異常もむしろ軽度のものであった。

### 子房の人工培養

Raphanus sativus L. の2倍体と同質4倍体の正  
 逆交雑においては、通常  $2x \times 4x$  では種子が得  
 られないが、 $4x \times 2x$  では小粒の充実した発芽



する種子が得られる (Inomata 1970)。この組織学的存在については胚乳生学的研究によると、 $2x \times 4x$  の種子形成が止まるのと、 $4x \times 2x$  にはおいて種子形成が進行する現象は、Brassica campestris の二倍体と同様4倍体の間の正逆交雑にはおいてみられる現象と類似してゐた (Nishiyama and Inomata 1966)。しかし Brassica の  $4x \times 2x$  にはおいては、Raphanus のように種子形成はなく、三倍体種子は出来な。

Brassica の  $2x$  と  $4x$  の正逆交雑における種子崩壊の研究に基づいて、交雑種子をつくる試みを行ない、子房の人工培養によつて三倍体雑種を育成することができた (Inomata 1968)。この方法により Raphanus sativus の二倍体と4倍体の交雑から三倍体雑種種子の育成を試みた。 $2x \times 4x$  にはおいては1粒の種子をカゼイン酸分解物 (300mg/l) を添加した区にはおいては、不発芽であった。逆交雑の  $4x \times 2x$  では、 $2x \times 2x$  あるいは  $4x \times 4x$  よりもよい種子形成がみられた。これは種子の大きさが  $2x \times 2x$  あるいは  $4x \times 4x$  のと

れより約  $\frac{1}{4}$  小すゝ完熟種子が得られそので人工培養による種子形成におゝては、栄養的に3倍体種子の方が条件が良ゝと思われゝる。

$2x \times 4x$  では発芽する種子が得られなかつたが、更に詳細な実験を行なゝと発芽可能な交雑種子が得られゝるかもしれなゝ。

#### IV 摘 要

十字花科作物の交雑不適合性を研究するたゝめに、(i) 2倍体と同價4倍体の間の正逆交雑における種子崩壊の現象と、Brassica campestris と Raphanus sativus を用ゝて組織学的並に胚発生学的に追求した。(ii) この種子崩壊の現象を調べた結果に基づゝて、雑種個体を得る目的で胚培養、胚珠培養、更には子房の人工培養を試み、培養基組成の検討を行なつた。(iii) この人工培養によつて得た雑種の結果、Brassica 属の種間交雑に応用し、雑種作成を試みた。(iv) さらに子

房の人工培養に関する基礎的研究を行なつた。特に無機塩濃度、糖濃度、物理的要因、或いは子房の植之込み時期の違いによる種子形成差異について調べた。(V) また2倍体と4倍体の正逆交雑における交雑不和性の遊離アミノ酸の消長を調べた。

実験に用いた材料は Brassica campestris L. ssp. chinensis (L.) Makino 3品種, B. campestris L. ssp. pekinensis (Lour.) Olsson 5品種, B. campestris L. ssp. rapifera (Metzg) Sinsk. 2品種, B. campestris L. ssp. oleifera (Metzg) Sinsk. 1品種, B. oleracea L. var. capitata DC. 4品種と Raphanus sativus L. の4品種があつた。

Brassica campestris の2倍体と同質4倍体の間の交雑で胚乳生の過程を調べると、 $2x \times 4x$  では、胚乳の膜形成が押えられ、種々の核の異常をもたらす胚乳の空胞化が現われ、胚乳の崩壊がみられた。  $4x \times 2x$  では、胚乳の発達はややかつたが、膜形成はいずれの組み合わせよりも早かつた。その後、胚乳の崩壊が起こつ

下。正逆交雑における胚の発達程度はいずれも球型期までで止まつた。

Raphanus sativus の 2 倍体と同質 4 倍体の間の交雑における胚発生の過程に関しては、 $2x \times 4x$  では、B. campestris の場合と同じように胚乳の膜形成は押えられ、種々の核の異常をもたらし、崩壊した。が、 $4x \times 2x$  では胚乳の発達は強く膜形成がいずれの組み合わせよりも早くみられた。しかし、胚乳も胚も順調に発達し、小粒の発育する種子が得られた。

Brassica campestris の 2 倍体と同質 4 倍体の正逆交雑における交雑不稔から、生育出来る種子を得る目的で胚珠の人工培養を試みた。この胚珠の発達途中における組織学的な観察を培養後 6 日目（交配後 15 日目）に行なつた。異常な胚や未分化の胚と、異常な胚柄が見出された。膜形成を起した、或いは未だ起さずもない胚乳も或る胚珠にみられたが、大抵の胚珠には胚乳はほとんど存在しなかつた。

B. campestris の 2 倍体と同質 4 倍体の正逆交

雑の不稔性を克服するため交配後4日目に植  
 物体から切り取り胚子房の人工培養を試みた。  
 この胚珠の培養途中における組織学的観察は  
 培養後11日目(交配後15日目)に行なつた。  
 この結果、培地に添加した成長調整物質(IAA,  
 カイネチン, ジベレリン)は胚, 胚乳や胚珠  
 の培養と余り強い関係を示さなかつた。しかし  
 なから、栄養物として添加したイースト抽出  
 物, トマトジュース, カゼイン酸分解物, コ  
 コナットミルク等は、その添加されたもの  
 により、胚, 胚乳や胚珠の培養に差異がみら  
 れた。胚の最も良い培養のものでは、異質足  
 や交配組み合わせに關係なく、自然条件下にお  
 けるよりも3日から1週間早い培養を示した。  
 培養の遅れをみる胚珠にあつては、胚・胚乳  
 の異常が観察された。

B. campestris の2倍体と同質4倍体の間の交  
 雑は不稔に存るが、これは主に胚乳の培養の  
 異常に依ると考えられたので、胚乳の崩壊に  
 ともなつて胚の崩壊が起る以前に、胚珠が

ら胚を取り出し、胚の人工培養を試み、雑種個体を得た。培地には "embryo factor" として Lupinus luteus の未熟種子から抽出した抽出物を加えた。得られた雑種個体は正逆交雑とも、葉の型、厚さ、表面など両親の中間の形態を示し、おのれの雑種も類似してゐた。

また B. campestris の2倍体と同価4倍体の正逆交雑から、雑種種子を得る目的で胚珠の人工培養をこころみた。植へた人工培地は Nitsch に IAA, カイネチン, ジベレリン, トマトジューズ, イースト抽出物等を添加したものであつて、交配後9日目の胚珠を植へた。生育可能な種子はどの培養基組成の区からも得られなかつた。これは胚珠の発達初期に胚珠と胚珠柄から離すことによる悪影響によると思われた。

更に B. campestris の2倍体と同価4倍体の交雑不適合性の子房の人工培養をこころみた。基本培地は Nitsch 2, 茲に生長調整物質 (IAA, カイネチン, ジベレリン) と栄養物質 (

トマトジュース, イースト抽出物, カゼイン酸分解物, ココナットミルク) を種々の濃度で添加し, 交配後4日目の子房を植え込んだ。種子形成は生長調整物質には影響されなかったが, 栄養物質の影響がみられた。4x x 2x の組み合わせから雑種はイースト抽出物(1個体), カゼイン酸分解物とココナットを含む区(1個体)の培養基から, 2x x 4x の雑種はココナットミルク単独添加培地(2個体)から得られた。交雑組み合わせによつて得られた雑種の培地組成が異なるので, 正逆交雑によつて栄養要求性が異なると考えられた。得られた雑種は, 形態的に「いずれも類似して」て, 両親の中間形質を示した。

B. campestris の2倍体と同質4倍体の交雑不適合性の子房の人工培養では, 栄養物を添加したものに於いては種子形成に差異がみられたので, 更にこの関係を調べるために, ココナットミルク, カゼイン酸分解物とイースト抽出物の三者を用いて, 各々2つずつの組

みなせの種々の濃度において、種子形成を検討した。カゼイン酸分解物とココナットミルクを組み合せた実験区では種子形成は良好であり、その実験区からは  $2x \times 4x$  と  $4x \times 2x$  の交雑種子が得られた。他の栄養物の組み合わせでは良好な種子形成はみられなかった。また  $4x \times 2x$  の胎座に付着した胚のみ発達してゐるもののみ見られた。

交雑不和合の子房の人工培養において、更に適した培地の検討を行なうべくカゼイン酸分解物とココナットミルクの濃度効果を調べた。カゼイン酸分解物は  $0 \text{ mg/l} \sim 500 \text{ mg/l}$  が良く、ココナットミルクは  $0 \sim 15\%$  が良かった。

B. campestris 群と B. oleracea 群の間の正逆交雑においても交雑不和合性の現象がみられる。これについて2倍体と4倍体の雑種を得るために行なつた子房の人工培養を用いた。B. campestris 群を母系に用いたものでは、交雑種子が得られ、そこから雑種個体を育成する。



とができました。さらに莖の中には "torpedo" 型から完全に発達したもののまで、種々の発達段階の胚が胚柄に付着しているのがみられました。これを培養して、生育させたところから最も多数体 ( $2n=19$ ) であった。これらの組み合わせから得られた植物個体のうち生育したものは全部で 19 個体であった。逆交雑の B. oleracea 群と母系にしたものでは、胚の発達は胚珠の発達初期で停止してしまつたような批が多数得られました。雑種は 11 個の組み合わせから得られた。

Raphanus sativus L. の 2 倍体と同質 4 倍体の逆交雑の子房の人工培養に関しては、 $4x \times 2x$  だけは  $2x$  および  $4x$  の自殖したもののよりも良い種子形成がみられました。これは  $4x \times 2x$  の種子は対照且の種子の約  $\frac{1}{4}$  の大きさで発熟するためと思われました。 $2x \times 4x$  だけはカゼイニ酸分解物を含む培地においし 1 粒種子が得られなかった。

更に子房の人工培養における生理学的な研究

究を行なつた。用いた材料は今まで用いたものと同じ *B. campestris* の 2 倍体と同價 4 倍体で、White, Nitsch, Heller と Murashige and Skoog の無機塩を基培地とし、White と Morel の有機物、これに両者を合わせたものを添加して実験区を設け、種子形成を調べた。一般的に言えることは、*B. campestris* の子房の人工培養では、無機塩の濃度のうち White や Nitsch の培地が良く、有機物を添加しないうちのものでも種子形成がみられ、添加物の種類が多くなると、種子形成率は低くなる傾向を示した。

培地に添加した糖濃度の種子形成に及ぼす効果に関しては、 $2x \times 2x$  では 3% のとき、 $4x \times 4x$  では 5% のときが最も良かった。

光の条件については 300-500 ルクスの方が最も良く、暗黒状態やより明るい条件下では種子形成率は低下した。

植之込み時期による種子稔性の変化を知るために、交配後日を遡って 1 日目から 10 日目までの子房を植之込んだ。 $2x \times 2x$  と  $4x \times 4x$

では種之辻を月か運れ子に於て、種子毒性が順次上昇した。

B. campestris の2倍体と同量4倍体の正逆交雑の交雑不適合性における遊離アミノ酸の消長を調べた。その結果、種子の崩壊が進行するとメチオニンとバリン、とロイシンの増加がみられ、その増加は  $2x \times 4x$   $4x \times 2x$  のいずれの組み合わせにおいても同様の傾向を示した。

## 謝 辞

この研究の計画と遂行は京都大学名誉教授西山市三博士の指導のもとで始め、京都大学教授常脇恒一郎博士の指導も役けた。また、同博士には本論文の原稿について助言と校閲を頂いた。こゝに謝意を表す。

この研究を行なうに当り京都大学農学部実験遺伝学研究室のオノと、大阪府立大学教授中尾佐助博士をはじめとする遺伝育種学研究室のオノの援助と協力を得たので感謝する。

## 引用文献

- Beamish, K. I., 1955 Seed failure following hybridization between the hexaploid Solanum demissum and four diploid Solanum species. *Am. J. Botan.* 42: 297-304.
- Blakely, L. M., and F. C. Steward, 1961 Growth induction in cultures of Haplopannus gracilis. I. The behaviour of the cultured cells. *Am. J. Botan.* 48: 351-358.
- Blakeslee, A. F., and S. Satina, 1944 New hybrids from incompatible crosses in Datura through culture of excised embryos on malt media. *Science* 99: 331-334.
- Boyes, J. W., and W. P. Thompson, 1937 The development of endosperm and embryo in reciprocal interspecific crosses in cereals. *J. Genet.* 34: 203-227.
- Brink, R. A., and D. C. Cooper, 1939 Somatoplastic sterility in Medicago sativus. *Science* 90: 545-546.
- Brink, R. A., and D. C. Cooper, 1947 The endosperm in seed development. *Bot. Rev.* 13: 423-477.
- Brink, R. A., D. C. Cooper, and L. E. Ausherman, 1944 A hybrid between Hordeum jubatum and Secale cereale. *J. Heredity* 35: 67-75.
- Brock, R. D., 1954a Fertility in Lilium hybrids. *Heredity* 8: 409-420.
- Brock, R. D., 1954b Spontaneous chromosome breakage in Lilium endosperm. *Ann. Botan.* 18: 7-14.
- Brock, R. D., 1955 Chromosome balance and endosperm failure in hyacinths. *Heredity* 9: 199-222.
- Caplin, S. M., and F. C. Steward, 1948 Effect of coconut milk on the growth of explants from carrot root. *Science* 108: 655-657.
- Chopra, R. N., and P. S. Sabharwal, 1963 In vitro culture of ovules of Gynandropsis gynandra (L.) Briq. and Impatiens balsamina L. *Plant Tissue and Organ Culture. A symposium. Int. Soc. of Plant Morphologists. Univ. of Delhi* pp. 257-264.
- Consden, R., A. H. Gardon, and A. J. P. Martin, 1944 Qualitative analysis of proteins: A partition chromatographic method using paper. *Biochem. J.* 38: 224-232.

- Cooper, D. C., 1951 Caryopsis development following matings between diploid and tetraploid strains of Zea mays. Am. J. Botan. 38: 702-708.
- Cooper, D. C., and R. A. Brink, 1940 Somatoplastic sterility as a cause of seed failure after interspecific hybridization. Genetics 25: 594-617.
- Cooper, D. C., and R. A. Brink, 1944 Collapse of seed following the mating of Hordeum jubatum x Secale cereale. Genetics 29: 370-390.
- Cooper, D. C., and R. A. Brink, 1945 Seed collapse following mating between diploid and tetraploid races of Lycopersicon pimpinellifolium. Genetics 30: 376-401.
- Das, N. K., K. Patau, and F. Skoog, 1956 Initiation of mitosis and cell division by kinetin and indole acetic acid in excised tobacco pith tissue. Physiol. Plant. 9: 640-651.
- Dulieu, H. L., 1966 Pollination of excised ovaries and culture of ovules of Nicotiana tabacum L. Phytomorphol. 16: 69-75.
- Duvick, D. N., 1952 Free amino acids in the developing endosperm of maize. Amer. J. Bot. 39: 656-661.
- Fukasawa, H., 1954 On the free amino acids in anthers of male-sterile wheat and maize. Japan J. Genetics 29: 135-137.
- Gautheret, R. J., 1950 Remarques sur les besoins nutritifs des cultures de tissus de Salix caprea. C. R. Soc. Biol. 144: 173-174.
- Gautheret, R. J., 1959 La culture des tissus végétaux. Masson Cie, Paris. pp. 863.
- Greulach, V. A., and J. G. Haesloop, 1958 The influence of gibberellic acid on cell division and cell elongation in Phaseolus vulgaris. Am. J. Botan. 45: 566-570.
- Guha, S., and B. M. Johri, 1966 In vitro development of ovary and ovule of Allium cepa L. Phytomorphol. 16: 353-364.
- Håkansson, A., 1953 Endosperm formation after 2x, 4x crosses in certain cereals, especially in Hordeum vulgare. Hereditas 39: 57-64.
- Håkansson, A., 1956 Seed development of Brassica oleracea and B. rapa after certain reciprocal pollinations. Hereditas 42: 373-396.

- Håkansson, A., and S. Ellerström, 1950 Seed development after reciprocal crosses between diploid and tetraploid rye. *Hereditas* 36: 256-296.
- Heller, R., 1953 Recherches sur la nutrition minérales des tissus végétaux cultivés in vitro. *Ann. Sc. Nat. Bot. Biol. Vég.* 14: 1-223.
- Hoffmann, W., and R. Peters, 1958 Versuche zur Herstellung synthetischer und semi synthetischer Rapsformen. *Züchter* 28: 40-51.
- Hosoda, T., 1961 Studies on the breeding of new types of Napus crops by means of artificial synthesis in genomes of genus Brassica. *Bull. of Fac. of Agric. Tokyo Kyoiku Univ.* 7: 1-94. (in Japanese with English summary).
- Howard, H. W., 1939 The size of seeds in diploid and autotetraploid Brassica oleracea L. *J. Genet.* 38: 325-340.
- Inomata, N., 1967 Production of triploid hybrids of Brassica by embryo culture. *Japan J. Breeding* 17: 266-269.
- Inomata, N., 1968 In vitro culture of ovaries of Brassica hybrids between 2x and 4x. I. Cultured medium. *Japan J. Breeding* 18: 139-148.
- Inomata, N., 1970 Development of endosperm and embryo in reciprocal crosses between 2x and 4x in Raphanus sativus. *Japan J. Genetics* 45: 173-182.
- Jaranowski, J., 1962a Development of embryos and seeds of certain species and species crosses in Melilotus. *Genetica Polonica* 3: 45-59.
- Jaranowski, J., 1962b Fertilization and embryo development in the genus Lupinus. *Genetica Polonica* 3: 204-246.
- Jaranowski, J., 1962c Fertilization and embryo development in the genus Lupinus Tourn. Part II. Fertilization and embryo development following reciprocal, species hybridization. *Genetica Polonica* 3: 333-368.
- Jaranowski, J., and B. Wojciechowska, 1963 Cytological studies in the genus Lotus. Part II. Embryology of interspecific cross L. corniculatus x L. tenuifolius. *Genetica Polonica* 4: 277-292.

- Johri, B., and C. B. Sehgal, 1963 Growth of ovaries of Anethum graveolens L. Plant Tissue and Organ Culture. A symposium. Int. Soc. of Plant Morphologists. Univ. of Delhi. pp. 245-256.
- Kameya, T., K. Hinata, and U. Mizushima, 1966 Fertilization in vitro of excised ovules treated with calcium chloride in Brassica oleracea L. Proc. Japan Acad. 42: 165-167.
- Kaneko, K., 1957 Studies of the embryo culture on the interspecific hybridization of Chrysanthemum. Japan J. Genetics 32: 300-305. (in Japanese with English summary).
- Kanta, K., and P. Maheshwari, 1963a Intraovarian pollination in some Papaveraceae. Phytomorphol. 13: 215-229.
- Kanta, K., and P. Maheshwari, 1963b Test-tube fertilization in some angiosperms. Phytomorphol. 13: 230-237.
- Karpechenko, G. D., 1922 The number of chromosomes and the genetic correlation of cultivated Cruciferae. Bull. Appl. Bot. and pl. Breed. 13: 1-14.
- Katayama, Y., 1933 Crossing experiments in certain cereales, with special reference to different compatibility between the reciprocal crosses. Mem. Coll. Agric., Kyoto Imp. Univ. 27: 1-75.
- Kihara, H., and I. Nishiyama, 1932 Different compatibility in reciprocal crosses of Avena, with special reference to tetraploid hybrids between hexaploid and diploid species. Japan J. Botany 6: 245-305.
- Koch, H., und R. Peters, 1953 Neu Gesichtspunkte der Rapszüchtung. Wiss. Z. Martin Luther Univ. 2: 363-367.
- Konzak, C. F., L. F. Randolph, and N. F. Jensen, 1951 Embryo culture of barley species hybrids. Cytological studies of Hordeum sativum x Hordeum bulbosum. J. Heredity 42: 124-134.
- La Croix, L. J., J. Naylor, and E. N. Larter, 1962 Factors controlling embryo growth and development in barley (Hordeum vulgare L.). Cand. Jour. Bot. 40: 1515-1523.
- Laibach, F., 1925 Das Taubwerden der Bastardsamen und die künstliche Aufzucht früh absterbender Bastardembryonen. Zeitschr. f. Bot. 17: 417-459.

- Laibach, F., 1929 Ectogenesis in plants: methods and genetic possibilities of propagating embryos otherwise dying in the seed. *J. Heredity* 20: 201-208.
- Ledingham, G. F., 1940 Cytological and developmental studies of hybrids between Medicago sativus and a diploid form of M. falcata. *Genetics* 25: 1-15.
- Lee, J. H., and D. C. Cooper, 1958 Seed development following hybridization between diploid Solanum species from Mexico, Central and South America. *Am. J. Botan.* 45: 104-110.
- Linsmaier, E. M., and F. Skoog, 1965 Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 18: 100-127.
- Maheshwari, N., 1958 In vitro culture of excised ovules of Papaver somniferum. *Science* 127: 342.
- Maheshwari, N., and M. Lal, 1961 In vitro culture of excised ovules of Papaver somniferum. *Phytomorphol.* 11: 307-314.
- Matsubara, S., 1962 Studies on a growth promoting substance, "embryo factor", necessary for the culture of young embryos of Datura tatula in vitro. *Bot. Mag. (Tokyo)* 75: 10-18.
- Matsubara, S., 1964 Effect of Lupinus growth factor on the in vitro growth of various plants and carrot root tissue. *Bot. Mag. (Tokyo)* 77: 403-411.
- McLean, S. W., 1945 New hybrids with the aberrant species Datura ceratocaula, secured by embryo dissection. *Genetics* 30: 14-15.
- McLean, S. W., 1946 Interspecific crosses involving Datura ceratocaula obtained by embryo dissection. *Am. J. Botan.* 33: 630-638.
- Mizushima, U., 1950 On several artificial allopolyploids obtained in the tribe Brassica of Cruciferae. *Tohoku J. Agric. Res.* 1: 15-27.
- 水島亨三郎, 1952 アブラナ類の核遺伝学的研究. Brassica (アブラナ類)の種属間交雑とその倍散誘導体の核遺伝学的研究. 技報堂 pp. 112.
- Monnier, M., 1968 Comparaison du développement des embryons immatures de Capsella Bursa-pastoris, in vitro et in situ. *Bull. Soc. bot. Fr.*, 115: 15-29.



- Morel, G., 1948 Recherches sur la culture associée de parasites obligatoires et de tissus végétaux. Ann. Epiphyt. N. S. 14: 123-234.
- Morinaga, T., 1929 The cytology of  $F_1$  hybrids of B. napella and various other species with ten chromosomes. Cytologia 1: 16-27.
- Morinaga, T., and E. Fukushima, 1930 Another new chromosome number in Brassica. Bot. Mag. (Tokyo) 44: 373-374.
- Morinaga, T., 1934 Interspecific hybridization in Brassica. VI. The cytology of  $F_1$  hybrids of B. juncea and B. nigra. Cytologia 6: 62-67.
- Moue, T., and K. Murakami, 1965 Studies on interspecific hybridization between Brassica pekinensis Rupr. and B. oleracea var capitata L. I. Morphological observation of seed sterility in the reciprocal crosses. Japan J. Breeding 15: 209.
- Müntzing, A., 1930 Über Chromosomenvermehrung in Galeopsis Kreuzungen und ihre phylogenetisch Bedeutung. Hereditas 14: 153-172.
- Müntzing, A., 1933 Hybrid incompatibility and the origin of polyploidy. Hereditas 18: 33-55.
- Murashige, T., and F. Skoog, 1962 A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497.
- Nagai, K., and T. Sasaoka, 1930 The number of chromosomes in the cultivated Brassica. Japan J. Genetics 5: 151-158.
- Nakajima, T., 1962 Physiological studies of seed development, especially embryonic growth and endosperm development. Bull. Univ. Osaka Pref., Ser. B 13: 13-48.
- 中島哲夫, 1970 胚珠培養と育種. 育種学 最近の進歩 第11集. 学術書出版会, pp. 53-59.
- Nakajima, T., and H. Morishima, 1958 Studies on embryo culture in plants. II. Embryo culture interspecific hybrids in Oryza. Japan J. Breeding 8: 37-42. (in Japanese with English summary).
- 中島哲夫, 松本弘, 1969 P<sub>2</sub>-P<sub>1</sub>のほかに胚培養における胚座の役割. 園芸学会秋季大会 研究発表要旨. 266-267.

- Nakajima, T., Y. Doyama, and H. Matsumoto, 1969 In vitro culture of excised ovules of white clover, Trifolium repens L. Japan J. Breeding 19: 373-378.
- 中尾佐助, 水本陽子, 1969 Petunia の胚珠培養  
に関する基礎研究. 近畿作物育種談話会  
報 14: 9-16.
- 日本化学会編, 1957 実験化学講座 23.  
丸善. pp. 602.
- Nishi, S., J. Kawata, and M. Toda, 1959 On the breeding of interspecific hybrids between two genomes, "c" and "a" of Brassica through the application of embryo culture techniques. Japan J. Breeding 8: 215-222. (in Japanese with English summary).
- Nishi, S., J. Kawata, and M. Toda, 1962 Studies on the embryo culture in vegetable crops. II. Breeding of interspecific hybrids between cabbage varieties and chinese cabbage varieties through the application of embryo culture techniques. Bull. Hort. Res. Stat. Hiratsuka Japan A. No. 1: 111-156. (in Japanese with English summary).
- Nishikawa, K., 1959 Studies on abnormal seed development following incompatible crosses, I. Abnormal development of the endosperm and activity of growth substance in Aegilops squarrosa x Triticum dicoccum. Seiken Zihō 10: 84-94. (in Japanese with English summary).
- Nishiyama, I., 1952a Polyploid-studies in the Brassicaceae, I. The seed development in reciprocal crosses between diploid and tetraploid Raphanus. Mem. Res. Inst. Food Sci. Kyoto Univ. 3: 1-7.
- Nishiyama, I., 1952b Polyploid-studies in the Brassicaceae, II. Free crossing between 2x- and 4x- varieties in Raphanus sativus. Mem. Res. Inst. Food Sci. Kyoto Univ. 3: 8-14.
- 西山市三編, 1961 新編細胞遺伝学研究法. 養賢堂  
pp. 547.
- Nishiyama, I., and Y. Inamori, 1952 Studies on artificial polyploid plants, XVII. On the occurrence of unexpected 4x-hybrids from the cross 2x x 4x in Brassica. Bull. Res. Inst. Food Sci. Kyoto Univ. 10: 99-106.

- Nishiyama, I., and Y. Inamori, 1953 Polyploid studies in the Brassicaceae, IV. Hybridization between diploid Brassica species ( $2n=2C$ ) and their autotetraploids. Mem. Res. Inst. Food Sci. Kyoto Univ. 5: 1-13.
- Nishiyama, I., and N. Inomata, 1966 Embryological studies on cross-incompatibility between  $2x$  and  $4x$  in Brassica. Japan J. Genetics 41: 27-42.
- Nitsch, J. P., 1951 Growth and development in vitro of excised ovaries. Am. J. Botan. 38: 566-577.
- Nitsch, J. P., 1954 Action du jus de tomate sur la croissance de certains tissus et organes végétaux. Bull. Soc. bot. Fr. 101: 433-440.
- Nitsch, J. P., 1963 The in vitro culture of flowers and fruits. Plant Tissue and Organ Culture. A symposium. Inst. Soc. of Plant Morphologists. Univ. of Delhi. pp. 193-214.
- Norstog, K., 1961 The growth and differentiation of cultured barley embryos. Am. J. Botan. 48: 876-884.
- Olsson, G., 1954 Crosses within the campestris group of the genus Brassica. Hereditas 40: 398-418.
- Ranga Swamy, N. S., 1959 Morphogenetic response of Citrus ovules to growth adjvants in culture. Nature 183: 735-736.
- Rappaport, J., S. Satina, and A. F. Blakeslee, 1950 Extracts of ovular tumours and their inhibition of embryo growth in Datura. Am. J. Botan. 37: 586-595.
- Rietsema, J., S. Satina, and A. F. Blakeslee, 1953 The effect of sucrose on the growth of Datura stramonium embryos in vitro. Am. J. Botan. 40: 538-545.
- Rudorf, W., 1950 Über der Erzeugung forschung und die Eigenschaften synthetischer Rapsformen. Z. Pflanzenz. 29: 35-54.
- Sabaharwal, P. S., 1963 In vitro culture of ovules, nucelli and embryos of Citrus reticulata Blanco. var. Nagpuri. Plant Tissue and Organ Culture. A symposium. Inst. Soc. of Plant Morphologists. Univ. of Delhi. pp. 265-274.
- Sachar, R. C., and M. Kapoor, 1959 In vitro culture of ovules of Zephyranthes. Phytomorphol. 9: 147-156.

- Sachet, M., 1948 Fertilization in six incompatible species crosses of Datura. Am. J. Botan. 35: 302-309.
- Sachs, R. M., and A. Lang, 1957 Effect of gibberellin on cell division in Hyoscyamus. Science 125: 1144-1145.
- Sachs, R. M., C. F. Brets, and A. Lang, 1959 Shoot histogenesis: the early effects of gibberellin upon stem elongation in two rosette plants. Am. J. Botan. 46: 376-384.
- Sansome, E. S., S. Satina, and A. F. Blakeslee, 1942 Disintegration of ovules in tetraploid-diploid and in incompatible species crosses in Datura. Bull. Torrey Bot. Club 69: 405-420.
- Sanders, M. E., 1948 Embryo development in four Datura species following self and hybrid pollinations. Am. J. Botan. 35: 525-532.
- Sanders, M. E., 1950 Development of self and hybrid embryos in artificial culture. Am. J. Botan. 37: 6-15.
- Sanders, M. E., and P. R. Burkholder, 1948 Influence of amino acids on growth of Datura embryos in culture. Proc. Nat. Acad. Sci. 34: 516-526.
- Sarashina, M., 1964 Studies on the breeding of artificially synthesized rape (Brassica napus). I. F<sub>1</sub> hybrids between B. campestris group and B. oleracea group and the derived F<sub>2</sub> plants. Japan J. Breeding 14: 226-237. (in Japanese with English summary).
- Satina, S., and A. F. Blakeslee, 1935 Fertilization in the incompatible cross Datura stramonium x D. mentel. Bull. Torrey Bot. Club 62: 301-312.
- Satina, S., J. Rappaport, and A. F. Blakeslee, 1950 Ovular tumours connected with incompatible crosses in Datura. Am. J. Botan. 37: 576-586.
- Schroeder, C. R., and D. Spector, 1957 Effect of gibberellic acid and indoleacetic acid on growth of excised fruit tissue. Science 126: 701-702.
- Shantz, E. M., and F. C. Steward, 1959 Investigation on growth and metabolism of plant cells, VII. Sources of nitrogen for tissue cultures under optimal conditions for their growth. Ann. Bot. N. S. 23: 371-390.
- 柴田村治, 1957 1°-1°-クロマトグラムによる實際. 芸文社版  
pp. 149.

- Shimotomai, N., 1925 A karyological study of Brassica.  
I. Bot. Mag. (Tokyo) 39: 121-127.
- Shivanna, K. R., 1965 In vitro fertilization and seed formation in Petunia violacea Lindl. Phytomorphol. 15: 183-185.
- Skirm, G. M., 1942 Embryo culturing as an aid to plant breeding. J. Heredity 33: 210-215.
- Skoog, F., and C. O. Miller, 1957 Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. Symp. Soc. Exptl. Biol. 11: 118-131.
- Smith, P. G., 1944 Embryo culture of a tomato species hybrid. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 44: 413-416.
- Solomon, B., 1950 Inhibiting effects of autoclaved malt preventing the in vitro growth of Datura embryos. Am. J. Botan. 37: 1-5.
- Spoerl, E., 1948 Amino acids as sources of nitrogen for orchid embryos. Am. J. Botan. 35: 88-95.
- Stokes, G. W., 1955 Seed development and failure in horseradish. J. Heredity 46: 15-21.
- Straus, J., and C. D. LaRue, 1954 Maize endosperm tissue grown in vitro, I. Culture requirements. Am. J. Botan. 41: 687-694.
- Tabata, M., and F. Motoyoshi, 1965 Hereditary control of callus formation in maize endosperm cultured in vitro. Japan J. Genetics 40: 343-355.
- Thompson, W. P., 1930 Shrivelled endosperm in species crosses in wheat, its cytological causes and genetical effects. Genetics 15: 99-113.
- Torrey, J. G., and Y. Shigemura, 1957 Growth and controlled morphogenesis in pea root callus tissue grown in liquid media. Am. J. Botan. 44: 334-344.
- Tulecke, W., 1957 The pollen of Ginkgo biloba: in vitro culture and tissue formation. Am. J. Botan. 44: 602-608.
- U. N., 1935 Genom-analysis in Brassica with special reference to the experimental formation of B. napus and peculiar mode of fertilization. Japan J. Bot. 7: 389-452.
- Van Overbeek, J., M. E. Conklin, and A. F. Blakeslee, 1941 Factors in coconut milk of very young Datura embryos. Science 94: 350-351.

- Van Overbeck, J., M. E. Conklin, and A. F. Blakeslee, 1942 Cultivation in vitro of small Datura embryos. Am. J. Bot. 29: 472-477.
- Varner, J. E., and G. Ram Chandra, 1964 Hormonal control of enzyme synthesis in barley endosperm. Proc. Nat. Acad. Sci. 52: 100-106.
- Vasil, I. K., 1957 Effect of kinetin and gibberellic acid on excised anthers of Allium cepa. Science 129: 1294-1295.
- Wakakuwa, Sh., 1934 Embryological studies on the different seed-development in reciprocal interspecific crosses of wheat. Japan J. Botan. 7: 151-185.
- Wardlaw, C. W., 1955 Embryogenesis in plants. Methuen & Co. Ltd. London pp. 381.
- Watkins, A. E., 1932 Hybrid sterility and incompatibility. J. Genet. 25: 125-162.
- Weaver, J. B. Jr., 1957 Embryological studies following interspecific crosses in Gossypium. I. G. hirsutum x G. arboreum. Am. J. Botan. 44: 206-214.
- Weaver, J. B. Jr., 1958 Embryological studies following interspecific crosses in Gossypium. II. G. arboreum x G. hirsutum. Am. J. Botan. 45: 10-16.
- White, P. R., 1963 The cultivation of animal and plant cells. Ronald Press. New York. pp. 228.
- Woodel, S. R. J., 1960a Studies in British primulas, VII. Development of normal seed and hybrid seed from reciprocal crosses between P. vulgaris Huds. and P. veris L. New Phytologist 59: 302-313.
- Woodel, S. R. J., 1960b Studies in British primulas, VIII. Development of seed from reciprocal crosses between P. veris and P. elator (L.) Hill. New Phytologist 59: 314-325.
- Ziebur, N. K., and R. A. Brink, 1951 The stimulative effect of Hordeum endosperms on the growth of immature plant embryos in vitro. Am. J. Botan. 38: 253-256.
- Zieber, N. K., R. A. Brink, L. H. Graf, and M. A. Starmann, 1950 The effect of casein hydrolysate on the growth in vitro of immature Hordeum embryo. Am. J. Botan. 37: 144-148.

Studies on Cross-incompatibility in the Family  
Cruciferae from the Standpoint of  
Developmental Genetics

By

Nobumichi INOMATA

Summary

In order to study cross-incompatibility in the family Cruciferae, the following experiments were undertaken. (i) Histological and embryological aspects of seed collapse in the reciprocal hybrids between diploid and autotetraploid of Brassica campestris and Raphanus sativus were studied. (ii) According to the results of the above experiment the artificial culture of hitherto non-viable embryos, ovules and ovaries was attempted, and the medium for successful culture was pursued. (iii) The knowledge obtained from artificial culture of reciprocal hybrids was applied in obtaining interspecific hybrids of the genus Brassica. (iv) Basic studies on the effects of various conditions at artificial culture of ovaries, such as mineral salt content, sucrose content, physical factors and planting stages were undertaken. (v) Transition of free amino acids at developmental stages of reciprocal hybrids which

were hitherto incompatible was studied.

The materials used in this experiment were eleven species of Brassica campestris L., four species of B. oleracea L. and four species of Raphanus sativus L.

The results obtained are summarized in the following:

(i) Embryological studies on cross-incompatibility between diploid and autotetraploid Brassica and Raphanus:

In the process of seed development in the crosses between diploid and autotetraploid B. campestris, cell wall formation in endosperm did not occur, and after abnormal vacuolization, many kinds of abnormalities of nuclei and collapse of endosperm were noticed in the cross,  $2x \times 4x$ . In the reciprocal cross,  $4x \times 2x$ , development of endosperm was poor and cell wall formation started earlier than in the parents. Afterwards collapse of endosperm occurred. Embryo reached to the globular stage in both cross combinations.

In the developmental process of ovules in the crosses between diploid and autotetraploid Raphanus sativus, cell wall formation was suppressed in the cross,  $2x \times 4x$  like in the cross,  $2x \times 4x$  of Brassica, and many kinds of abnormalities of endosperm nuclei were observed, and finally endosperm collapsed. In the cross,  $4x \times 2x$ , development of endosperm was poor and the cell wall formation took place earlier, but devel-



opment of both embryo and endosperm was almost normal, and as a result, small viable seeds were obtained.

(ii) Histological observation of ovule and ovary cultured at a certain developmental stage: To obtain viable seeds from incompatible crosses between  $2x$  and  $4x$  of Brassica, ovule culture was made and developing ovules were fixed six days after explantation (15 days after pollination). Histological observation revealed that abnormal and undifferentiated embryos and anomalous suspensors were formed. Endosperm did not exist in most ovules, though when it existed cell wall was formed in certain but not all ovules.

Ovary culture was made for obtaining the hybrid seeds from an incompatible cross combination,  $2x \times 4x$  and  $4x \times 2x$ . Explantation in test tube was made four days after pollination. Histological observation (11 days after explantation) of developing ovules showed that the addition of growth regulators, such as IAA, kinetin and gibberellin, did not influence the development of embryo, endosperm and seed coat, but that the addition of nutrients, such as yeast extract, tomato juice, casein hydrolysate and coconut milk, promoted their development. The developmental rate depended on the concentration of nutrient added. The embryos which developed earliest were three to seven days earlier

than those under natural condition in each cross combination. When development of the ovule was later than that found in natural condition, abnormalities of embryo and endosperm were observed.

(iii) Embryo, ovule and ovary culture: Ordinarily, viable seeds were not obtained in both reciprocal crosses between  $2x$  and  $4x$  Brassica. It was mainly due to the abnormal development of endosperm. To overcome this abnormality, embryo was taken out from the ovule before the collapse of embryos and embryo culture was made, from which hybrid plants were produced. The media used for the embryo culture was White's basal medium added with "embryo factor" of the extract of immature Lupinus seeds. The morphology of hybrid plants obtained from the reciprocal crosses was all intermediate between the parents ( $2x$  and  $4x$ ) in respect to leaf shape, leaf thickness and structure of leaf surface.

Furthermore, ovule culture was made to get viable hybrid seeds from the same cross combinations. The medium used in the experiment was Nitsch's (1951) solution added with IAA, kinetin, gibberellin, tomato juice and yeast extract. Explantation of ovules was nine days after pollination. No viable seeds were obtained. Removal of the placenta at an early developmental stage seems to be critically detrimental for

seed development.

Ovary culture was also made for the same purpose. The medium used was again Nitsch's solution enriched with growth regulating substances (IAA, kinetin and gibberellin) and nutrients (tomato juice, yeast extract, casein hydrolysate and coconut milk). Explantation of ovary was made four days after pollination. Seed production was not affected by the growth regulating substances, but by nutrients. The seeds were obtained from the cross,  $4x \times 2x$ , from the media containing yeast extract (one seed) and casein hydrolysate plus coconut milk (one seed), and from the cross,  $2x \times 4x$ , from a medium containing coconut milk (two seeds). It seems to suggest that nutritional requirement of hybrid seeds was different in the reciprocal crosses between  $2x$  and  $4x$ . Morphological characteristics of the hybrids were all intermediate of their parents ( $2x$  and  $4x$ ).

(iv) Revised medium of ovary culture: As the nutrients supplied to the medium promoted the seed production by ovary culture, the interaction among coconut milk, casein hydrolysate and yeast extract was further investigated. Seed production was better when both coconut milk and casein hydrolysate were added to the medium. With this medium, hybrid seeds were obtained from both

cross directions,  $2x \times 4x$  and  $4x \times 2x$ . In the cross,  $4x \times 2x$ , however, well developed embryos, which attached directly to the placenta without both endosperm and seed coat, were found. Further study indicated that proper concentration of casein hydrolysate is 500 mg/l (1000 mg/l at maximum) and that of coconut milk is 15 percent in volume (20% at maximum).

(v) Production of new type of *B. napus* by ovary culture: This ovary culture method was applied to the reciprocal crosses between *B. campestris* and *B. oleracea*, from which hybrid seeds are not produced ordinarily. The ovary culture was successful when *B. campestris* was used as female parents and relatively large number of hybrid plants were produced. In this case, too, it was frequently observed that embryos without endosperm and seed coat were attaching the placenta. These embryos were almost matured and reached the "torpedo" stage. They were cultured in test tube and in total 19 hybrid plants were produced. In the cross, *B. oleracea* x *B. campestris*, no hybrid seeds nor developed embryos were obtained. In this cross, development of ovules was stopped at early developmental stages.

(vi) Ovary culture of *Raphanus sativus*: Ovary culture was made, also, with the reciprocal crosses between diploid and autotetraploid *Raphanus sativus*. Seed

production was better in  $4x \times 2x$  than in  $2x \times 2x$  and  $4x \times 4x$ . The hybrid seed of  $4x \times 2x$  was one fourth in size of those of  $2x \times 2x$  and  $4x \times 4x$ . In the cross,  $2x \times 4x$ , one seed was obtained in the medium containing casein hydrolysate, but it did not germinate.

(vii) Physiological studies of ovary culture: Several other physiological conditions for ovary culture were tested using diploid and autotetraploid B. campestris. First, the basal media of White (1963), Nitsch (1951), Heller (1953) and Murashige and Skoog (1962) supplied with organic salts of White and Morel (1948) were compared as to seed formation. Generally speaking, seed production of Brassica was better in lower (White's and Nitsch's) than in higher concentrations of mineral (Murashige and Skoog's). Organic constituents were not necessary for seed production, and their high concentrations lowered the rate of seed formation. As to sucrose concentration for ovary culture, the best seed setting was obtained, which was three percent in  $2x \times 2x$  and five percent in  $4x \times 4x$ . The best light condition was 300 to 500 luxes. In order to know the best time for ovary culture, ovaries were cultured at various stages, namely one to ten days after pollination. In the cross of  $2x \times 2x$  and  $4x \times 4x$ , seed set was increased when the time of explantation became late.

(viii) Changes of free amino acids contents in incompatible cross-combinations between diploid and autotetraploid Brassica: Furthermore, change of free amino acid contents in cross-incompatible hybrids between  $2x$  and  $4x$  Brassica was compared with that in their parents. It was found that methionine and valine, and leucine increased in the former according to progress of degeneration of ovules. No difference was found between  $2x$  x  $4x$  and  $4x$  x  $2x$ .

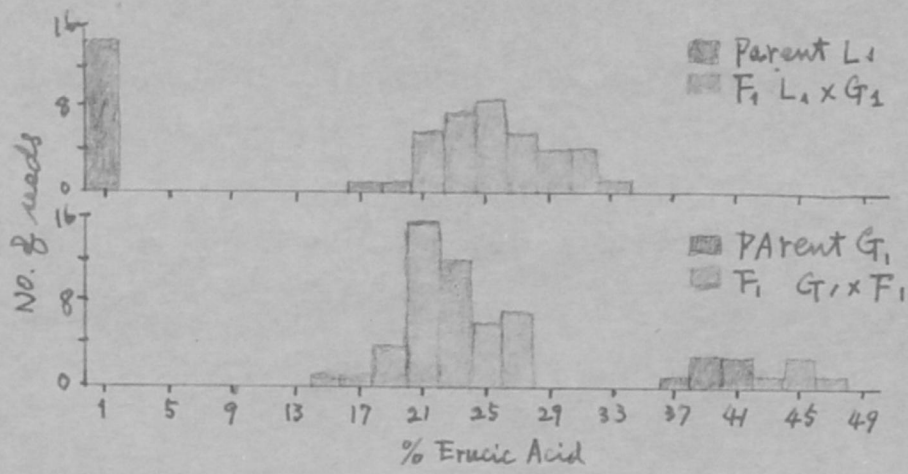


Fig. 1.

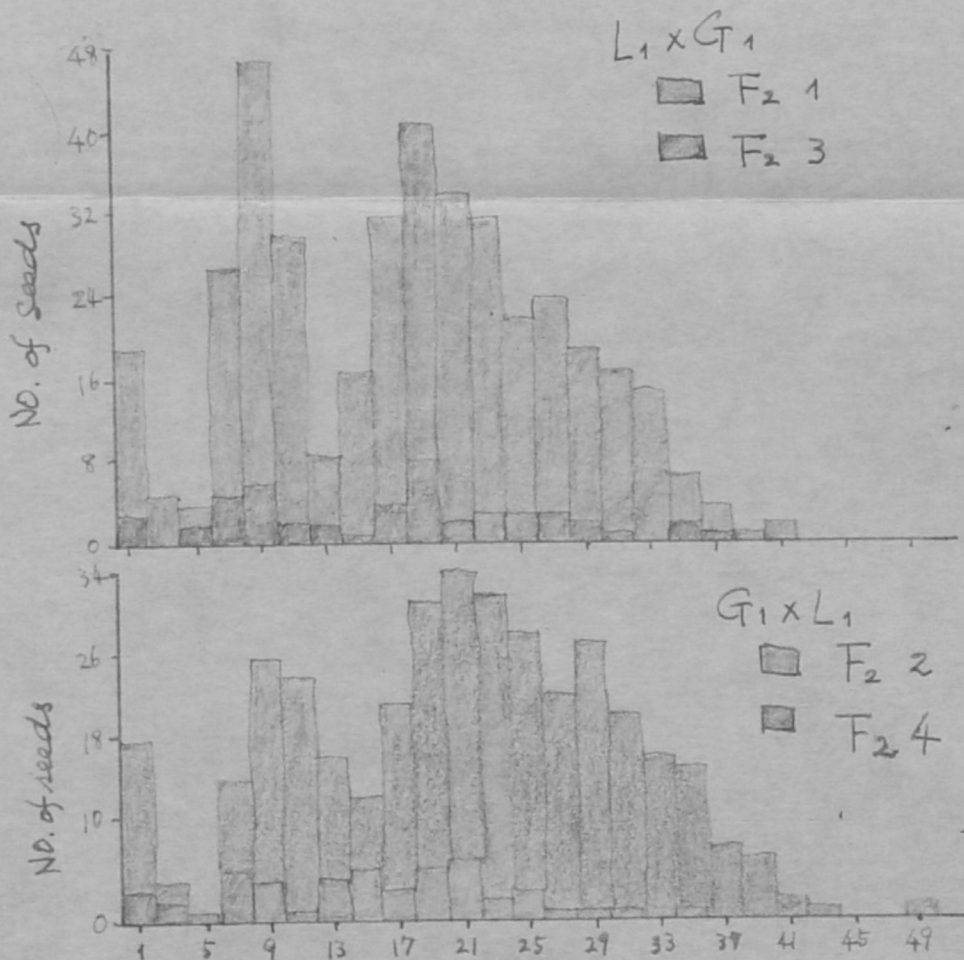


Fig. 2.