

博士論文

ハス (*Nelumbo nucifera*) の分枝と花芽形成に関する研究

石綱史子

目次

第1章. 緒言.....	2
第2章. ハスの器官形成と分枝	
2.1 序論.....	9
2.2 材料および方法.....	13
2.3 結果	
2.3.1 分枝.....	19
2.3.2 器官形成.....	26
2.3.3 <i>SHOOT MERISTEMLESS (NmSTM)</i> 遺伝子の発現解析.....	34
2.4 考察.....	40
第3章. 花芽形成	
3.1 序論.....	48
3.2 材料および方法.....	50
3.3 結果	
3.3.1 形態観察による花芽形成期の特定.....	54
3.3.2 <i>APETALA1 (NmAPI)</i> 遺伝子の発現解析.....	61
3.4 考察.....	66
第4章. 総合考察.....	68
第5章. 摘要.....	75
謝辞.....	80
引用文献.....	82

第1章. 緒言

分類と利用

ハスは、水生の多年生植物である。かつてはスイレン科に分類されていた (Englar 1898)。クロンキスト (1988) による分類では、*Nelumbo nucifera* Gaertn. と *N. lutea* (Willd.) Pers. の 1 属 2 種からなる独立した科としてハス科 (*Nelumbonaceae*) が記載された。DNA 情報を基にした分類体系 (APGIII 2009) では、ハス科はヤマモガシ科およびスズカケノキ科とともにヤマモガシ目に含まれている (Chase *et al.* 1993; Hoot *et al.* 1999; Angiosperm Phylogeny Group 2009)。ハス (*N. nucifera*) は主にアジア、オーストラリア、ロシアに分布し、白色あるいは紅色系の花をつける。一方、キバナバス (*N. lutea*) は、北アメリカに分布し、黄色の花をつける (Heywood 1993)。キバナバスは、分布や核型の解析から *N. nucifera* の亜種とする説もある (Huang *et al.* 1992; Borsch and Barthlott 1994; Simon 1970)。ハス属の染色体数は 16 (2n) で、ゲノムサイズは、929Mb と推測されている (Diao *et al.* 2006; Ming *et al.* 2013)。

ハスの栽培には長い歴史があり、主にアジアで有用植物として栽培されてきた。中国では、6,000-7,000 年前とされるハスの利用の記録が残っている (Wang and Zhang 2004)。ハスの種子は発芽能力を長く保つことが知られており、およそ 2,000 年前の物と推定されたハスの種子を発芽させ開花に至った大賀ハスや、800 年前のハスの種子から得られた中尊寺ハス、中国古代ハスなどの例がある (Ohga 1926; 北村・藤川 1974; 長島 2001; Shen-Miller *et al.* 2013)。肥大した地下茎 (レンコン)、葉、種子、花の各部位は、食用、薬用、観賞用に幅広く利用され、それぞれの目的に合わせた品種が作出されている (南川・斉藤 1962; 南川 1974; Guo 2009)。そのほかにも、葉柄から取れるセルロース繊維を利用して織物が作られる (小笠原 2005; Ying *et al.* 2011)。

観賞用園芸品種

ハスの花、花托、葉は、観賞用として利用されてきた。特に花は顕花植物の中で最も大きな花に挙げられる一つで、観賞用として優れた特質を持つ（勅使河原ら 1999）。花の観賞用として栽培されてきた品種は、中国に約 900 品種、日本には約 350 品種あるといわれている（北村・坂本 1972; Wang and Zhang 2004; Kubo *et al.* 2009）。これらの品種のほとんどは *N. nucifera* の自然変異体から選抜されたり、品種間交配により作出されたものである。*N. nucifera* と *N. lutea* の種間交雑で作出されたものもある（榎本 2002; Wang and Zhang 2004）。

ヒンズー教や仏教では、ハスの花は献花や供花として使われており、東南アジアでは切り花として生産されている（三浦 2004; La-onsri *et al.* 2009; Imsabai *et al.* 2010）。日本でも夏の限られた期間ではあるが、花卉市場にハスの葉、蕾、花托が出回り、いけばなの花材としても使われる。また、公園や寺社などの緑地の植栽や鉢植えにも利用されている。以上のようにハスの花の園芸的価値は高く現在も利用されているが、利用は限定的で必ずしも一般的ではない。その理由の一つに、利用者が望む時期に開花を誘導する技術が確立されていないことが挙げられる。また、切り花は蕾の状態でも出荷し生けられるが、切り花の状態では開花に至ることはない。

数多く存在している観賞用園芸品種の分類は、花卉の数、花の大きさ、花卉先端輪郭線などの特徴に基づいた分類が広く用いられている（渡辺、鈴木 1992; Wang and Zhang 2004; 鄭ら 2005a; 鄭ら 2005b）。また、近年は、遺伝学的な解析による分類も行われている（Kanazawa *et al.* 1998; 香取ら 2003; 黄ら. 2003; Kubo *et al.* 2009）。

観賞用ハスの生育と形態

ハスには、日本や中国に分布している温帯型と主に東南アジアに分布している熱帯型の 2 つのエコタイプがあると考えられている（Wang and Zhang 2004; Yang *et al.* 2014）。

熱帯型のハスは日本（関東地方）では露地栽培による越冬は難しい。温帯型のハスは越冬のために地下茎が肥大するのに対し、熱帯型のハスは低温下で栽培しても地下茎は肥大せずに枯れてしまう。また、花期は熱帯型の方が温帯型より長い (Yang *et al.* 2014)。熱帯型と温帯型のハスの違いについての研究はほとんど行われておらず、詳細については不明である。

ハスの園芸品種の栽培は、遺伝的形質を維持するため、種レンコンを用いた栄養繁殖が行われる。東京大学大学院農学生命科学研究科旧附属緑地植物実験所（千葉県千葉市花見川区：北緯 35.6° 東経 140° 標高 24m）で栽培した場合の生育期と休眠期の植物体の全体像を図 1 に示した。冬季が低温になる地域で温帯型のハスを栽培した場合、春、サクラ品種のソメイヨシノが咲くころに楕着した普通葉（楕着葉）を出し生育が開始する。生育開始後の初めの数枚は水面に接している浮葉を、その後は水面から直角に立ち上がった抽水葉を出し、夏になると花をつける（図 1 A-B）。秋になると、地下茎が肥大し、葉が枯れる（図 1 C）。この肥大した地下茎（レンコン）は、次年度の生長に必要なデンプンなどの貯蔵組織となり、水中の土の中で休眠し越冬する（図 1 C）。

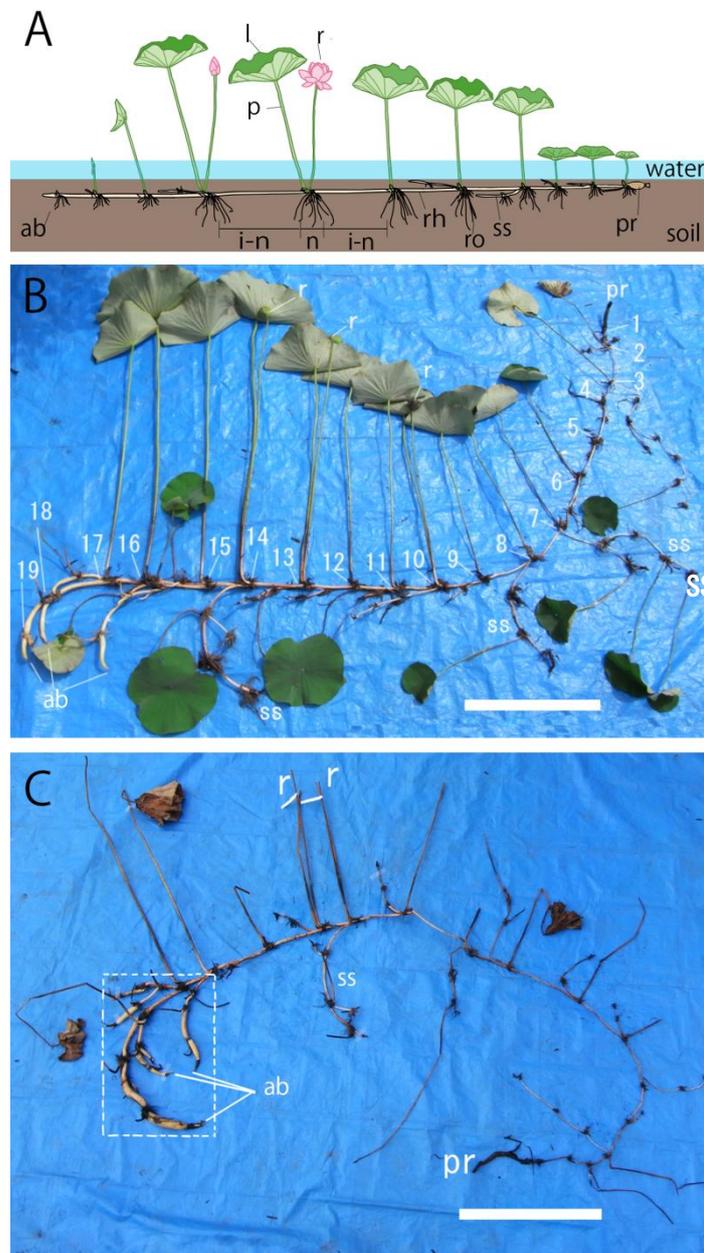


図 1. ハスの植物体全体像

A. ハスの生育期の模式図。B. 生育期に掘り出した植物体の全体像（2009年9月4日、117 DAP）。C. 休眠期に掘り出した植物体の全体像（2009年11月25日、199 DAP）。B、C共に不定根は取り除いた。

ab, 頂芽; i-n, 節間; pr, 種レンコン; rh, 地下茎; n, 節; l, 普通葉; p, 葉柄; ss, 側枝; ro, 不定根; dashed-square, 肥大した地下茎; r, 白いラベル, 花茎; 番号, 種レンコンから数えた節数; DAP, 植え付け後の日数。スケールバー B-C: 50 cm。

本研究の目的と概要

本研究では、ハスの開花調節技術を開発するための鍵となる基礎的知見を得るため、以下の実験を行った。まずハスの頂芽中に形成される各器官の形態と形成順序の観察を行い、ハスの器官形成と分枝について明らかにした。次にハスの花芽形成が生長過程のどの段階で起こるかを明らかにした。

本研究で用いた植物形態学用語は、低出葉 (Niederblatt、Cataphylls) を鱗片葉 (Scale leaves) としたことを除いて、Wigand and Dennert (1888) と Esau and Kosakai (1975) らの研究に従った。また、本研究では、複数の葉が相互に接近して着生する部位を便宜上「節」と呼ぶこととした。したがって形態学上の節とは異なる意味で使用している。

第2章. ハスの器官形成と分枝

2.1 序論

これまでハスの器官形成と分枝について、Trecul (1854)、Eichler (1878)、Wigand and Dennert (1888)、Miki (1927)、Chassat (1962)、Takhtajan (1969)、Esau and Kosakai (1975)、熊沢 (1979) などにより研究が行われてきた。特に、Wigand and Dennert (1888) の研究は、スケッチと記述により細部にわたり詳しく観察した結果が述べられている。先行研究では、器官形成や分枝についていくつかの相異なる解釈がなされており、統一した理解が得られていなかった。本章ではハスの形態観察を行い、その結果を先行研究の結果と比較し、先行研究との解釈の相違点について明らかにした。

先行研究間の第 1 の相違点は、ハスの分枝様式が仮軸か単軸かである (図 2-1)。Wigand and Dennert (1888)、Miki (1927)、Chassat (1962)、熊沢 (1979) らは、仮軸説を唱えた。1 枚の普通葉 (l) と 2 枚の鱗片葉 (s1, s2) は l, s1, s2 の順で交互に主軸の両側に形成され、主軸は花芽で終わり、鱗片葉 (s1) の腋芽として発生した側枝が次の節の主軸となるという解釈である (図 2-1 A)。一方、Eichler (1878)、Esau and Kosakai (1975) らは単軸説を唱え、主軸の片側に 1 枚の鱗片葉 (s1)、その反対側にもう 1 枚の鱗片葉 (s2) と 1 枚の普通葉 (l) が同一側に形成される、すなわち主軸の両側に 1 枚ずつ規則的に葉が形成されない、特異的な 3 葉構造であるとした (図 2-1 B)。この葉序は極めてまれである (Miki 1927)。

一般に、主軸から側枝が発生する際に最初に形成される葉は特殊な形をしていることが多く、前出葉と呼ばれる。先行研究間の第 2 の相違点は、この前出葉の枚数と側枝の葉序である。先行研究で述べられた説を整理すると、4 つの異なるパターンが示されている (図 2-1 C)、(Miki 1927)。

本章ではハスを種レンコンと種子から栽培し、走査型電子顕微鏡 (SEM) と光学顕微鏡を用い、頂芽と節間伸長後の各器官の形態観察を行い、器官の形成過程、形成順序、

茎頂分裂組織 (SAM) の位置について明らかにした。また、SAM の位置を特定するために *SHOOT MERISTEMLESS (NnSTM)* 遺伝子発現を指標とした *in situ* ハイブリダイゼーション解析を行った。*STM* は、シロイヌナズナやイネを用いた研究において、SAM の維持に機能していることが知られている (Barton and Poething 1993; Endrizzi *et al.* 1996; Long *et al.* 1996; Clark 1997)。これらの結果を先行研究の結果と比較し、先行研究間の相違点について結論を示した。

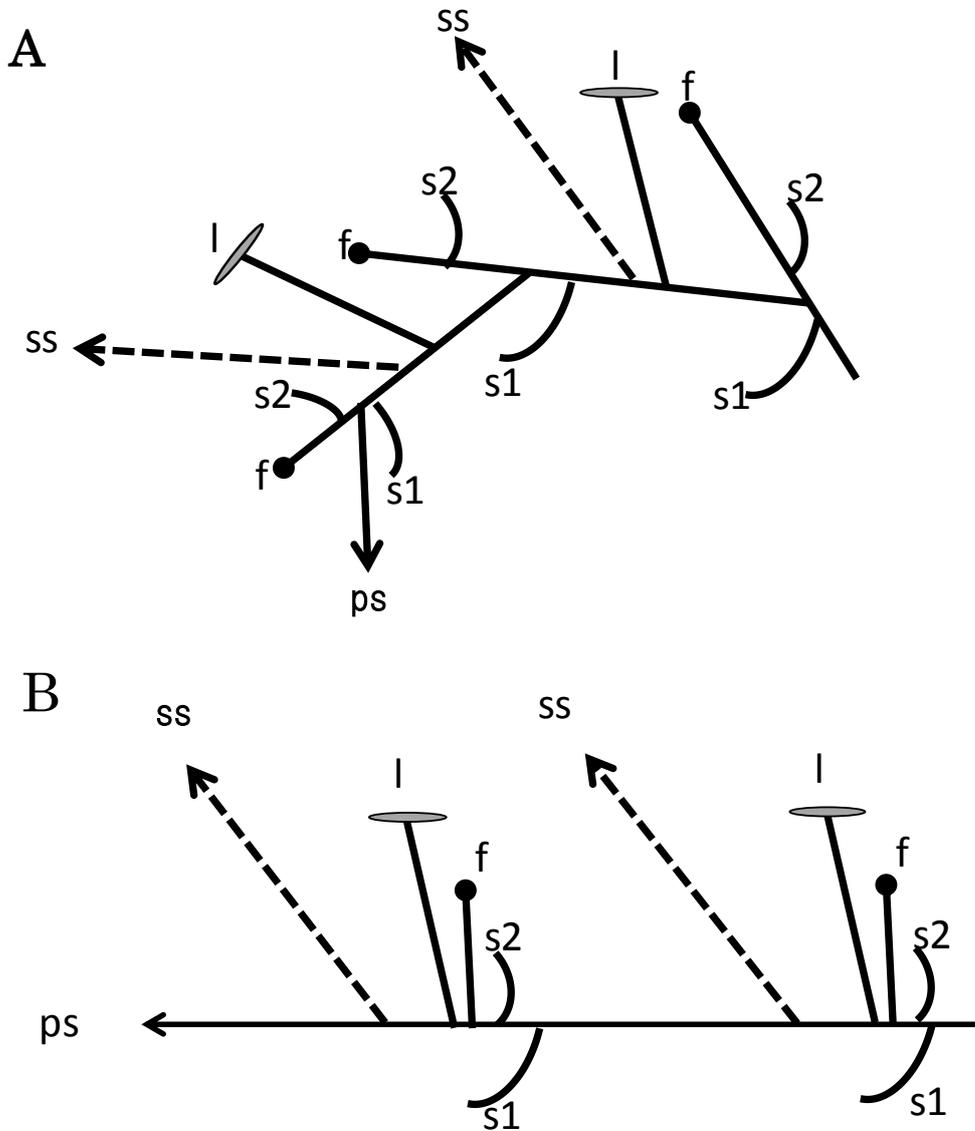


図 2-1. ハスの分枝の模式図

A. 假軸説: 主軸の両側に規則的に普通葉と鱗片葉が l, s1, s2 の順に形成され軸は花芽で終わり、鱗片葉 (s1) の腋芽として発生した側枝が次の主軸となって生長する (Miki 1927)。B. 単軸説: 主軸の片側に 1 枚の鱗片葉 (s1)、反対側にもう 1 枚の鱗片葉 (s2) と 1 枚の普通葉 (l) が軸の同一側に形成される、特異的な 3 葉構造 (Esau and Kosakai 1975)。f, 花; l, 普通葉; ps, 主軸; s1, s2, 鱗片葉; ss, 側枝。(熊沢 1979 改変)。(次ページに続く)

C

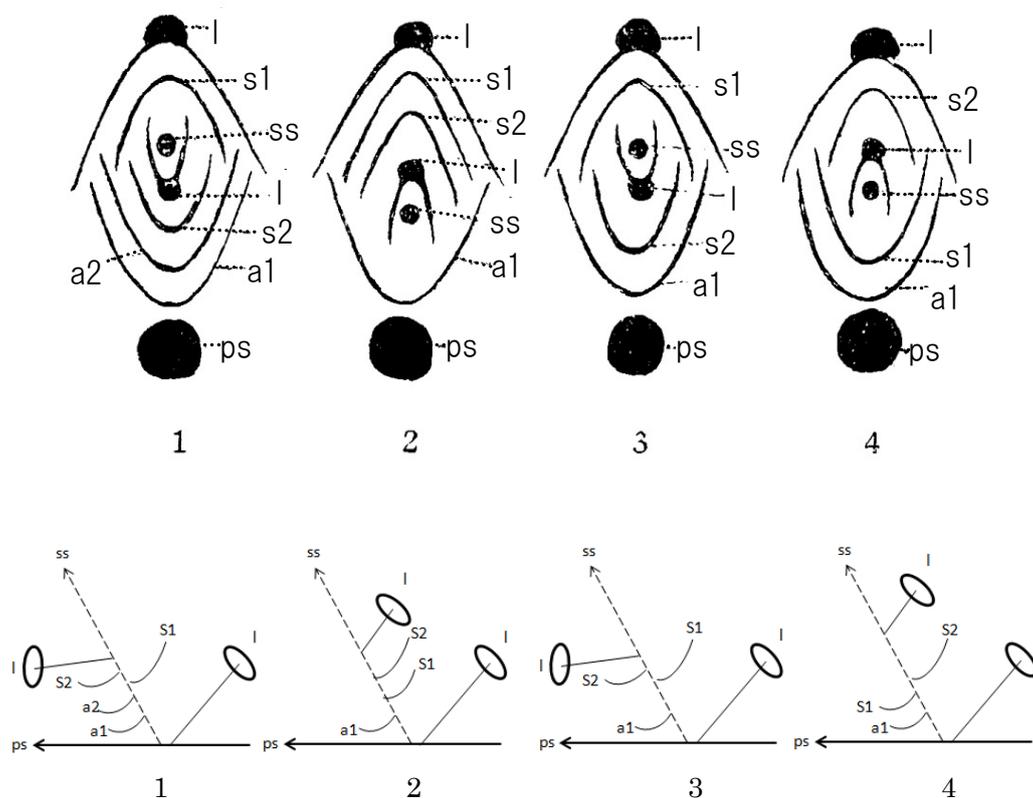


図 2-1. ハスの分枝の模式図 (続き)

C. これまでに報告されたハスの側枝の基部模式図。前出葉 (a1、a2) の数が 1 枚または 2 枚、と側枝 (s1、s2、l、ss) の葉序が異なる 4 パターンを示している。下段は補助図。a1、a2 前出葉; l、普通葉 (蓋葉); ps、主軸; s1、s2、鱗片葉; ss、側枝の軸。(Miki 1927、用語は和訳)。

(注) この図は図 2-1A、B の点線部分 (ss) の構造を示したもので、図 2-1A、B の構造とは (部分的に) 異なる。

2.2 材料および方法

材料

種レンコンは、東京大学大学院農学生命科学研究科旧附属緑地植物実験所でレンコンを植え継いで維持している園芸品種‘漁山紅蓮’を用いた。‘漁山紅蓮’は花の観賞用の代表的な園芸品種で、紅色系で花卉数は30枚前後の中型品種である (Watanabe 1990)。Simple sequence repeat (SSR) マーカーを用いた園芸品種の分類では、‘浄台蓮’、‘一天四海’、‘請所’、‘輪王蓮’などと同じハスの品種クラスターに分類されている (Kubo *et al.* 2009)。共に冬季には肥大した地下茎が形成される温帯型のハス品種である。植え付け時に頂芽を含む2つの節と肥大した1つの節間という形にしたものを種レンコンとして用いた。種レンコンの節に形成されていた側枝は取り除き、植え付け時点での地下茎の頂芽は1か所とした。実生を得るための種子は、草津市立水生植物園みずの森 (滋賀県) より琵琶湖で自生状態で生育している系統をご提供いただいた。種レンコンは80リットル、種子は10リットルのプラスチック製容器に植え付け、慣行栽培した。観察には、植物体全体を容器から取り出し、水道水で土を丁寧に洗い流した植物体から頂芽を採取して用いた。合計で40個の種レンコンと20個の種子から生育した60個体の植物体を用いた。形態観察は30個の頂芽と100個の節を用いた。

方法

光学顕微鏡観察

形態観察のためのサンプルは、頂芽付近をFAA固定液〔ホルムアルデヒド: 酢酸: 70% エタノール = 1:1:18、1% TritonX〕に浸け、真空ポンプ (Minivac PC-52、ULVAC) で30分3回脱気し4°Cで一晩静置した。翌朝、サンプルを再度30分2回脱気し、サンプルが固定液中に沈んでいることを確認した。その後、リン酸緩衝液洗浄30分2回、エ

タノールシリーズ (30%、50%、70%、90%、99.8%、無水) で各液 1 時間の脱水処理を行った。その後、パラフィン包埋用の試料はエタノール：ヒストクリア (Histo-Clear、National diagnostics) (1 : 1) 液に 30 分、100%ヒストクリアに 30 分 2 回、ヒストクリア：パラプラスト (Paraplast Plus、McCormick Scientific) (1 : 1) に 1 時間、100%パラプラスト液に 3 日間 43°C (1 日 1 回液交換を行った) 浸けて置換した後、包埋した。テクノビット樹脂包埋用の試料は、脱水処理後、エタノール：テクノビット液 (Technovit 7100、Heraeus Kulzer) (1 : 1) に 3 時間、100%テクノビット液 (硬化剤なし) に室温で 24 時間浸透させた。その後、硬化剤入りのテクノビット液に交換し室温で包埋した。パラフィン包埋した試料から、ミクロトーム (Microm HM325、Thermo Fisher Scientific) を用い、厚さ約 10 μm の連続切片を作製した。作製した切片はテクノビット切片と同様に伸展、乾燥させた。テクノビット樹脂包埋した試料ブロックから、ミクロトーム (Jung RM 2035、Leica) を用い厚さ約 3 μm の切片を作製した。作製した切片は、剥離防止処理済のスライドガラス (APS コートスーパーフロスト S8441、松波硝子) の上で伸展させて乾燥した。形態観察用の切片は、サフラニン O とトルイジンブルー O で染色した。染色後の切片の載ったスライドガラスは、カバーガラスと封入剤 (オイキット、O. Kindler) を用いプレパラートを作製した。その後、光学顕微鏡 (ECLIPSE E600、Nikon) で観察した。画像の出力時に、Adobe Photoshop CS4 (Adobe Systems) のレベル補正を用い色調範囲の調整を行った。

走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察

栽培した植物体から頂芽を採取し、操作時の物理的損傷から守るため、2 または 3 枚の鱗片葉を一時的に残し、頂芽周辺の普通葉や鱗片葉を丁寧に取り除いた。完熟種子のサンプルは、種子を割り頂芽付近を採取した。これらのサンプルを固定液 [4%パラホルムアルデヒド、2%グルタルアルデヒド/ 50mM リン酸緩衝液、pH 7.2] に浸け、真空

ポンプ (Minivac PC-52、ULVAC) で 30 分 3 回脱気を行い、4°Cで一晩静置した。翌朝、再度 30 分 2 回脱気しサンプルが固定液中に沈んでいることを確認した。その後、リン酸緩衝液洗浄 30 分 2 回、エタノールシリーズ (30%、50%、70%、90%、99.8%、無水) を各液 1 時間の脱水処理を行った。その後、酢酸イソアミルに置換し、臨界点乾燥装置 (HCP-2、Hitachi) を用いて乾燥した。乾燥したサンプルは、観察用アルミ製試料台 (日新 EM) に導電性カーボン両面テープ (日新 EM) を用いて載台した後、サンプリング時に残っていた鱗片葉などを実態顕微鏡下で取り除き、SAM を露出させた。サンプルの表面を白金パラジウムでコーティング (Ion Sputter E-1030、Hitachi) し、SEM (S-4500、S-4800、Hitachi) 5-10kV 下で観察した。画像の出力時に、Adobe Photoshop CS4 (Adobe Systems) のレベル補正を用い色調範囲の調整を行った。

RNA 抽出と cDNA 合成

栽培した植物体から頂芽を採取し、頂芽を包んでいた鱗片葉や普通葉を SAM に損傷がない範囲で取り除いた後、頂芽を直ちに液体窒素に浸漬した。サンプルを乳鉢と乳棒を使ってすりつぶし、全 RNA を抽出・精製 (RNeasy Mini Kit、Qiagen) し、DNAase 処理 (TURBO DNA-free Kit、Ambion) を行った。RNA の量を極微量分光光度計 (Nanodrop 2000c、Thermo Fisher Scientific) を用い確認した。その後、Oligo(dT)15 Primer (Takara) を用い、逆転写 (Super Script III Reverse Transcriptase、Life Technologies) して cDNA を合成した。

ハスの *NnSTM* 遺伝子プローブ作製

研究開始時には、ハスの *SHOOT MERISTEMLESS (STM)* 遺伝子の塩基配列が公開されていなかったため、イネ、タバコ、イワタバコ、シロイヌナズナの公開されているアミノ酸配列および *STM* に類似しているといわれているシロイヌナズナの *KNOTTED CLASS NAT1* のアミノ酸配列 (Long *et al.* 1996) をアライメントし (図 2-7)、これを基

にディジェネレーテッドプライマーを設計した (表 2-1、図 2-9)。前項でハスの頂芽から調製した cDNA をテンプレートとし PCR (Go Taq master mix、Promega) を行った。その産物を電気泳動しバンド部分を回収して精製した (QIAEX II gel extraction kit、Qiagen)。得られた断片をプラスミド pCRTMII (Invitrogen) に TA クローニング (TA cloning kit、Invitrogen) した。得られたプラスミドの配列と cDNA の挿入の向きをシーケンシング (ABI3130x1 Genetic Analyzer Big Dye Terminator cycle sequence kit、Life Technologies) により確認した。その後、制限酵素 *Spe*I で切断し、ベクター上の T7 プロモーターを用いて *in vitro* 転写反応 (MAXIscriptKit (Ambion)) を行い、ディゴキシゲニン標識された *NnSTM* アンチセンス鎖 RNA プローブを作製した。

表 2-1. *NnSTM* を標的とした *in situ* ハイブリダイゼーションの RNA プローブ作製のためのテンプレート cDNA 増殖用ディジェネレーテッドプライマーセット (混合塩基表示)

Primer name	5' -3'
<i>NnSTM</i> -F	AARATHATGGCNCAYCCNCA
<i>NnSTM</i> -R	CATRTCYTCNSWNGGYTTCC

対応塩基

R → A or G, H → A or C or T, N → A or C or G or T, Y → C or T,
S → C or G, W → A or T

in situ ハイブリダイゼーション

栽培した植物体から採取したハスの頂芽を 4% パラホルムアルデヒド、1% TritonX/50mM リン酸緩衝液 (pH 7.2) の溶液に浸漬し固定した。これ以降の工程は、光学顕微鏡観察に用いたパラフィン切片作製と同様に行った。作製した切片はスライドガラス上でよく乾燥した後に、数週間から数か月間 4°C で保存した。

スライドガラス上の切片のパラフィンを取り除くために 100% ヒストクリア液浸漬 10 分 2 回、ヒストクリア:エタノール (1:1) で 5 分 1 回、エタノールシリーズ (99.8%、90%、70%、50%、30%) で各 5 分、滅菌水で 3 分 2 回処理した。37°C の Proteinase K 溶液 [42µl Proteinase K recombinant, PCR grade (20mg/ml, Roche) / 150 ml (0.1M Tris-HCl pH 7.5, 50mM EDTA)] に 20 分浸けた後、室温の滅菌水で 3 分 2 回洗浄した。再固定 [4% パラホルムアルデヒド/0.1M リン酸緩衝液 pH7.5] を室温で 10 分行った後、室温の滅菌水で 3 分 2 回洗浄した。トリエタノールアミン溶液 [使用直前に混和した 0.1M トリエタノールアミン 0.1M 無水酢酸] 処理を 10 分行った後、滅菌した SSPE Buffer [0.1M リン酸緩衝液 pH7.5、0.2M EDTA] に 3 分 2 回、エタノールシリーズ 30%、50%、70%、90% を各 2 分、99.8% を 2 分 2 回処理した後、1 時間脱気した。ハイブリダイゼーション液 (後述) を切片の上に載せ、カバーガラスで封入した。ハイブリダイゼーション液は、1 スライドガラスあたり 3µl の 3M DTT、3µl の tRNA (100µg/µl)、15µl の poly (A) (10µg/µl)、8µl の滅菌水に 1µl のプローブ溶液を混合した溶液を 80°C で 5 分処理した後、氷冷し 50°C に温めた Solution A 溶液 (後述) を 280µl 加え混合したもを用いた。Solution A 溶液は、30ml のホルムアミド、3.6ml の 5M NaCl、6ml (1M Tris・HCl pH 7.5、1M EDTA)、1.2ml の 50x デンハルト溶液 (1% フィコール、1% ポリビニルプロリドン、1% BSA (bovine serum albumin))、12ml の 50% デキストラン硫酸ナトリウム、0.6 ml の 3M DTT、0.6ml の滅菌水を混合したもを用いた。封入したスライドガラスは、25ml のホルムアミドと 25ml の滅菌水を混合しペーパータオルにしみ込ませたものを、容量 4 リット

ルのプラスチック製密封容器に敷いて作製した湿室に入れ、暗所 50°C で一晩静置した。

翌朝 4 x SSC Buffer [15mM クエン酸三ナトリウム、150mM NaCl] 中でカバーガラスを外した後、スライドガラスを 50°C の 4 x SSC Buffer で 5 分 1 回、10 分 1 回洗浄した。37°C の RNase Buffer [10mM Tris・HCl pH7.5、0.5 M NaCl] で 5 分処理した後、37°C の RNase 反応液 [50µg/ml RNase A / RNase Buffer] に 30 分浸した。その後、37°C の RNase Buffer で 5 分 3 回洗浄した。52°C の 0.5 x SSC Buffer で 20 分 2 回、室温の Buffer ① [0.2 M Tris・HCl pH7.5、0.3M NaCl] で 5 分 2 回浸した。室温のブロッキング液 [1g Blocking reagent (Roche) / 200ml Buffer ①] に 30 分浸した。1 スライドガラスあたり 0.1% Anti-Digoxigenin 溶液(Roche)、0.1% BSA を含む 500µl の Buffer ①を加えたものをサンプル上に滴下した。50ml の Buffer ① を用いて作製した湿室にスライドガラスを入れ、遮光して室温で 1 時間静置した。その後、室温の Buffer ①に浸し振とうしながら 10 分 3 回、室温の Buffer ③ [0.1 M Tris・HCl pH9.5、0.1M NaCl] で 5 分振とうした。その後プローブの発色用溶液 [160µl NBT/ BCIP Stock Solution (Roche) / 20ml Buffer ③] をスライドガラスのサンプル上の載せ、50ml の Buffer ③を加えて作製した湿室に入れ、遮光し 37°C で 4 時間から一晩静置した。発色が適切な時点で、室温の TE Buffer [10mM Tris・HCl pH8.0、1mM EDTA] に 5 分、滅菌水 5 分洗浄した。観察は、光学顕微鏡 (ECLIPSE E600、Nikon) を使い行った。画像の出力時に、Adobe Photoshop CS4 (Adobe Systems Inc.) のレベル補正を用い色調範囲の調整を行った。

2.3 結果

2.3.1 分枝

発芽初期の生長と分枝

完熟種子の縦断面像を図 2-2 A に示した。種子中には子葉 (c)、第 1 節と第 2 節の普通葉 (11、12) が形成されているのが見えた。第 2 節の普通葉は基部には普通葉の一部である托葉鞘 (oc2) が形成されており、この托葉鞘が次節の器官を包んでいた。パネル A の托葉鞘 (oc2) とその内部に形成されている器官を観察するため、外側から順に器官を取り除き SEM で観察した結果を図 2-2 B、D-G に示した。図 2-2 C、G の図中のアスタリスク (*) は、SAM の位置を示している。第 4 節の普通葉基部には未分化の SAM が確認できた (図 2-2 G)。この時点では、第 5 節以降の主軸の器官は形成されていなかった。パネル B の托葉鞘 (oc2) を取り除いた像を図 2-2 D、E に示した。第 2 節の普通葉 (12) の一部である托葉鞘 (oc2) に包まれていた第 3 節普通葉 (13) が露出した。さらにこの第 3 節普通葉 (13) と托葉鞘 (oc3) を取り除くと、第 3 節普通葉の托葉鞘 (oc3) に包まれていた第 4 節普通葉 (14) が確認できた (図 2-2 F、G)。図 2-2 B、D-G と頂芽付近の縦断切片像 (図 2-2 C) から、種子の中には第 1 節から第 4 節の普通葉が互生で向かい合って形成されていたことが示された。第 1 節普通葉基部には托葉鞘 (oc1) は形成されていないが、第 2 節から第 4 節の普通葉は基部に托葉鞘 (oc2、oc3、oc4) を形成していた (図 2-2 A、B、E、G)。発芽後、第 1 節から第 4 節の 4 枚の普通葉は、その間に他の葉的器官を生じることなく主軸の両側に交互に展開し、不定根がそれぞれの節に形成された (図 2-2 H、I)。第 1 節から第 4 節の普通葉を展開させるのと同時に第 4 節普通葉基部に形成されていた SAM から、第 4 節の側枝の SAM と第 5 節以降の主軸の器官が形成された (図 2-2 L)。図 2-2 J-L は、播種後 15 日の実生頂芽の縦断面図で、新たに形成された発芽第 5 節には、主軸の片側に 1 枚の鱗片葉 (s1)、180 度反対側にもう

1枚の鱗片葉 (s2) と 1枚の普通葉 (l) が形成されており、第 6 節の普通葉も確認できた (図 2-2 J)。この時点で、頂芽中には分化が完了した第 5 節と第 6 節、分化途中の第 7 節があった。第 5 節以降に形成された主軸の葉序は、種レンコンから栽培した場合の主軸の葉序と同じ順序で、同じ器官が形成された (後述) (図 2-2 I-J)。図 2-2 J の矢尻は、第 5 節普通葉背軸側基部の十分に生長した植物体で花芽形成が予定される位置を示しており、ここに花芽の原基は確認できなかった。種子中に形成されていた第 4 節までと発芽後形成された第 5 節には、花芽形成を確認することができなかった (図 2-2 C、L、J)。また、第 5 節以降の主軸の普通葉は、向かい合って形成されず、軸の片側に偏って形成されることが確認できた。

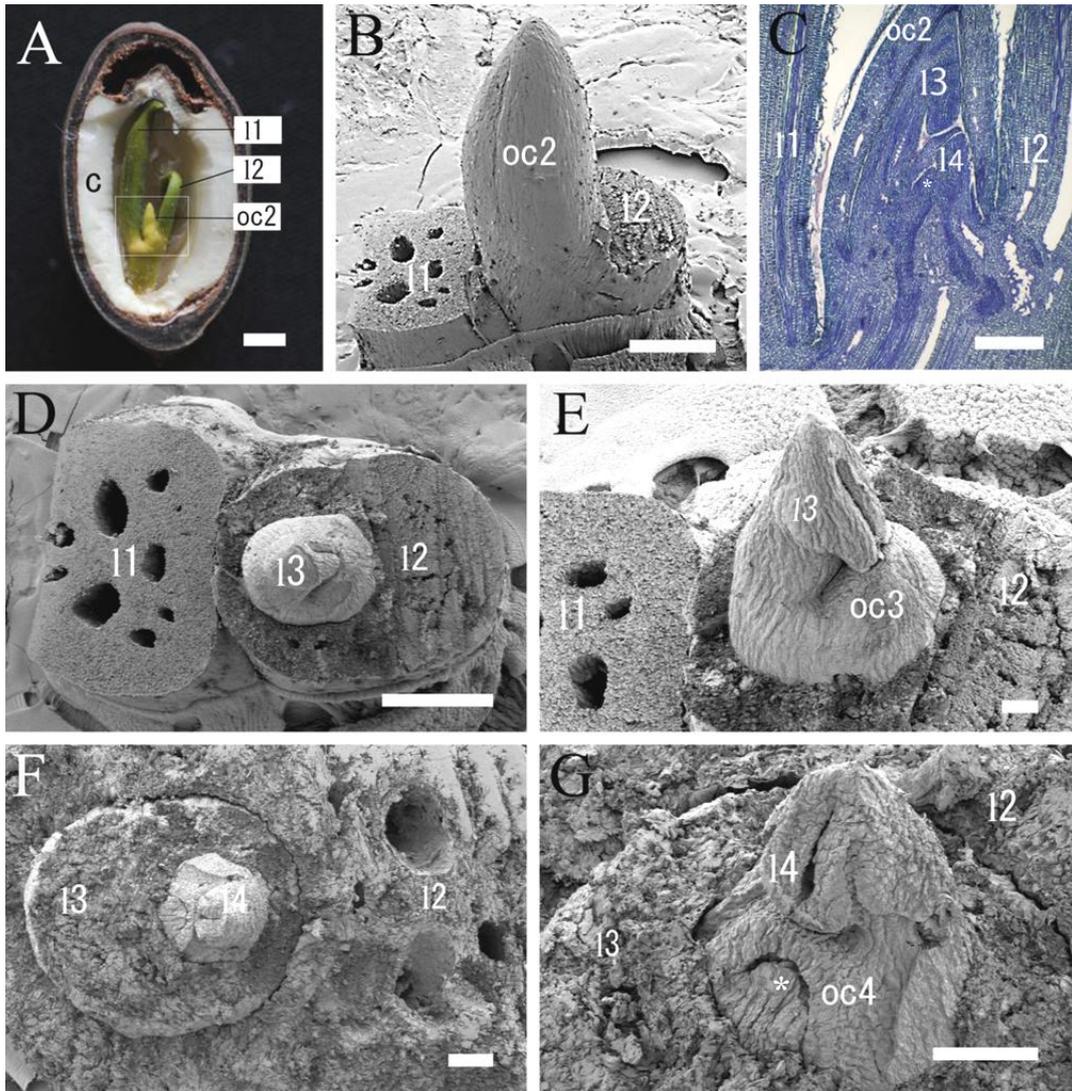


図 2-2. 胚の形態と発芽後の葉序

A. ハスの完熟種子の縦断面像。種子中には、子葉 (c) 第 1 節普通葉 (11)、第 2 節普通葉 (12)、第 2 節普通葉の托葉鞘 (oc2) に包まれた頂芽が形成されていた。断面像の第 1 節普通葉 (11) と第 2 節普通葉 (12) の葉身は頂芽を露出させるため取り除いた。B. 完熟種子中の頂芽付近。C. 頂芽付近の縦断面 (パラフィン切片: サフラニン O とトルイジンブルー O 二重染色)。D. パネル B の頂芽付近から托葉鞘 (oc2) を取り除いた。第 2 節普通葉 (12) の一部である托葉鞘 (oc2) に含まれていた第 3 節普通葉 (13) が露出した。E. パネル D の側面からの拡大像。F. 第 3 節普通葉 (13) と托葉鞘 (oc3) をパネル D から取り除いた。第 4 節普通葉 (14) が露出した。G. パネル F の第 4 節普通葉 (14) の正面拡大像。第 4 節普通葉 (14) 基部には SAM (*) が形成されていた。B、D、E、F、G は SEM 像。

c, 子葉; 1, 普通葉; oc, 托葉鞘; *, 茎頂分裂組織。スケールバー A-D: 500 μ m; E-G: 100 μ m。
(次ページへつづく)

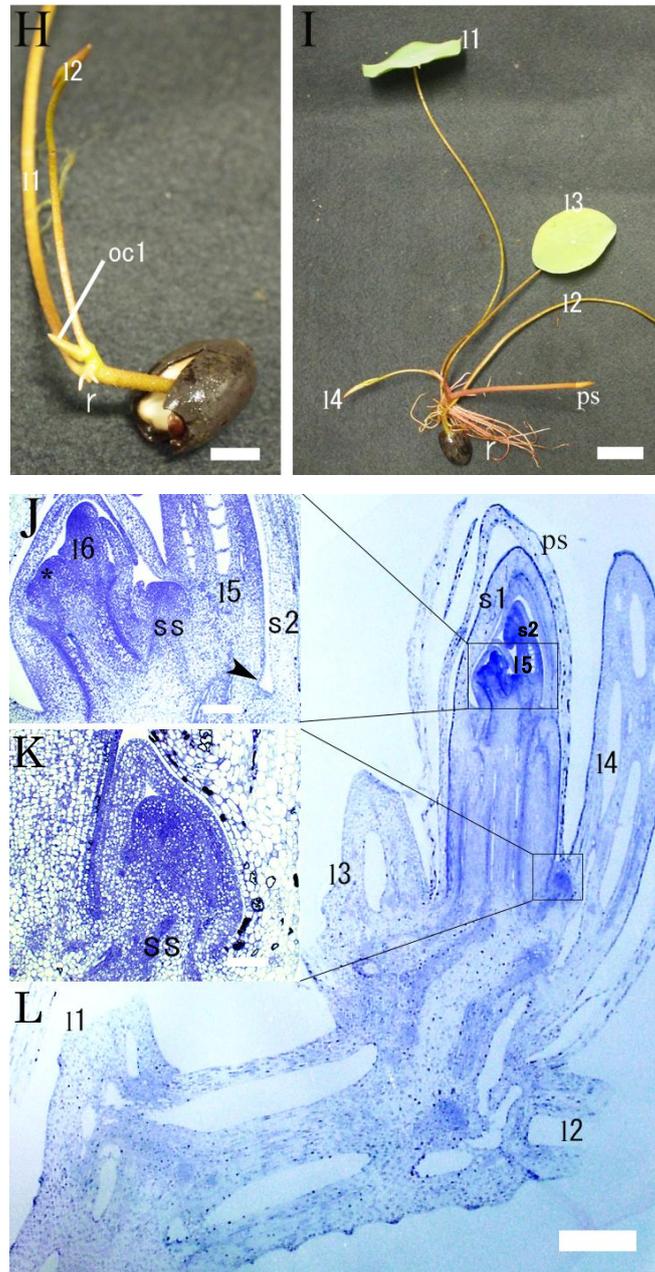


図 2-2. 胚の形態と発芽後の葉序 (続き)

H. 播種後 13 日の実生。I. 播種後 20 日の実生。J. 播種後 15 日の実生頂芽縦断面の SAM 付近の拡大像。矢尻は十分に生長した植物体で花芽が形成される位置を示している。第 5 節普通葉背軸側基部 (15) には花芽は形成されていなかった。K. 播種後 15 日の実生の縦断面の第 4 節普通葉 (14) の向軸側基部付近の拡大像、側枝が形成されていた。L. 播種後 15 日の実生頂芽の縦断面 (テクノビット切片: サフラニン O とトルイジンブルー O 二重染色)。

1, 普通葉; oc, 托葉鞘; ps, 主軸; s1, s2, 鱗片葉; ss, 側枝; r, 不定根; *, 主軸の茎頂分裂組織。スケールバー: H: 1cm; I: 2cm, L: 1mm, J, K: 100 μ m。

成熟した地下茎の生長と分枝

図 2-3A は、種レンコンから栽培した場合の植物体の全体像を示している。ハスの地下茎は、伸長した節間 (i-n) と節 (n) から成る (図 2-3A)。図 2-3 B の地下茎先端の頂芽付近から、鱗片葉 (s1) と托葉鞘 (oc) を取り除くと、頂芽 (ab) (図 2-3 C) 全体が現れた。頂芽 (ab) は、2 枚の鱗片葉 (s1', s2') と托葉鞘 (oc') に包まれていた (図 2-3 C、D)。図 2-3 D の普通葉 (l') の一部である托葉鞘 (oc') を取り除くと主軸の鱗片葉 (s1'') が形成されていた (図 2-3 E)。この鱗片葉 (s1'') を取り除くと、鱗片葉 (s2'')、普通葉と托葉鞘 (l'', oc'') が形成されていた (図 2-3 F)。また、さらに上位節の鱗片葉 (s1''') と SAM が形成されているのが確認できた (図 2-3 F)。図 2-3 F 右上拡大図は s1'', s2'', l'', oc'' を取り除いた後の SAM (*) の側面像である。図 2-3 G は別のサンプルで図 2-3 F よりも少し発達が進んだステージのものである。SAM 付近には 2 枚の鱗片葉 (s1''', s2'''), 普通葉 (l'''), SAM (*) の形成が確認できた。以上の結果から、十分に生長したハスの頂芽中には器官分化が完了した主軸の 2 節と、さらに器官分化過程にある上位の 1 節の合計 3 節が形成されていた (図 2-3 B-G)。これらの節は、節間伸長を伴いながら、頂芽内に形成されていた器官を順に展開し地下茎を形成する。種レンコンから栽培した植物体の頂芽の形態観察の結果、器官形成の順序は主軸の片側に 1 枚の鱗片葉 (s1)、反対側にもう 1 枚の鱗片葉 (s2) と 1 枚の普通葉 (l) を繰り返すことが明らかとなった (図 2-3)。

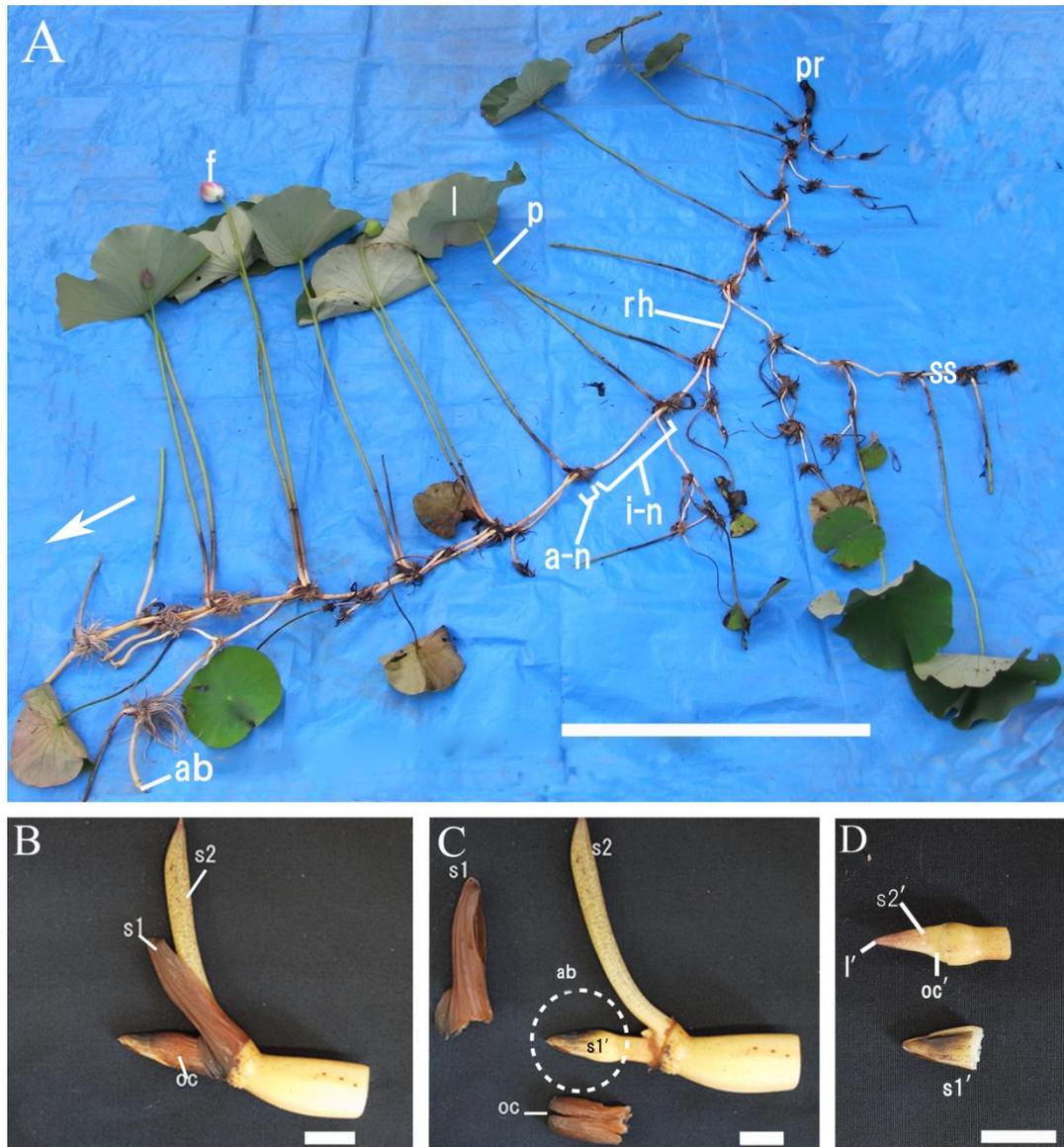


図 2-3. 種レンコンから栽培した植物体の器官形成と葉序

A. 種レンコンから栽培した場合の植物体の全体像。植物体は生育期（9月）に掘り出された。大部分の不定根は取り除いた。B. 頂芽付近（解剖前）。C. パネルBの頂芽付近から、鱗片葉（s1）と托葉鞘（oc）を取り除いた。D. パネルCの頂芽付近から鱗片葉（s1'）を取り除いた。ab, 頂芽; f, 花; i-n, 節間; l, 普通葉; n, 節; oc, 托葉鞘; p, 葉柄; pr, 種レンコン; rh, 地下茎; s1, s2, 鱗片葉; ss, 側枝; 矢印, 生長する方向。スケールバー A: 50cm; B-D: 1cm。（次ページにつづく）。

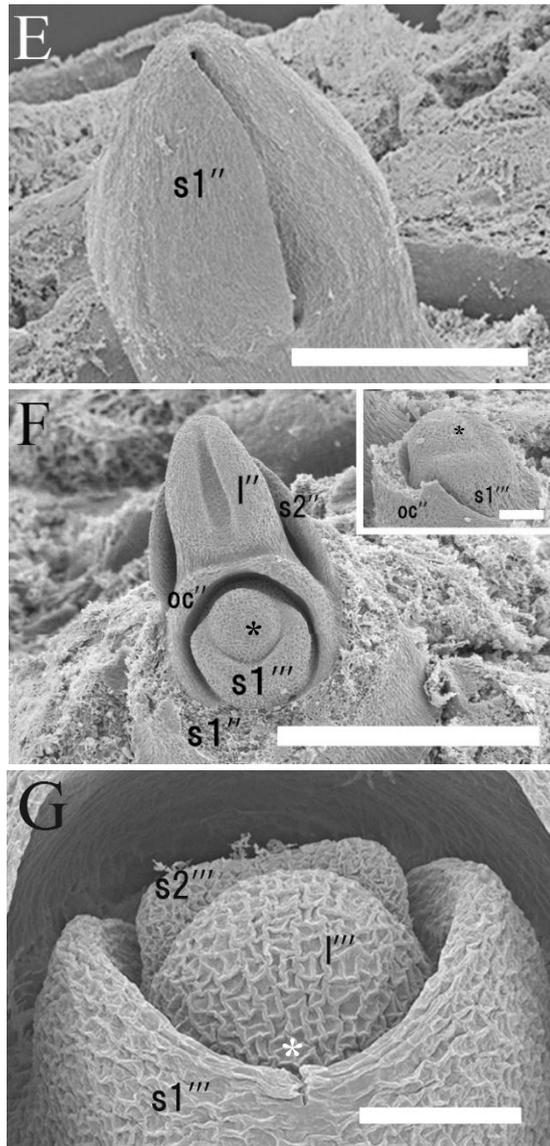


図 2-3. 種レンコンから栽培した植物体の器官形成と葉序 (続き)

E. パネル D の托葉鞘 (oc'), 普通葉 (l'), 鱗片葉 (s2') を取り除いて現れた鱗片葉 (s1'')。F. パネル E から鱗片葉 (s1'') を取り除いた。鱗片葉 (s2''), 普通葉 (l''), 托葉鞘 (oc'') とさらに上位節の鱗片葉 (s1''') と SAM が形成されていた。右上拡大図は s2'', l'', oc'' を取り除いた後の SAM の側面像。より上位節の一部である鱗片葉 (s1''') の形成が確認できる。G. パネル F とは異なるサンプルで、F よりも少し発達が進んだステージの SAM 付近の拡大図。2 枚の鱗片葉 (s1''', s2''') と普通葉 (l''') が形成されている。E-F は SEM 像。

l, 普通葉; oc, 托葉鞘; s1, s2, 鱗片葉; *, SAM。スケールバー E-F: 500 μ m; G, 100 μ m; パネル F 右上拡大図: 50 μ m。

2.3.2 器官形成

側枝の構造

一般に、主軸から側枝が発生する際に最初に形成される葉は特殊な形をしていることが多く、前出葉と呼ばれる。その前出葉が1枚かあるいは2枚であるか、また側枝の葉序を確認するために、頂芽内に形成されている発達途中の側枝を観察した。頂芽から、主軸の2枚の鱗片葉 (s1、s2)、主軸の普通葉 (l)、主軸 (ps) を取り除き、主軸の普通葉の向軸側基部に形成されていた前出葉を露出させた像を示した(図 2-4 A-B)。図 2-4 A-B では、側枝 (s1'、s2'、l') は、同じ方向に着く2枚の前出葉 (a1、a2) に包まれており、確認できない。これら2枚の前出葉 (a1、a2) を取り除くと、側枝 (s1'、s2'、l') の鱗片葉 (s1') が現れた(図 2-4 A-C)。側枝 (s1'、s2'、l') の1枚の鱗片葉 (s1') は背軸側に形成されていた(図 2-4 C)。側枝のもう1枚の鱗片葉 (s2') と普通葉 (l') は、向軸側 (ps) に形成されていた(図 2-4 D)。2枚の前出葉 (a1、a2) が形成されていることを除き、側枝の鱗片葉 (s1') 以降の器官形成、葉序は主軸の頂芽と同一であった(図 2-4 D、図 2-3 F)。しかし、側枝の向背軸の方向が主軸の向背軸の方向と逆転していた(図 2-4 D)。観察したすべてのサンプルにおいて前出葉は2枚あり、その2枚は向軸側に着生していた。

次に、節間伸長が完了した主軸の節を解剖し観察した。図 2-4 E に示した通り、節間伸長が完了した節の前出葉は、外側からはほとんど見えない状態であった。図 2-4 E の鱗片葉 (s1、s2)、托葉鞘 (oc) と不定根 (r) を取り除くと側枝と前出葉 (a1、a2) が露出した(図 2-4 F)。節間伸長が完了した節では、側枝の外側の前出葉 (a1) は小さく半透明で、内側の前出葉 (a2) は褐色だった(図 2-4 F)。また、形成されたすべての節に側枝が形成されており、それらの側枝はさまざまなステージで発達が止まっていた。図 1 B で示した生育期の植物体では、第7節、第8節、第14節の側枝は発達して上位節を

形成し伸長していた。一方、第 6 節、第 9 節、第 15 節の側枝はほとんど発達せずに生育が止まっていた。以上の結果、観察したすべてのサンプルで 2 枚の前出葉 (a1、a2) が向軸側 (ps) に形成され、側枝 (s1'、s2'、l'、f) の 1 枚の鱗片葉 (s1') は、背軸側に生じ、もう 1 枚の鱗片葉 (s2') と側枝の普通葉 (l') は向軸側に形成されていた。

鱗片葉

鱗片葉 (s1) の基部は頂芽の外周に接着し普通葉 (l) の背軸側で重なり合い、発達途中の器官をしっかりと包んでいた (図 2-3 C-E)。内側の鱗片葉 (s2) は、外側の鱗片葉 (s1) と向かい合って形成され、普通葉 (l) と花芽 (図では見えていない) を包んでいた (図 2-3 C、F)。普通葉 (l) は主軸に対し鱗片葉 (s2) と同じ向きに形成されていた (図 2-3 F)。鱗片葉と托葉鞘は、発達途中には区別することができた。しかし、地下茎の伸長が完了した段階では鱗片葉 (s1、s2) と托葉鞘 (oc) は褐色になり壊れやすくなり、判別が困難になった (図 2-4 E-F)。発達が進むと普通葉は水上へ伸長するが、鱗片葉、托葉鞘などは地下茎とともに水中または土中にとどまっていた (図 2-3 A)。以上の結果から、一つの節には鱗片葉が 2 枚形成され、鱗片葉 (s1) の基部は頂芽の外周に接着し普通葉 (l) の背軸側で重なり合い頂芽全体を包んで形成されていた。内側の鱗片葉 (s2) は、外側の鱗片葉 (s1) と向かい合い普通葉 (l) と花芽を包んで形成されていた。また、着生位置と形態から前出葉とは異なる器官であることが示された。

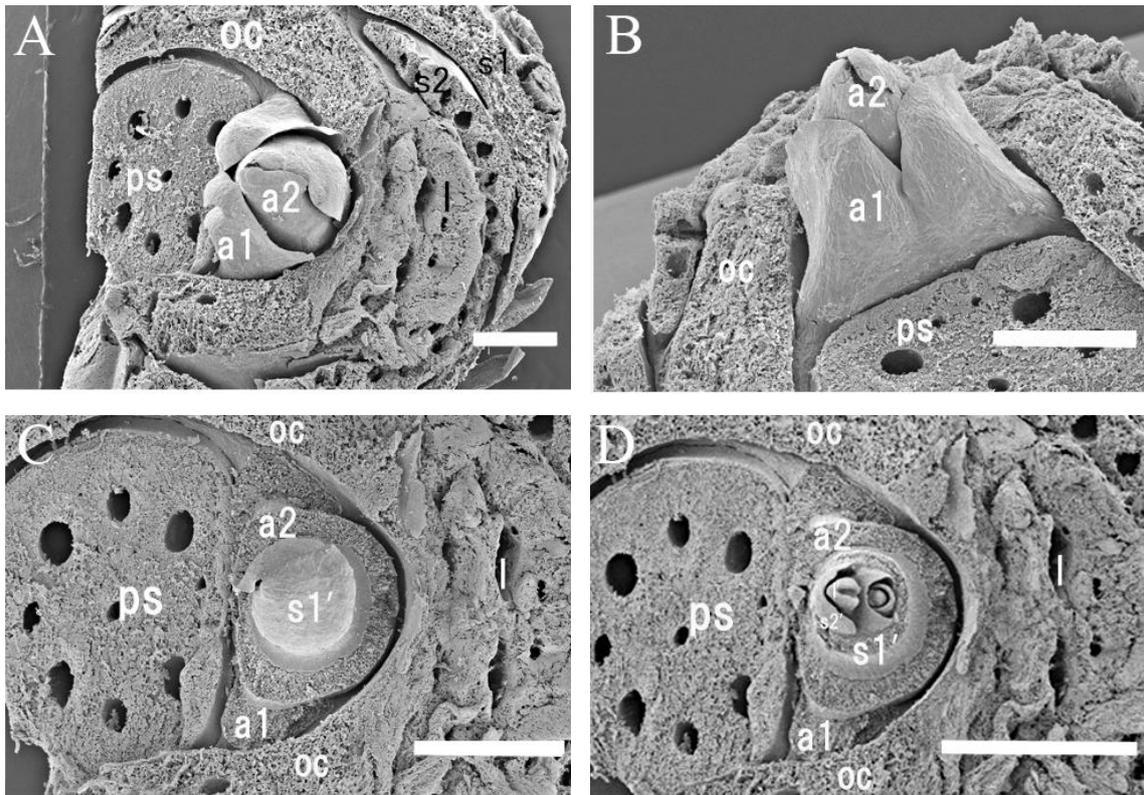
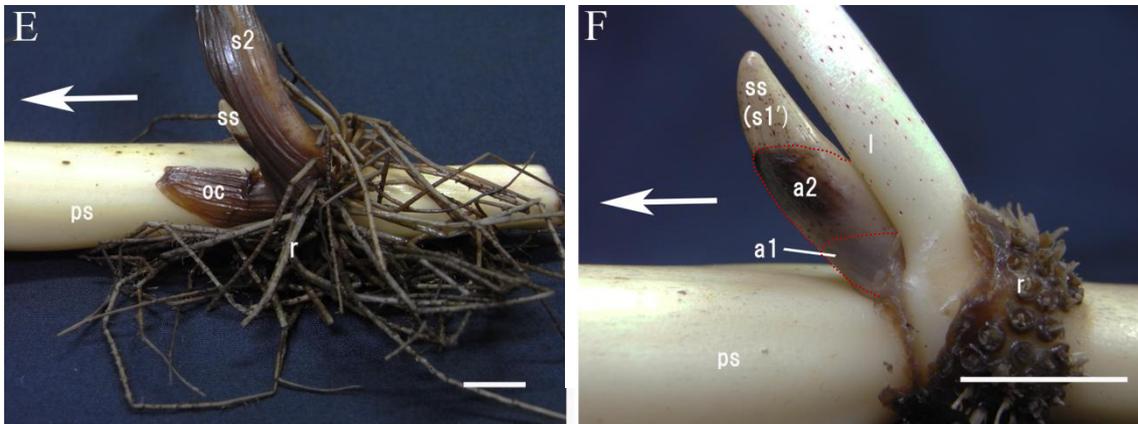


図 2-4. 側枝の着生と形態

A. 頂芽から、主軸の2枚の鱗片葉 (s1, s2)、主軸の普通葉 (l)、主軸 (ps) を取り除き、向軸側基部に形成されていた前出葉 (a1, a2) を露出させた像。頂芽中の2枚の前出葉 (a1, a2) の位置を示している。B. 側面から見た前出葉。外側の前出葉 (a1) の先端が2つに切れ込みが入っていた。C. パネル A から前出葉2枚を取り除くと、側枝 (s1', s2', l) の鱗片葉 (s1') が現れた。D. 鱗片葉 (s1') をパネル C から取り除いた。側枝のもう1枚の鱗片葉 (s2')、普通葉 (l) とさらに上位節の一部が形成されていた。これらの構成要素と葉序は、主軸の頂芽と同一であった。A-D は SEM 像。

a1, a2, 前出葉; l, 普通葉; oc, 托葉鞘; ps, 主軸; s1, s2, 鱗片葉。スケールバーA-D: 1mm。
(次ページへ続く)



G

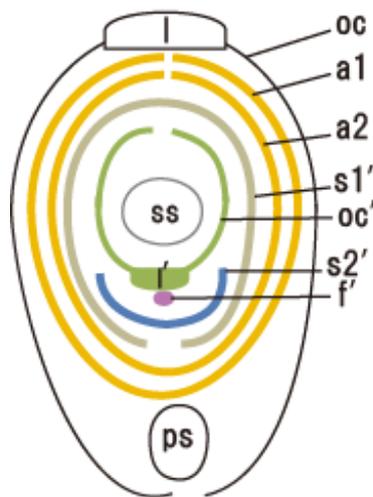


図 2-4. 側枝の着生と形態 (続き)

E. 節間伸長が完了した節 (解剖前)。外部から前出葉は見ることはできなかった。F. パネルEから鱗片葉 (s1、s2) と不定根 (r) を取り除いた。側枝の基部に2枚の前出葉 (a1、a2) が確認できる。G. 前出葉の数と側枝の葉序の模式図。

a1, a2, 前出葉; f, 花芽; l, 普通葉; oc, 托葉鞘; ps, 主軸; r, 不定根; s1, s2, 鱗片葉; ss, 側枝の軸 (パネルE、Fで見えているのは側枝の鱗片葉 (s1')) ; 矢印, シュートが生長する方向。スケールバーE-F: 5mm。

花芽

種子から栽培した場合、前述のとおり発芽後最初に形成された節（第 5 節）には、花芽の形成は確認されなかった（図 2-2 C、J）。種レンコンから栽培した植物体を観察したところ、花芽は普通葉の背軸側基部に形成されていた（図 2-5 A-C）。頂芽から普通葉や鱗片葉を取り除き、花芽の位置または十分に生長した植物体で花芽の形成が予定される位置を露出させて観察した。図 2-5 に異なる発達ステージの頂芽中に形成されていた花芽と普通葉を示した。図 2-5 パネル A、B、C の 3 枚は発達がほぼ同じステージを示している。同様に、D、E、F と G、H、I の 3 枚もそれぞれ同じステージのサンプルである。A、B、C のステージでは、花芽が判別できた。D、E、F のステージでは、花芽形成が予定される場所に花芽原基が確認できる。G、H、I では、花芽形成が判別できない。A、D、G は SAM 付近の普通葉の側面像である。花芽が形成された位置と花芽形成が予定される位置を矢尻で示している。B、E、H では花芽と花芽が予定される位置の拡大像。C、F、I はそれぞれのステージの同様の位置の縦断切片像を示している。D、E、F のステージでは、花芽が突起状の構造であるのに対し、普通葉の形態は確認することができた。これらよりも少し前の発達ステージの G、H、I では、普通葉の原基は確認できるが、花芽の原基は確認できない。以上の形態観察の結果、花芽は普通葉背軸側基部に形成され、普通葉が形成された後に花芽の原基が形成されていることが示唆された（図 2-5）。

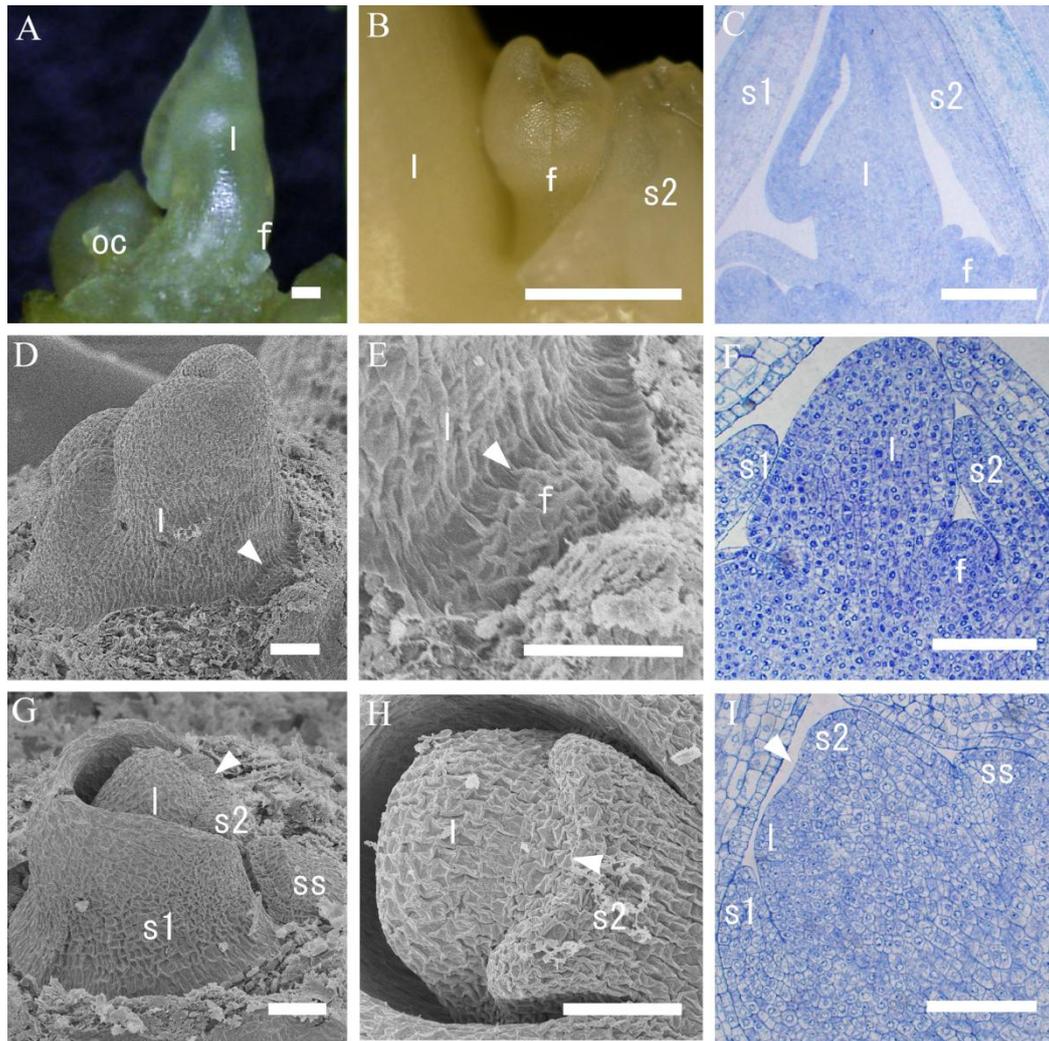


図 2-5. 異なる発達ステージの頂芽中の花芽

A. 頂芽から鱗片葉等を取り除き、花芽を露出させた。発達中の普通葉側面から見た像。花芽 (f) が普通葉 (l) の背軸側に形成されている。B. パネル A と同様のステージの花芽の拡大像。C. A、B と同じステージの頂芽付近の縦断切片像。D. 花芽原基。矢尻は花芽の原基を示している。E. パネル D と同様のステージの花芽が形成される位置の拡大像。F. D、E と同じステージの SAM 付近の縦断切片像。G. D、E、F の図よりも早い発達ステージの SAM 付近。普通葉の原基 (l) が確認できるが、花芽は確認できない。H. G の図を上から拡大した。花芽形成が予定される位置に花芽原基は確認できない。矢尻は花芽形成が予定される場所を示している。I. G、H の図とほぼ同時期の SAM の縦断切片像。普通葉の原基は確認できるが、花芽の原基は確認できない。D、E、G、H は SEM 像。C、F、I はテクノビット切片：サフラニン O とトルイジンブルー O 二重染色。

f, 花芽; l, 普通葉; oc, 托葉鞘; s1, s2, 鱗片葉; ss, 側枝。スケールバーA-C: 500 μ m; D-F: 100 μ m; G-I: 50 μ m。

茎頂分裂組織 (SAM)

種レンコンから栽培した場合の頂芽の縦断切片像を図 2-6 A に、頂芽から鱗片葉や普通葉を取り除き、SAM と考えられる領域を露出させた部位の上部からの SEM 像を図 2-6 B に示した。図 2-6. A と図 2-6. B に主軸の SAM (*) と側枝の SAM (**、**) の位置をアスタリスクで示した。図 2-6. B では、図 2-6. A に示した側枝の SAM (***) は、普通葉 (l') と托葉鞘 (oc') の中に形成されているが図では見る事ができない。図 2-6 A の側枝の SAM (**、**) を比較すると、下位の側枝 (**) の SAM では、既に側枝の普通葉が発達しているのに対し、上位の側枝 (***) では、まだ側枝の普通葉は確認できない。このことが示すように、側枝の SAM のうち一つ下位節の側枝の SAM (***) の方の発達がより進んでいた。以上の観察から、頂芽内には主軸の SAM と側枝の SAM と考えられる領域が存在し、これらの SAM は同時に並行して発達していた。



図 2-6. 頂芽中の SAM

A. 種レンコンから栽培した植物体の頂芽の縦断面像。主軸の SAM (*) と側枝の SAM (**,**) が確認できる。テクノビット切片：サフラニン O とトルイジンブルー O 二重染色。B. 頂芽から普通葉や鱗片葉などを取り除き、SAM を露出させた部位を上から見た SEM 像。主軸の SAM (*) と側枝の SAM (**,**) が確認できる。A に示した側枝の SAM (**,**) は、普通葉 (l') と托葉鞘 (oc') の中に形成されているため B では見えない。
f, f' 花芽; l, l' 普通葉; oc, 托葉鞘; *, **, **, 茎頂分裂組織。スケールバー A-B: 500 μ m。

2.3.3 *SHOOT MERISTEMLESS (NnSTM)* 遺伝子の発現解析

SAM の位置をより確実にするため、また器官形成の順序を特定するため以下の遺伝子発現解析を行った。種レンコンから栽培した植物体の頂芽を用い *SHOOT MERISTEMLESS (NnSTM)* 遺伝子の発現解析を行った。研究開始時には、ハスの *SHOOT MERISTEMLESS STM* 遺伝子の塩基配列が公開されていなかったため、他の植物種の情報をもとにディジェネレーテッドプライマーを混合塩基配列で設計した(表 2-1、図 2-7、図 2-9)。ハスの頂芽から抽出した RNA をテンプレートとし RT-PCR を行った。その産物を電気泳動しバンド部分を回収して精製した (QIAEX II gel extraction kit、Qiagen)。得られた断片を、プラスミド pCRTMII (Invitrogen) に TA クローニング (TA cloning kit、Invitrogen) した。得られたプラスミドの配列と cDNA の挿入の向きをシーケンシング (ABI3130x1 Genetic Analyzer Big Dye Terminator cycle sequence kit、Life Technologies) により確認した。シーケンスして得られた塩基配列および *AtSTM*、*OSHI*、*NAT1* の cDNA 塩基配列から予測されるアミノ酸配列をアライメントし、ハスの *STM (NnSTM)* 配列のクローニングが成功したことを確認した (図 2-8)。また、クローニングした断片の塩基配列をハスのゲノム配列 (NW 010729269.1) と比較した結果、ハスの *NnSTM* は、4 つのエクソンと 3 つのイントロンで構成されていることがわかった (図 2-9)。その後、制限酵素処理 (*SpeI*、Takara) を行った。この配列を鋳型にして、ディゴキシゲニン標識された *NnSTM* アンチセンス RNA プローブをベクター上の T7 プロモーターを用いて MAXIscripKit (Ambion) のプロトコルに従い作製した。*NnSTM* のゲノム配列と *in situ* ハイブリダイゼーションの RNA プローブ作製のためのテンプレート cDNA 増殖用に用いたディジェネレーテッドプライマーの位置を、図 2-7、図 2-8、図 2-9 に示した。種レンコンから栽培した植物体の頂芽のパラフィン切片を作製し、*NnSTM* アンチセンス RNA プローブを用いて *in situ* ハイブリダイゼーションを行った結果を図 2-10 に示した。*NnSTM* のシグナルは、頂芽内の *SAM* の部位で確認され (図 2-10)、それらは図 2-6 A

に示した頂芽内の SAM (*,**,**) の位置と一致していた。この SAM 以外にも花芽 (f) で *NnSTM* のシグナルが発現していた。SAM 付近の拡大図 (図 2-10 B) では、各器官の原基でも *NnSTM* が発現しており、花芽原基 (f) と不定根原基 (r) が特定できた。普通葉 (l, l') では *NnSTM* がすでに発現していないが、花芽原基 (f, f) では発現していた (図 2-10 B)。不定根の原基は、ここに示した以外の切片サンプルの形態観察の結果から位置を特定した。一方、分化の完了した普通葉 (l, l')、托葉鞘 (oc)、鱗片葉 (s1, s1') では、*NnSTM* の発現が確認できなかった (図 2-10 A)。

KNATI	シロイヌナズナ	1	MEEYQHDNSTTPQRVSFLYSPISSNKNDNTSDTNNNNNNNNSSNYGPGYNTNMMNNHHH	60
OSH1	イネ	1	-----MEEISHHFGVVGASGVHGGHQHGH	25
OSH15	イネ	1	-----MDQSFGNLGGG	11
ScSTM	イワタバコ	1	-----MEGSAGNMNMTSSFKGANSYLG	22
NTH15	タバコ	1	-----MGGGGSSG	8
AsSTM	シロイヌナズナ	1	-----MESGSNSTSCPMAFAGDNSDGPMPMPMMMPPIMTSHQHGH	41
KNATI	シロイヌナズナ	61	QHMLFPHMSSLLPQTTECFRSDHDQPNNNNPSYKSEASSSRINH-----YSLMLRAI	114
OSH1	イネ	26	HHPWGSSLSAIVAPPPPPQLQQQTQAGGMAHTPLTLNTAAAAGVGNPVLQLANGSLLDAC	85
OSH15	イネ	12	GGAGSGKAAASSFLQLPLSTAAAATAYYGTPLALHQAAAAAGPSQYHGHGPHHGGGH	71
ScSTM	イワタバコ	23	FGDNVNGFCPMMMPANPNPGDCSQPIFQPLPAANQQGINRNSSSAAACGGSMPEHQS	82
NTH15	タバコ	9	NTSSCLMGYGDDNNNNNSGNAALCPPMMPPPPINNINGESSNIGGNNNNILF-LPF	67
AsSTM	シロイヌナズナ	42	HDHQHQQEHHDGYAYQSHHQSSSLFLQLSLAPPQGTKNKVASSSSPSSCAPAYSLEIHH	101
KNATI	シロイヌナズナ	115	HMTQEANNNDNVDVEAMKAKTIAHPHYSTLLQAYLDCQKIGAPPDVIDRITAARQDF	174
OSH1	イネ	86	GKAKEASASAS-YAADVEAIKAKIISHPHYSSLLAAYLDCQKVGAPPEVAARLTAVAQDL	144
OSH15	イネ	72	HSKHGGAGGGEISAAEAEISKAKIIMAHQYSALLAAYLDCQKVGAPPEVLERLTATAAKL	131
ScSTM	イワタバコ	83	NTSTGYFFMEGDGDAGGGSVKSKIMAHPHYPRLLAAYVNCQKIGAPPEVVAKLEACAST	142
NTH15	タバコ	68	MANNNNPHEDANCSSSSSIKSKIMAHPHYPRLLAAYVNCQKIGAPPEVVARLEEVCATS	127
AsSTM	シロイヌナズナ	102	NEIVAGGINPCSSSSSAVKAKIIMAHPHYHRLAAYVNCQKVGAPPEVVARLEEACSSA	161
KNATI	シロイヌナズナ	175	EARQQRSTPSVSSSRDPELDQFMEAYCDMLVKYREELTRPIQEAMEFIRRIESQLSMLC	234
OSH1	イネ	145	ELRQ-RTALGVLGAATEPELDQFMEAYHEMLVKYREELTRPIQEAMEFLRRVETQLNTLS	203
OSH15	イネ	132	DAR-----PPGRHDARDPELDQFMEAYCNMLAKYREELTRPIQEAMEFLKRVESQDITIA	186
ScSTM	イワタバコ	143	ITIGGR-NERSCVGE-DPALDQFMEAYCEMLTKYEQLSKPFKEAMVFLSRIEQCFKALT	200
NTH15	タバコ	128	ATIG-R-NSGGIIGE-DPALDQFMEAYCEMLTKYEQLSKPFKEAMVFLSRIEQCFKALT	184
AsSTM	シロイヌナズナ	162	AAAAAMGPTGCLGE-DPELDQFMEAYCEMLVKYEQELSKPFKEAMVFLQRVCEQFKSLS	220
KNATI	シロイヌナズナ	235	-----QSPIHILNPNPDKGSDNMGSSDEEQENNSGGETELPEIDPRAEDRELKNHLLKMY	288
OSH1	イネ	204	-----ISG-RSLRN----ILSSGSSSEEDQEG-SGGETELPEIDAHGVDQELKHHLLKMY	251
OSH15	イネ	187	GGAHGGGAGSARLLLDGKSECVGSSSEDDMDP-SGRENEPPEIDPRAEDRELKFKQLLKMY	245
ScSTM	イワタバコ	201	---LSHSSDSGACGEAVLERN--GSSSEEFD-----VNNSFIDPQAEDELKGLLRRY	249
NTH15	タバコ	185	---LTSSESVAALGEAIDRN--GSSSEEFD-----VNNGFIDPQAEDELKGLLRRY	233
AsSTM	シロイヌナズナ	221	---LSSPSSFSGYGETAIDRNNNGSSSEEFD-----MNEFVDPQAEDELKGLLRRY	271
KNATI	シロイヌナズナ	289	SGYLSLQKQELSKKCKKGLPKBARQQLLHWELHYKWPYPSESEKVALAESTGLDQKQI	348
OSH1	イネ	252	SGYLSLQKQELSKKCKKGLPKBARQQLLNHWELHYKWPYPSESEKVALAESTGLDQKQI	311
OSH15	イネ	246	SGYLSLQKQELSKKCKKGLPKBARQQLLHWELHYKWPYPSESEKVALAESTGLDQKQI	305
ScSTM	イワタバコ	250	SGYLGSLKQEFMKKCKKGLPKBARQQLLDWWSRHYKWPYPSESEKVALAESTGLDQKQI	309
NTH15	タバコ	234	SGYLGSLKQEFMKKCKKGLPKBARQQLLDWWSRHYKWPYPSESEKVALAESTGLDQKQI	293
AsSTM	シロイヌナズナ	272	SGYLGSLKQEFMKKCKKGLPKBARQQLLDWWSRHYKWPYPSESEKVALAESTGLDQKQI	331
KNATI	シロイヌナズナ	349	NNWFINQRKRHWKPSDEMDFVMDGLQHPHHAALYMDGHYMGDGP-YRLGP	398
OSH1	イネ	312	NNWFINQRKRHWKPSDEMDFVMDGYHPTNAAAFYMDGHFINDGGLYRLG-	361
OSH15	イネ	306	NNWFINQRKRHWKPSDEMDFVMDGFHPQNAALYMDGPFMADGM-YRLGS	355
ScSTM	イワタバコ	310	NNWFINQRKRHWKPSDEMDFVMDATHPH-YMDNFMGTFPMD-ISPSFL	358
NTH15	タバコ	294	NNWFINQRKRHWKPSDEMDFVMDAAHPH-YMDNVLGNPFPMD-ITPTLL	342
AsSTM	シロイヌナズナ	332	NNWFINQRKRHWKPSDEMDFVMDATHPHHYFMDNVLGNPFPMDHISSTML	382

図 2-7. いくつかの植物種の STM 塩基配列から予測されるアミノ酸配列のアライメント

矢印 (F, Foward; R, Reverse) は、*NnSTM* を標的とした *in situ* ハイブリダイゼーションの RNA プローブ作製のためのテンプレート cDNA 増殖用ディジェネレーテッドプライマーに対応する位置。

NnSTM	ハス	1	-----	1
At5STM	シロイヌナズナ	1	-----MESGSNSTSCPMAFAGDNSDGMCPMMMMPPIMTSHQHHGHDHQHQ	47
NTH15	タバコ	1	-----MGGGSSGNTSSCL	14
SrSTM1	イワタバコ	1	-----MEGSAGNMNMTSSFKGANSYLGFGDNVN	28
KNAT1	シロイヌナズナ	1	MEEYQHDNSTTPQRVSYFLYSPLSSSNKNDNTSDTNNNNNNNNSSNYGPGYNNTNNNNHHH	60
NnSTM	ハス	1	-----	1
At5STM	シロイヌナズナ	48	QQEHDGYAYQSHHQSSSLFLQSLAPPQGTKNKVASSSSPSSCAPAYSLMEIHHNEIVAG	107
NTH15	タバコ	15	MGYGDDNNNNNSGNAALCPPMPPPIINNNGESSNIGGNNNNILF-LPFMANN	73
SrSTM1	イワタバコ	29	GFCPMMMMPANNPGDCSQPIFQPLPAANQQGINRNSSSAAACGGSMPEHQSTSTGY	88
KNAT1	シロイヌナズナ	61	QHMLFPHMSSLLPQTTECFRSDHQPNNNNPSVKSEASSSRINHYSMMLRAIHTQEA	120
NnSTM	ハス	1	-----KIMAHPHYPRLLSAYVNCQKVGAPPEVVAKLEEACASEEAMG-R	43
At5STM	シロイヌナズナ	108	GINPCSSSSSSASVKAKIMAHPHYHRLLAAYVNCQKVGAPPEVVARLEEACSSAAAAAAS	167
NTH15	タバコ	74	NPHEDANCSSSSSIKSKIMAHPHYPRLLSAYVNCQKVGAPPEVVARLEEVCATSATIG-R	132
SrSTM1	イワタバコ	89	YFMEGDGDAGGGSVSKIMAHPHYPRLLAAYVNCQKVGAPPEVVAKLEEACASTITIGGR	148
KNAT1	シロイヌナズナ	121	NNNNNDNVSDVEAMKAKIMAHPHYSTLLQAYLDCQKVGAPPEVVDRTAARQDFEARQR	180
NnSTM	ハス	44	-NGRGCIGE-DPALDQFMEAYCEMLTKYEQELTKPFKEAMFELSRTECQFKALTVS--SV	99
At5STM	シロイヌナズナ	168	MGPTGCLGE-DPGLDQFMEAYCEMLTKYEQELSKPFKEAMFELQRVCEQFKSLSSPSS	226
NTH15	タバコ	133	-NSGGIIGE-DPALDQFMEAYCEMLTKYEQELSKPFKEAMFELSRTECQFKALTLTSSSE	190
SrSTM1	イワタバコ	149	-NERSCVGE-DPALDQFMEAYCEMLTKYEQELSKPFKEAMFELSRTECQFKALTLSSHSD	206
KNAT1	シロイヌナズナ	181	STPSVSASSRDPDELQFMEAYCDMLTKYREELTRPIQEAEMFIRRLDESQLSMLCQSPHI	240
NnSTM	ハス	100	DSACGEGT-DRN--GSSEEE---VDANDNYIDPQAEKELKGQLLRKYSGYLGSLKQEF	153
At5STM	シロイヌナズナ	227	FSGYGETAIDRNNNGSSEEE---VDMNNEFVDPQADRELKGQLLRKYSGYLGSLKQEFM	283
NTH15	タバコ	191	SVAALGEAIDRN--GSSEEE---VDVNGFIDPQAEQELKGQLLRKYSGYLGSLKQEFM	245
SrSTM1	イワタバコ	207	SGACGEAVLERN--GSSEEE---FDVNSFIDPQADRELKGQLLRKYSGYLGSLKQEFM	261
KNAT1	シロイヌナズナ	241	LNNPDGKSDNMGSDEEEENNSGGETEPEIDPRAEDRELKNHLLRKYSGYLSLQELS	300
NnSTM	ハス	154	KKRKKGKLPKEARQQLLDWWSRHYKWPYPSESQKLALAEESTGLDQKQINNWFINQRKRHW	213
At5STM	シロイヌナズナ	284	KKRKKGKLPKEARQQLLDWWSRHYKWPYPSESQKLALAEESTGLDQKQINNWFINQRKRHW	343
NTH15	タバコ	246	KKRKKGKLPKEARQQLLDWWSRHYKWPYPSESQKLALAEESTGLDQKQINNWFINQRKRHW	305
SrSTM1	イワタバコ	262	KKRKKGKLPKEARQQLLDWWSRHYKWPYPSESQKLALAEESTGLDQKQINNWFINQRKRHW	321
KNAT1	シロイヌナズナ	301	KKRKKGKLPKEARQQLLWWSRHYKWPYPSESEKVALAEESTGLDQKQINNWFINQRKRHW	360
NnSTM	ハス	214	KPSEDM-----	219
At5STM	シロイヌナズナ	344	KPSEDMQFVVMDA-THPH--YFMD-NVLGN-PFPMDHISSTML	382
NTH15	タバコ	306	KPSEDMQFVVMDA-AHPH---YYMD-NVLGN-PFPMD-ITPTLL	342
SrSTM1	イワタバコ	322	KPSEDMQFVVMDA-THPH---YYMD-NFMGT-PFPMD-ISPSFL	358
KNAT1	シロイヌナズナ	361	KPSEDMQFMVMDGLQHPHHAALYMDGHYMGDGPYRLGP-----	398

図2-8. クローニング後のハスと他の植物種のSTM塩基配列から予測されるアミノ酸配列のアライメント

矢印 (F, Foward; R, Reverse) は、NnSTM を標的とした in situ ハイブリダイゼーションのRNAプローブ作製のためのテンプレート cDNA 増殖用ディジェネレーテッドプライマーに対応する位置。

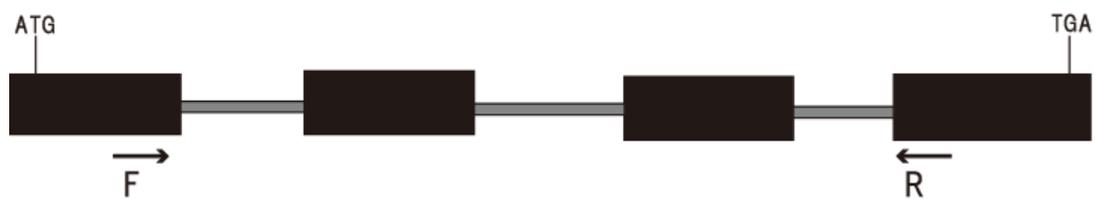


図 2-9. *NnSTM* 遺伝子の構造

4つのエクソン(■)と3つのイントロン(—)。矢印 (F, Forward と R, Reverse) は *NnSTM* を標的とした *in situ* ハイブリダイゼーションの RNA プロブ作製のためのテンプレート cDNA 増殖用ディジェネレーテッドプライマーに対応する位置。

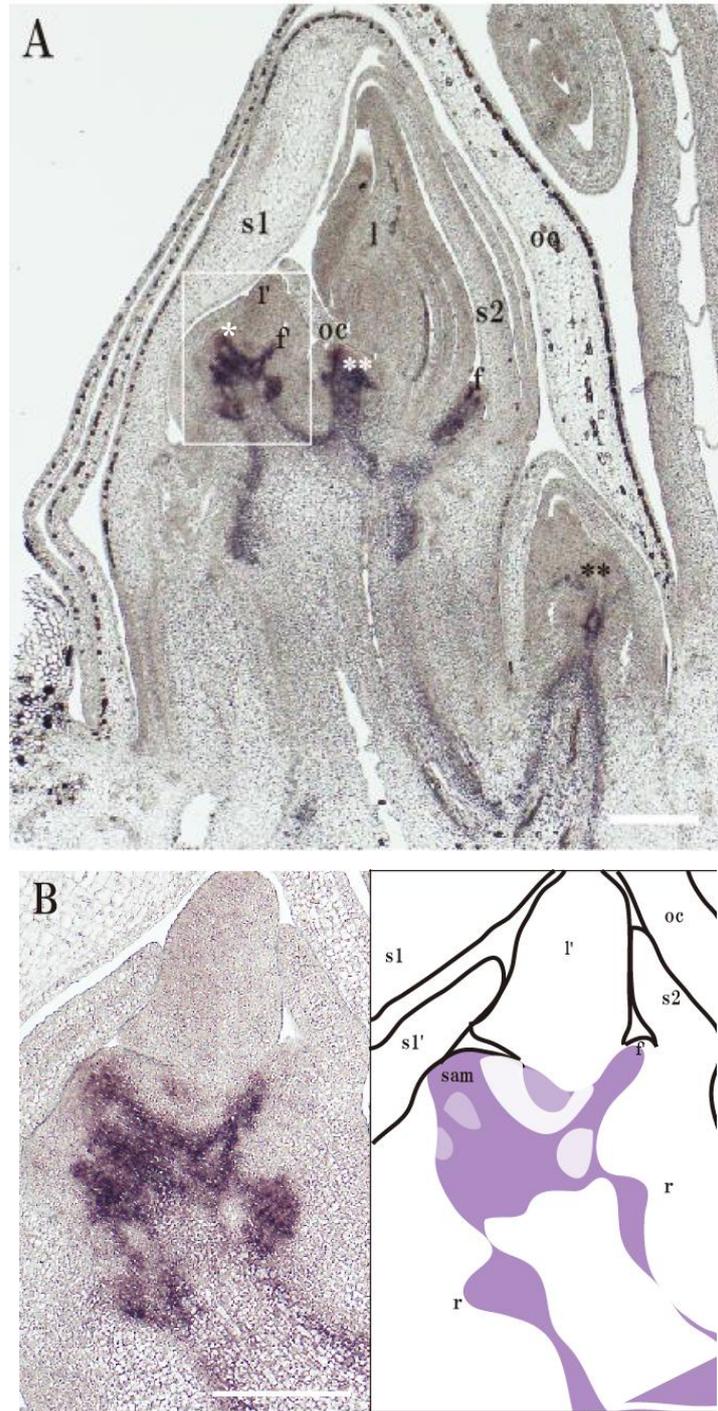


図 2-10. *SHOOT MERISTEMLESS (NnSTM)* 遺伝子の頂芽での発現パターン

A. 種レンコンから栽培した植物体の頂芽の縦断面のパラフィン切片を *in situ* ハイブリダイゼーションで *NnSTM* 遺伝子の発現を検出した結果、SAM がある部位で *NnSTM* のシグナルが検出された。B. パネル A の SAM 付近の拡大像と発現パターンの模式図。f, 花芽; l, 普通葉; oc, 托葉鞘; r, 不定根原基; s1, s2, 鱗片葉; *, **, ***, 茎頂分裂組織。スケールバーA-B: 200 μ m。

2.4 考察

器官の形成順序

完熟種子の形態観察の結果から、ハスは種子形成の過程で子葉、第1節から第4節までの器官と第4節普通葉基部に1つの未分化のSAMが形成されていることを確認した(図2-2 A-G)。また、第1節から第4節までの普通葉は向かい合って形成していた。第3普通葉は第2節普通葉の托葉鞘に、第4節の普通葉は第3節の普通葉の托葉鞘にそれぞれ包まれていた(図2-2 A-G)。発芽後、種子形成の過程で形成されていた4枚の普通葉が展開し、SAMから新たな器官が形成された。第5節以降の主軸の器官形成の順序は、軸の片側に1枚の鱗片葉(s1)、反対側にもう1枚の鱗片葉(s2)と托葉鞘(oc)を含む普通葉(l)で、これらの器官が形成されるのと同時に、第4節普通葉向軸側基部に前出葉を伴った第4節の側枝が形成されていた(図2-2 K)。種子の中に形成された第4節までと、発芽後に最初に形成された主軸の第5節には花芽(f)は確認されなかった(図2-2 J、L)。種子の形態や、発芽後の器官形成については先行研究でも述べられてきた(Eichler 1878; Wigand and Dennert 1888; Miki 1927; 南川 1974)。本研究は、光学顕微鏡およびSEMを用いた観察で種子中の普通葉の形成位置を示した。特に、先行研究では用いられていないSEM像を示すことにより、第2節普通葉の托葉鞘(oc2)内の器官を観察し、第3節普通葉と第4節普通葉の位置関係を明示した。

種レンコンから栽培した植物体を用いて発達ステージの異なる頂芽を観察した結果、次のことが示された。ハスを種レンコンから栽培した十分に生長した植物体の場合、頂芽中には常に2から3セットの発達途中の節が形成されていた。頂芽内に形成されていた器官は、節間伸長を伴いながら順に展開し地下茎を形成する。この主軸の器官形成の順序は、片側に1枚の鱗片葉(s1)、反対側にもう1枚の鱗片葉(s2)と托葉鞘(oc)を含む普通葉(l)、花芽(f)の順であった(図2-3、図2-5)。また、節を構成する器官の

発生と同調して前出葉と側枝が形成されていた (図 2-5 G)。種子の発芽後、最初に形成される主軸の第 5 節の器官形成と、種レンコンから栽培した場合に形成される器官形成の違いは、花芽の有無であり、それ以外の器官形成の順序や節の構成器官、形成の向きなどすべて同一であった (図 2-2 J、図 2-6 A)。本章の結果をまとめ、発芽後に形成された頂芽内の葉序の模式図を図 2-11 A にハスの分枝の模式図を図 2-11 B に示した。ハスを種子から栽培した場合、ある程度生長すると花芽を生じる。花芽形成の開始は第 11 節以降であることが示された。このことについては後に述べる。

茎頂分裂組織 (SAM)

ハスの完熟種子の形態観察の結果、種子形成の過程で形成された SAM が 1 つあることが示された (図 2-2. C)。発芽後、この SAM から第 4 節の側枝と第 5 節以降の器官が形成された。図 2-2 L では、播種後 15 日の実生の断面図を示しており、頂芽中には第 5 節、第 6 節の器官分化が完了し、さらに上位の第 7 節が器官分化の過程にあることが示されていた (図 2-2. J)。第 4 節の普通葉向軸側基部には、第 4 節の側枝が (図 2-2 K)、第 5 節の普通葉向軸側基部には、第 5 節の側枝 (図 2-2 J) の形成が確認できる。種レンコンから栽培した場合の発達ステージの異なる頂芽の観察の結果、頂芽中には、主軸の SAM と側枝の SAM があった (図 2-6 A *, **, ***)。これらの SAM では同時並行的に器官形成が進行していたことが示された。より確実に SAM の位置を特定するため、*SHOOT MERISTEMLESS (NnSTM)* 遺伝子の *in situ* ハイブリダイゼーションによる発現解析を種レンコンから栽培した植物体の頂芽を用いた。その結果、形態観察により SAM と考えていた位置と *NnSTM* の発現位置が一致した。本章の結果をまとめた頂芽内の葉序の模式図を図 2-11 A に示した。

分枝

先行研究間の第 1 の相違点である、ハスの分枝様式が仮軸か単軸かについて、本章の結果をまとめハスの分枝の模式図を図 2-11 B に示した。先行研究の仮軸生長とする解釈 (Wigand and Dennert 1888; Miki 1927; Chassat 1962; 熊沢 1979) では、シュート形成は普通葉 (l) から始まり、次いで 2 枚の鱗片葉 (s1, s2) が軸の両側に 1 枚ずつ互生し、花芽でシュート形成が終わる有限生長とした (図 2-11 C、Miki 説)。一方、単軸生長とする解釈 (Eichler 1878; Esau and Kosakai 1975) では、主軸の片側に 1 枚の鱗片葉 (s1)、反対側にもう 1 枚の鱗片葉 (s2) と 1 枚の普通葉 (l) が軸の同一側に形成される特異的な 3 葉構造が形成され主軸が無限生長すると解釈した (図 2-11 D、Esau and Kosakai 説)。本研究の結果、ハスのシュートは単軸生長で形成され、花芽は側芽であると解釈した。主な理由は次の 4 点である。① 種子中に形成されていた第 4 節までは、典型的な単軸生長である。② 第 5 節以後、最初に花芽が形成されるまでの間は、花芽すなわち花茎とは無関係な生長であり、ss を側枝とする単軸生長が続いていると考えられる。このことは従来の解釈と一致しており、ss の基部のみに前出葉と見られる 2 枚の葉を生じることが ss が側枝であることを支持している。従って、s2 と普通葉が主軸の同じ側に形成されることは単軸生長におけるハス固有の葉序と考えられる。③ 花芽が形成されるようになってからの生長においても、このハス固有の葉序が継続されることから、単軸生長も継続していると考えられる。従って花芽は側生であり、その発生位置から s2 の側芽とみなされる。④ 図 2-10 の結果では、普通葉 (l, l') では *NnSTM* がすでに発現していないが、花芽原基 (f, f') では発現していた。このことは、普通葉が花芽より先に分化し発達していること、すなわち本論文で側芽であると解釈する花芽が主軸上の器官よりも遅れて発達することを示しており、単軸説と矛盾しない。

側枝

先行研究間の第2の相違点は、前出葉が1枚かあるいは2枚であるか、また側枝の葉序である。先行研究 (Eichler 1878; Wigand and Dennert 1888; Miki 1927; Esau and Kosakai 1975)では、4つの異なるパターンが提示された。これまでに報告されたハスの側枝の基部模式図を図2-4 G に示した (Miki 1927)。以下に4つのパターンを示す。① 2枚の前出葉 (a1, a2) は向軸側 (ps) に形成され、側枝 (s1', s2', l', f) の1枚の鱗片葉 (s1') は、背軸側に生じ、もう1枚の鱗片葉 (s2') と側枝の普通葉 (l') は向軸側に形成される (図2-4 G 1)。② 1枚の前出葉 (a) が向軸側 (ps) に形成され、側枝 (s1', s2', l', f) の2枚の鱗片葉 (s1', s2') と普通葉 (l') は背軸側に生じる (図2-4 G 2)。③ 1枚の前出葉 (a) が向軸側 (ps) に形成され、側枝 (s1', s2', l', f) の1枚の鱗片葉 (s1') は、背軸側に生じ、もう1枚の鱗片葉 (s2') と側枝の普通葉 (l') は向軸側に形成される (図2-4 G 3)。④ 1枚の前出葉 (a) が向軸側 (ps) に形成され、側枝 (s1', s2', l', f) の1枚の鱗片葉 (s1') は、向軸側 (ps) に、もう1枚の鱗片葉 (s2') と側枝の普通葉 (l') は背軸側に生じる (図2-4 G 4)。Eichler (1878) は、パターン①を、Miki (1927) はパターン③であるとの結果を示した。Wigand and Dennert (1888)、Esau and Kosakai (1975) はパターン②、③、④の3つのパターンが混在するとの見解を示した。

本研究で観察したすべてのサンプルで2枚の前出葉 (a1, a2) が向軸側 (ps) に形成され、側枝 (s1', s2', l', f) の1枚の鱗片葉 (s1') は、背軸側に生じ、もう1枚の鱗片葉 (s2') と側枝の普通葉 (l') は向軸側に形成されていた。すなわちパターン①である。側枝が節間伸長する際に側枝のシュートの先端が約180度ねじれる Esau and Kosakai (1975)。この性質により、側枝の節間伸長の前後で向きが異なり、先行研究間で結果の不一致が生じたのではないかと考えられる。また、前出葉の数と着生の向きの観察は、伸長が完了した植物を材料として用いた場合、2枚の前出葉は、褐色または半透明で壊れやすく判別が難しい。また花と普通葉以外の地下茎や鱗片葉などの部位が水中または

土壌中にとどまることも、生育が完了した植物体を用いて形態観察するのを困難にしている。

A

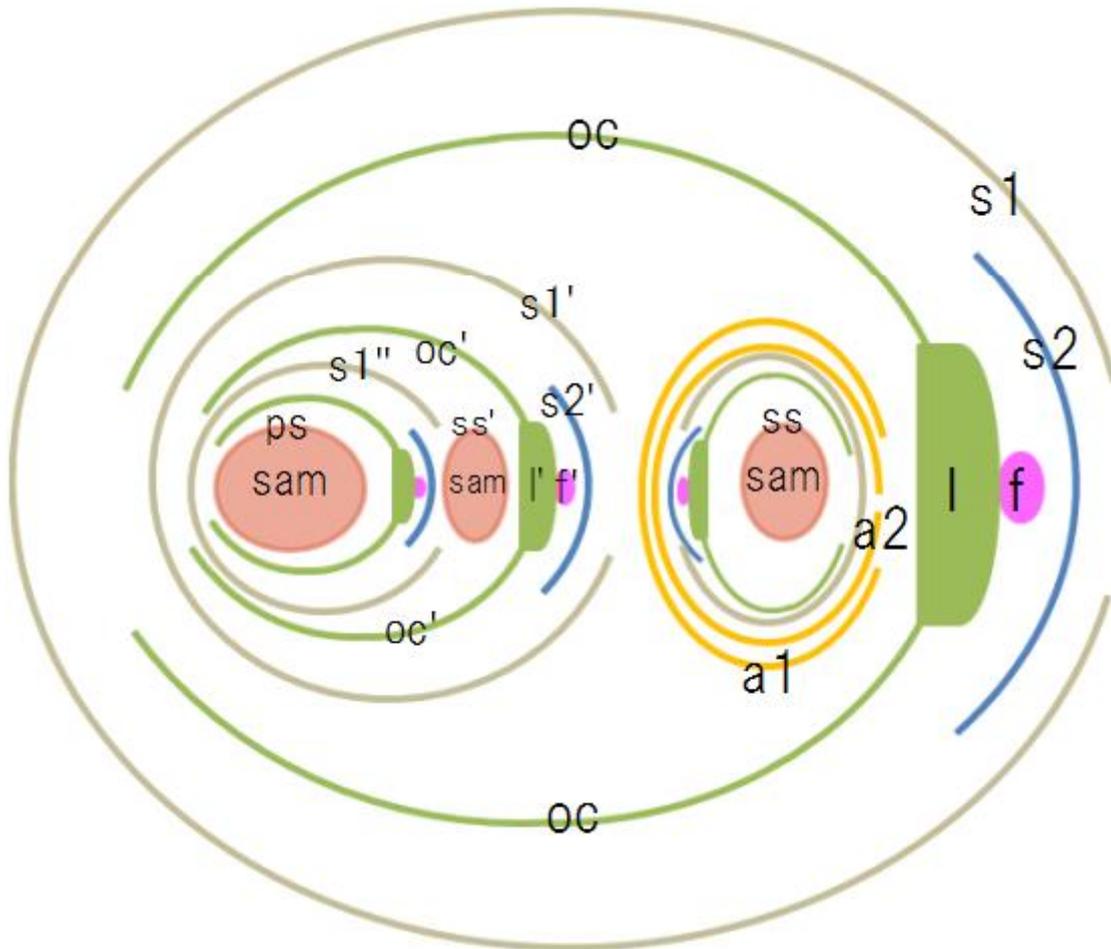


図 2-11. 頂芽中の SAM の位置と葉序、分枝の模式図

A. 発芽後に形成された頂芽内の葉序の模式図。

a1, a2, 前出葉; f, 花芽; l, 普通葉; oc, 托葉鞘; ps, 主軸; s1, s2, 鱗片葉; ss, 側枝の軸; sam, 頂芽分裂組織 (次ページへ続く)

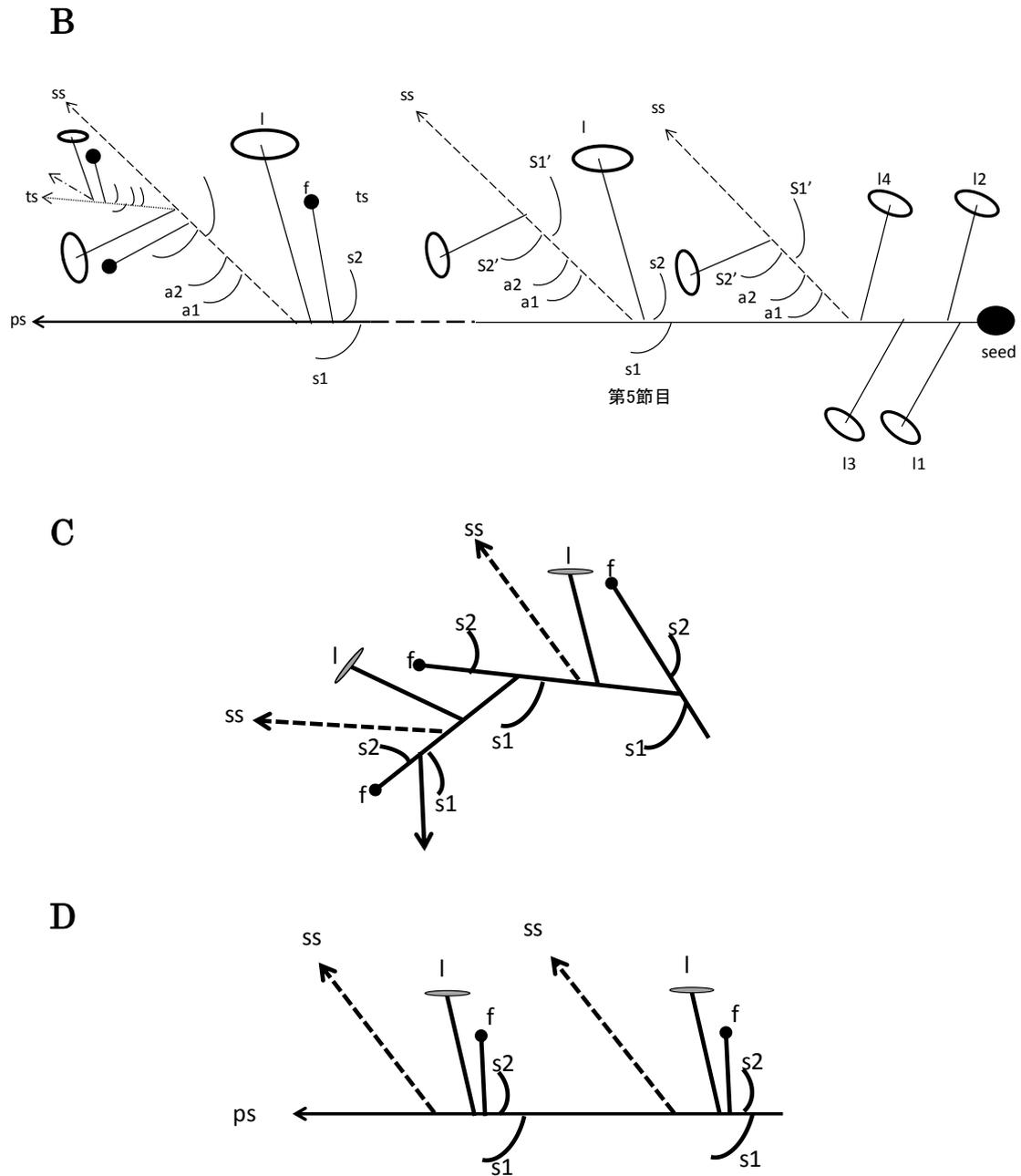


図 2-11. 頂芽中の SAM の位置と葉序、分枝の模式図 (続き)

B. 種子から栽培した発芽初期の、分枝の模式図 (本研究の結果に基づき作成)。C. 仮軸説の模式図 (Miki 1927 説、図 2-1 A. と同じ図)。D. 単軸説の模式図 (Esau and Kosakai 1975 説、図 2-1 B. と同じ図)。(B、C は熊沢 1979 改変)。

a1, a2, 前出葉; f, 花芽; l, 普通葉; oc, 托葉鞘; ps, 主軸; s1, s2, 鱗片葉; ss, 側枝の軸; ts, 3 次分枝の軸。

第 3 章. 花芽形成期

3.1 序論

ハスの園芸品種は、遺伝的形質を維持するために地下茎（レンコン）を植え継ぐ栄養繁殖法が一般に用いられている。温帯型のハスの慣行栽培では、越冬のために肥大した地下茎の先端の2節程度を回収して種レンコンとし、春に植えつける。植えつけられた種レンコンは生育を開始すると頂芽部分から水平に地下茎を伸長させる。春から秋にかけての生育期間は、前章で述べたように節を構成する各器官を形成しながら節間伸長する。花芽は、普通葉の背軸側基部に形成される (Wigand and Dennert 1888; Miki 1927; Takhtajan 1969; 熊沢 1979)。花芽形成に関する先行研究は、前述の分枝、葉序などの形態観察により花芽形成の位置を示した研究、花弁や雄蕊などの花器官の発達を SEM 観察により明らかにした研究 (Ito 1986; Hayes *et al.* 2000) などがある。南川 (1974) は、普通葉が形成される主軸の節には、ほとんど花芽（潜芽）が形成されていると述べているが、実験データや観察記録等は示されていない。花芽がすべての節に形成されるか、生育開始から休眠までの間のどの時点で花芽形成が開始するかという点は不明のままである。ハスは1シーズンの生長で地下茎の長さが5m以上になり、また植物体の大部分が水中の用土中にあることから、これらの器官を継続して観察することはきわめて困難である。

本章では、これらの疑問点を明らかにするために、まず種レンコンをプラスチック容器で1個体ごとに栽培し、11か月の間（5月から翌年4月）の各時期に植物体を掘り出しすべての節の花芽形成の有無と花芽の形態を観察した。これらの実験の結果、すべての節に花芽が形成されていることが示された。また、それらの花芽のほとんどが開花することなく、さまざまな発達段階で枯死していることが明らかとなった。

また、種子から栽培した場合、生長のどの時点から花芽形成が開始するか明らかにするために実生の形態観察を行った。それと同時に、花メリステムアイデンティティ遺伝

子の一つである *APETALA1* (*NnAPI*) 遺伝子の発現を調べ、花芽形成の指標の一つとした。*NnAPI* は花芽の器官形成に関与する MADS-box 転写因子をコードしており、ABC モデルではクラス A に分類されている (Coen and Meyerowitz 1991)。シロイヌナズナでは、*API* は花芽の原基で発現することが報告されている (Wigge *et al.* 2005)。ハスにおいても、Yoo ら (2010) により *API* オルソログの *NnAp1* (*Nenu.API*, GU048643.1) が公開され、萼片、花弁、雄蕊、葉などで発現していることが示された。

3.2 材料および方法

材料

本章の実験には、第2章（材料および方法）と同じ品種の種レンコンと種子を同様に処理したものをを用いた。

方法

種レンコンからの栽培と観察

準備した20本の種レンコンは、容量80リットルのプラスチック製容器に1本ずつ2009年5月10日に植えた。栽培は、東京大学大学院農学生命科学研究科旧附属緑地植物実験所（千葉県千葉市花見川区：北緯35.6°東経140°標高24m）で行った。プラスチック製容器には、栽培用土を深さ15cm入れ、水をはった。植えつけ後、栽培容器は屋外の自然光下で管理され、定期的に灌水し栽培用土表面から約15cmの水深を保った。生育期には2週間に1回、約10gの化成肥料（ダイヤアミノ(5-5-5)、三菱商事アグリサービス）を施肥した。サンプリングは、2009年8月8日(90 DAP)から2010年4月18日(343 DAP)の間に行った(表3-3)。観察用のサンプルは、植物全体を栽培容器から掘り出し、水道水で土を丁寧に洗い流し、各節の不定根を取り除いた。植え付けから観察日までの間に種レンコンから形成された節数を数え、番号を付けてその節毎に観察した。いくつかの個体の種レンコンは腐植化したため作業の過程で回収できなかった。サンプリングごとに別の植物体を掘り出して用い、観察が終わったサンプルはすべて廃棄し植え戻して再度観察に用いることはなかった。9月24日(137 DAP)、10月9日(150 DAP)、10月31日(172 DAP)、11月25日(199 DAP)に行ったサンプリングでは、各日2個体、1つは開花のみられた個体、もう1つは開花のみられなかった個体を選びサンプリングを行った(表3-3)。頂芽の中に形成されている発達途中の節も含む、すべての節

を解剖し実体顕微鏡 (M125、Leica) を用いて観察した。

種子からの栽培

まず、種子 (50 粒) の柱頭の逆側 (図 2-2 A の種子の上端に相当する) に剪定ばさみで切れ込みをいれた。水をはったプラスチック容器に種子を入れ、アルミホイルで遮光して冷蔵庫 (4°C) で 3 日間保存し十分に吸水させた。その後、栽培用土を深さ 5 cm に入れ、水をはった容量 10 リットルのプラスチック製容器 (直径 30 cm、深さ 15 cm) に播種した。播種後は、屋外の自然光の下で栽培した。栽培は東京大学弥生キャンパス (東京都文京区: 北緯 35.7° 東経 139.8° 標高 17.7m) で行った。栽培用土表面から約 10 cm に水深を保った。第 5 節の普通葉が展開して以降は、2 週間に 1 回、約 2 g の化成肥料 (ダイヤアミノ(5-5-5)、三菱商事アグリサービス) を施肥した。定量 RT-PCR 用のサンプルについては、時期をずらして 3 回 (① 2013 年 4 月 29 日、② 5 月 13 日、③ 6 月 10 日) 播種した。

走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察

第 2 章 (材料および方法) の SEM 観察と同様の方法で観察を行った。

RNA 抽出と cDNA 合成

第 2 章 (材料および方法) と同様の方法で RNA 抽出と cDNA の合成を行った。RNA の量を極微量分光光度計 (Nanodrop 2000c、Thermo Fisher Scientific) およびバイオアナライザー (2100、Bioanalyzer Agilent) を用い確認した。抽出された RNA の RIN 値が、8.0 以上のサンプルを用いた。

in situ ハイブリダイゼーション

ハスの *API* ホモログとして公開されている *NnAp1* の cDNA 配列 (GU048643.1) をもとに、設計したプライマーを下記に示した (表 3-1、図 3-4)。これらのプライマーを用いてハスの頂芽から前項の方法で抽出した RNA をテンプレートとし RT-PCR (Go taq master mix、Promega) を行った。この後は、第 2 章 (材料および方法) に記した手順と同様に行った。

表 3-1. *API* を標的とした *in situ* ハイブリダイゼーションの RNA プロブ作製のためのテンプレート cDNA 増殖用プライマーセット。

Primer name	5' -3'
<i>NnAPI-F</i>	GATCGTCTTCTCCACCACCAAGG
<i>NnAPI-R</i>	GTGAGGGAAGTGGCTGTGAT

定量 RT-PCR

NnAPI (GU048643.1) と *NnActin* (EU131153) を標的配列として設計したプライマーを下記に示した(表 3-2)。ハスの頂芽から全 RNA を抽出・精製し (RNeasy Mini Kit, Qiagen)、さらに DNAase 処理 (TURBO DNA-free, Ambion) を行った。その後、逆転写 (Super Script III Reverse Transcriptase, Life Technologies) し cDNA を合成した。各プライマーセットにより目的の領域が単独で増幅していることを確認するため、PCR 産物をアガロースゲル電気泳動によって分離し確認した。また、PCR 産物をクローニング後、シーケンシング (ABI3130x1 Genetic Analyzer, Big Dye Terminator cycle sequence kit, Life Technologies) を行い配列を確認した。定量 RT-PCR は ABI7300 (Life Technologies) を用いて行った。また、反応毎に標準曲線、解離曲線で、PCR 反応が正しく行われていることを確認した。定量結果は、*NnAPI* の Ct 値と *NnActin* の Ct 値の比 (*NnAPI/NnActin*) を算出し示した。

表 3-2. 定量 RT-PCR 用プライマーセット

Primer name	5' -3'
<i>NnAPI</i> -F	CTGAAGTCGCTGTGATCGTCTT
<i>NnAPI</i> -R	ATCCTTTCCATGCCGGAATC
<i>Actin</i> -F	GSCCTTGCTGGTCGTGATCT
<i>Actin</i> -R	GAAAGAGTACCCTCTCTCAGTAAGGA

3.3 結果

3.3.1 形態観察による花芽形成期の特定

種レンコンから栽培した場合

ハスを種レンコンから栽培した場合、いつ花芽形成が開始するか確認するため、光学顕微鏡を用い形態観察を行った。種レンコンをプラスチック容器に植え付け、屋外で慣行栽培した。観察時に植物体全体を掘り出し、土と不定根を取り除き、種レンコンから観察時まで新たに形成された節数を数え番号をつけた。節間伸長と器官の発達が完了した各節と、頂芽内の形成過程の節のそれぞれに、花芽が形成されているか否かを実体顕微鏡下で確認した。解剖前の頂芽と節（節間伸長後）の形態を図 3-1 A と図 3-2 A にそれぞれ示した。図 3-1 B と図 3-2 B は、それぞれ解剖後の頂芽と節（節間伸長後）を示し、花芽または花芽が形成される位置を矢尻で示した。生育期間は、種レンコンが植えつけられて生育が開始してから、休眠期に入るまでの 5 月から 10 月であった。図 3-1 C-D は生育期の頂芽、E-F は休眠期の頂芽をそれぞれ解剖して確認できた花芽を示した。生育期と休眠期の間で、頂芽内に形成された花芽の形態やサイズに違いは認められなかった。また、花芽は休眠期直前でも継続的に頂芽内に形成されていることがわかった。生育期終盤に頂芽の中に形成された花芽は、休眠中に観察した場合にもダメージや腐敗はなく、越冬していた。

表 3-3 に観察した植物体の各節の花芽形成の有無を調べた結果を示した。ここに示した個体（Sample No. 1 から 14）は、採取時に種レンコンが残っており、植え付け後に種レンコンから生育した節数が確認できた個体である。花芽は確認できるが開花にはいたらなかった節を +、開花した節を F で示した。また、頂芽の中に形成された節は y で示した。いくつかのサンプルでは種レンコンに近い節が、観察日までに腐植化が始まり花

芽の有無が判別できなかつた。この場合、表には *i* と表記した。表 3-3 の Node No. は種レンコンから生長して形成された主茎の節の数を表しており、それぞれの個体がサンプリングの時点で何節形成していたかを示している。生育期の終わりまでに、どの個体も 24 節または 25 節形成されており、すべての個体の節形成、地下茎伸長は概ね同調していた。表 3-3 において Sample No. 1 (90DAP) の Node No. 1 から 14 の節は、植え付けが行われた 5 月 10 日からサンプリングを行った 8 月 8 日の 90 日間で節間伸長をとまないうちに、完成した節であることを示している。種レンコンから形成された初めの 2 節から 3 節は、前年の生育期後期に頂芽内に形成され越冬した節である。Sample No. 1 の Node No. 14 の節は、8 月 8 日 (90 DAP) ごろに、Sample No. 2 の Node No. 20 の節は、9 月 4 日 (117 DAP) ごろに節間伸長したことを示している。

観察の結果、生育期間中に形成されたすべての節に花芽が形成されていた。しかし、開花した数は限られていた。観察した 14 個体中、開花数 3 が 3 個体、2 が 3 個体、1 が 1 個体であった。それ以外の個体では開花しなかつた。Node No. 17 の節で開花した個体が 1 つあるが、それ以外のすべての花は Node No. 9 から 14 の節で開花した。節の形成される速度は個体間で概ね同調していた。完成した節において開花しなかつた花芽は発達途中で枯死しており、枯死に至った花芽の発達ステージはそれぞれ異なっていた (図 3-2 C-F)。形成初期の花芽は、形成位置の特異性などから、花芽であると特定できるが、萼片や花弁は確認できない (図 3-2 D)。発達が進んだステージの花芽や、器官形成が完成に近い花芽もあり、紅色がかつた花弁が形成された後に枯死したサンプルもあった (図 3-2 F)。

以上の結果から、種レンコンから栽培した場合、生育期に形成されたすべての節に花芽が形成されていた。しかし、その多くの花芽は開花に至らず枯死した (表 3-3)。

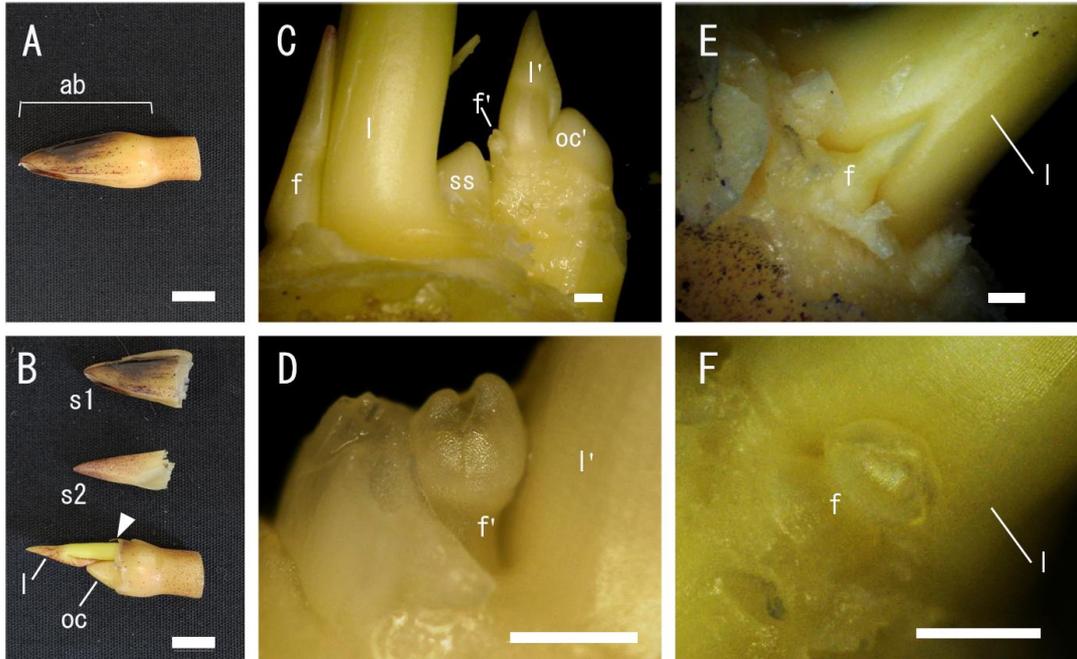


図 3-1. 頂芽中の節で観察された花芽の状態

A. 生育期の頂芽（解剖前）。B. パネル A の頂芽を解剖し、花芽が形成される位置を露出させた。矢尻は花芽が形成される位置を示している。C. D.頂芽から鱗片葉 (s1、s2)、普通葉 (l)の托葉鞘 (oc)を取り除いた。生育期の頂芽の中に形成された花芽 (C, 表 3-3 Sample No. 2 の 21 節; D, 3-3 Sample No. 2 の 22 節、C, D 共に 117 DAP)。E. F. 頂芽から鱗片葉 (s1、s2) を取り除き普通葉背軸側基部を露出させた。休眠中の頂芽の中で観察された花芽 (E, 表 3-3 Sample No. 9 の 22 節; F, 表 3-3 Sample No. 9 の 23 節、E, F 共に 199 DAP)。

ab, 頂芽; f, f', 花芽; l, l', 普通葉; oc, oc', 托葉鞘; s1, s2, 鱗片葉; ss, 側枝。スケールバー A-B: 1cm, C-F: 500 μ m。

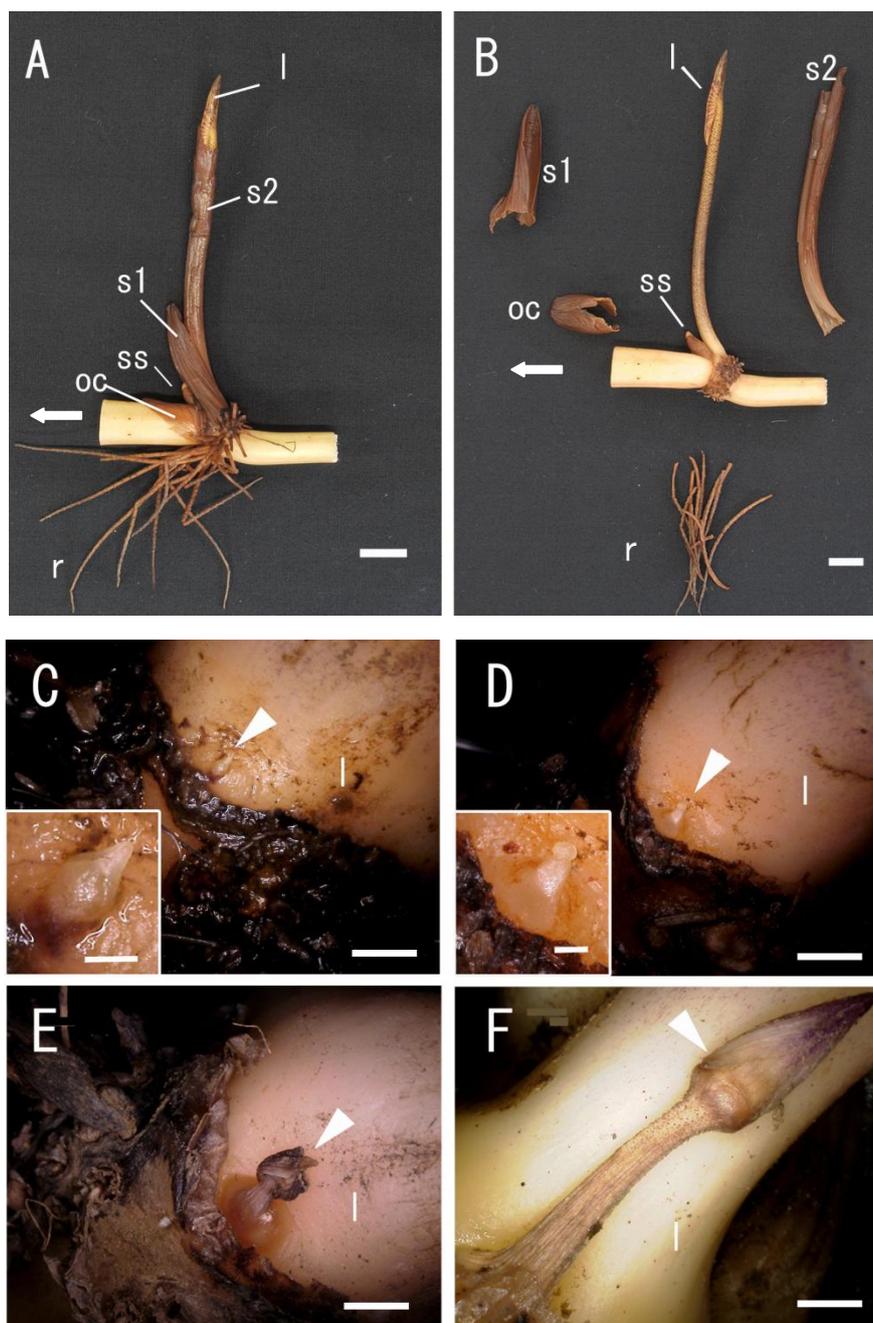


図 3-2. 節間伸長後の節で観察された花芽の状態

A. 節間伸長が完了した節（解剖前）。B. パネル A の節を解剖し、花芽が形成される位置を露出させた。C-F. 4つの異なる節で確認された花芽。C, 表 3-3 Sample No. 6 の 15 節; D, 表 3-3 Sample No. 6 の 14 節; E, 表 3-3 Sample No. 6 の 18 節; F, 表 3-3 Sample No. 2 の 18 節。C と D の図中左下は花芽の拡大像。

l, 普通葉; oc, 托葉鞘; s1, s2, 鱗片葉; ss, 側枝。矢尻, 花芽が形成される位置または花芽; 矢印, 頂芽の方向。スケールバーA-B: 1cm, C-F と C-D 左下拡大像: 500 μ m。

表 3-3 ハスの各節の花芽形成と開花

Sample No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Sampling date	8Aug	4Sep	24Sep	24Sep	9Oct	9Oct	31Oct	31Oct	25Nov	25Nov	7Jan	21Feb	18Apr	18Apr
DAP	90	117	137	137	150	150	172	172	199	199	242	287	343	343
Node No.														
1	+	+	<i>i</i>	+	+	<i>i</i>	<i>i</i>							
2	+	+	<i>i</i>											
3	+	+	+	<i>i</i>	+	<i>i</i>	+	+						
4	+	+	+	<i>i</i>	<i>i</i>	<i>i</i>	<i>i</i>	+	<i>i</i>	+	+	<i>i</i>	+	+
5	+	+	+	<i>i</i>	+	<i>i</i>	<i>i</i>	+	+	+	+	<i>i</i>	+	+
6	+	+	+	+	+	+	<i>i</i>	+	<i>i</i>	+	<i>i</i>	+	+	+
7	+	+	+	+	+	<i>i</i>	+	<i>i</i>	<i>i</i>	<i>i</i>	+	+	+	+
8	+	+	+	<i>i</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	F	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	+	F	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11	F	+	F	+	+	+	+	+	+	+	+	F	+	+
12	F	+	F	+	+	+	+	+	+	+	+	F	+	+
13	+	F	+	+	F	+	+	+	F	+	+	F	+	+
14	+	F	+	+	F	+	+	+	F	+	+	+	+	+
15	+ ^y	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
16	+ ^y	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
17		+	+	+	+	+	F	+	+	+	+	+	+	+
18		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
19		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
21		+ ^y	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
22		+ ^y	+ ^y	+ ^y	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
23			+ ^y											
24					+ ^y									
25								+ ^y	+ ^y					

観察日にサンプルを栽培容器から掘り出し、各節の花芽形成を観察した。観察後すべてのサンプルを廃棄した。

+, 花芽形成が確認（発達過程で枯死、開花せず）; F, 花芽形成され開花した; ^y, 頂芽または頂芽内; *i*, 不明; Node No., 種レンコンから数えた節数; DAP, 植え付け後の日数。

種子から栽培した場合

種子から栽培した場合、花芽形成がどの段階で開始するか確認するため以下の観察を行った。種子をプラスチック容器に植え付け、屋外で慣行栽培した。観察時に植物体全体を掘り出し、土と不定根を取り除き、種レンコンから観察時まで新たに形成された節数を数え番号をつけた。節間伸長と器官の発達が完了した各節と、頂芽内の形成過程の節のそれぞれに、花芽が形成されているか否かを実体顕微鏡下で確認した。第2章で述べたとおり、ハスは発芽後、種子中に形成されていた第4節までの普通葉を順に展開し、その後、新たな節が形成されると同時に節間伸長する(図 2-2 A、H、I)。その後は種レンコンから栽培した場合と同様の葉序で生育し、秋には地下茎が肥大した(図 3-3、2011年9月28日、125 DAP)。観察したすべての個体(n=12)で、第11節以降の節に花芽が、花芽形成が予定される普通葉背軸側基部に確認された。

光学顕微鏡およびSEMを用い、種子形成の過程で形成されていた第1節から第4節と、発芽後形成された第5節から第10節の普通葉背軸側基部を観察した結果、いずれも花芽の形成は確認されなかった(第1節から第5節, 図 2-2 C、J; 第6節以降の結果は示していない)。また、代表的なサンプルの頂芽内に形成されていた節のSEM観察像を図 3-3 B-Eに示した。図 3-3 Bは、十分に生長した植物体で花芽形成が予定される位置の第5節の普通葉背軸側基部を示しており、図 3-3 Cはその部位の拡大像である。花芽原基は確認できない。これに対して頂芽内で形成途中の第13節普通葉背軸側基部には、花芽原基が確認できた(図 3-3 D-E)。以上の結果から、ハスの花芽形成が形態観察で確認できるようになるのは、第11節以降であることが示された。

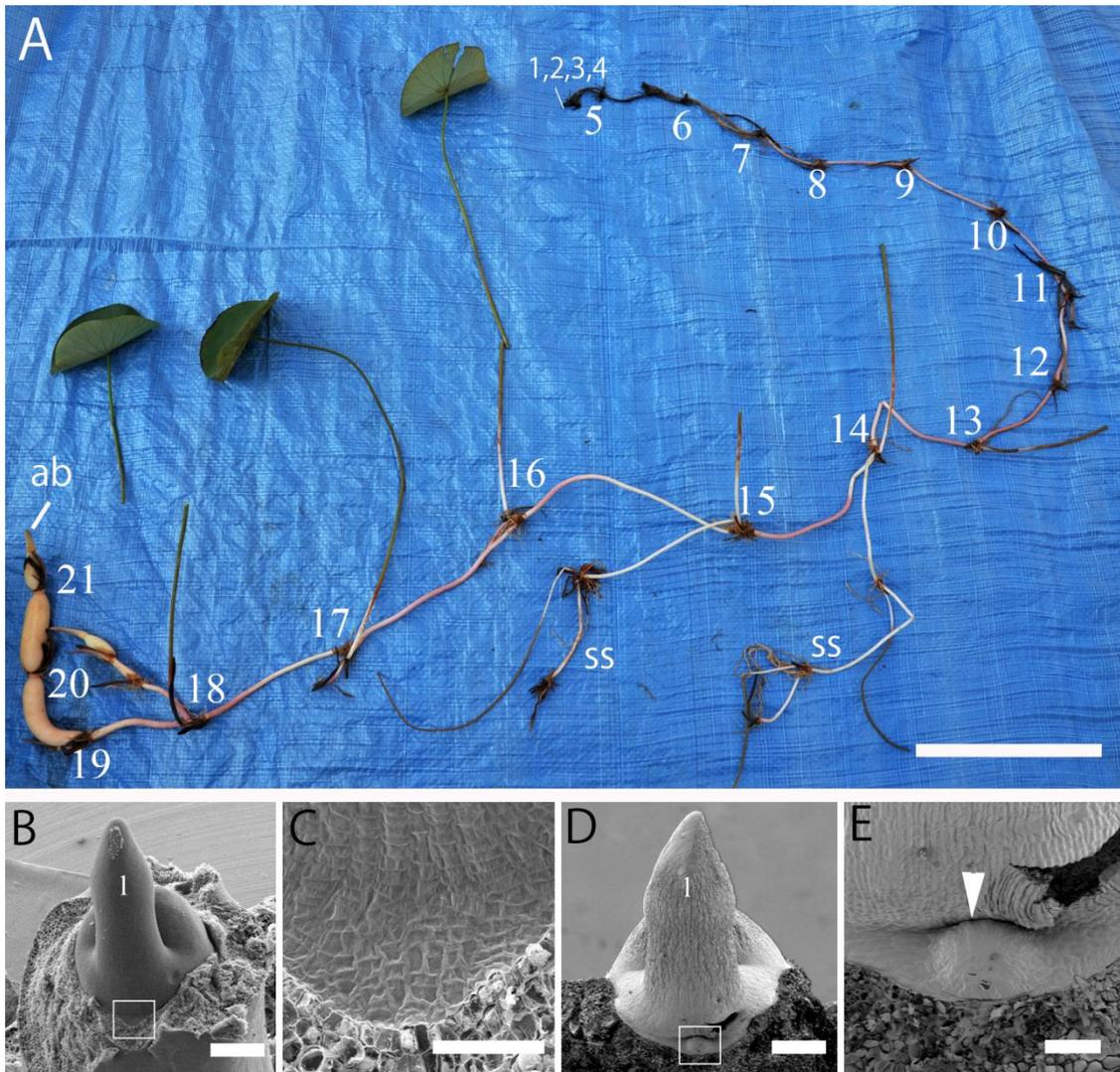


図 3-3. 種子から栽培した植物体の全体像と頂芽中に形成された花芽

A. 種子から栽培した個体を生育期の終盤に掘り出した代表的な植物体 (2011 年 9 月 28 日、125 DAP)。B. 頂芽の中で第 5 節から第 7 節が形成されている過程の頂芽から普通葉や鱗片葉を取り除き、十分に生長した植物体で花芽形成が予定される位置の第 5 節の普通葉基部背軸側を露出させた (A. とは異なるサンプル)。C. パネル B の普通葉基部の拡大像。花芽原基は確認できなかった。D. 頂芽の中で第 13 節から第 15 節が形成されている過程の頂芽から普通葉や鱗片葉を取り除き、発達途中の第 13 節普通葉基部背軸側を露出させた (A. とは異なるサンプル)。E. パネル D の普通葉基部の拡大像。花芽原基 (矢尻) が確認できた。

ab, 頂芽; l, 普通葉; ss, 側枝; 番号, 種子から数えた節数。スケールバー A: 10cm; B: 200 μ m; C, E: 50 μ m; D: 100 μ m。

3.3.2 APETALA1 (NnAPI) 遺伝子の発現解析

前述のとおりハスを種子から栽培した場合、形態観察で花芽が確認できたのは、第 11 節以降であった。ハスの発芽後、生育過程のどの時点から花芽形成が開始するかを調べるため、APETALA1 (API) 遺伝子を花芽形成の指標の一つとし、発現解析を行った。API は花メリステムアイデンティティ遺伝子の一つで、MADS-box 転写因子をコードしており、ABC モデルではクラス A に分類されている (Coen and Meyerowitz 1991)。シロイヌナズナの API ホモログとして公開されているハスの NnAp1 の cDNA 配列 (GU048643.1) とハスゲノム配列 (NW 010729269.1) を比較した。その結果 NnAp1 は、8 つのエクソンと 7 つのイントロンで構成されていた (図 3-4)。NnAPI の頂芽の縦断切片における発現パターンの解析を以下のとおり行った。3.2 材料と方法に従い、まず NnAp1 遺伝子のアンチセンス RNA プローブを作製し、種レンコンから栽培した植物体の頂芽の切片を用い *in situ* ハイブリダイゼーションを行った結果、NnAPI のシグナルは、花芽で確認された (図 3-5)。

次に、生育過程のどの時点で栄養生長相から生殖生長相へ転換するか検討するため、定量 RT-PCR を行い、NnAPI の頂芽における発現量を NnActin の発現量をコントロールとして調べた。播種は時期をずらして 3 回 (① 2013 年 4 月 29 日、② 5 月 13 日、③ 6 月 10 日) 行い、それぞれのサンプリング日の個体を写真に示した (図 3-6)。播種の時期に関わらず、播種後 7 日から 14 日のサンプルでは既に NnAPI の発現が始まり、その後値は上昇していた (図 3-7)。また、いずれのサンプルでも吸水処理後の播種の時点では NnAPI は発現していなかった。以上の結果、種子から第 1 節と第 2 節の普通葉の伸長展開が開始するのと同時期に NnAPI の発現も上昇を開始していたことがわかった (図 3-6、図 3-7)。

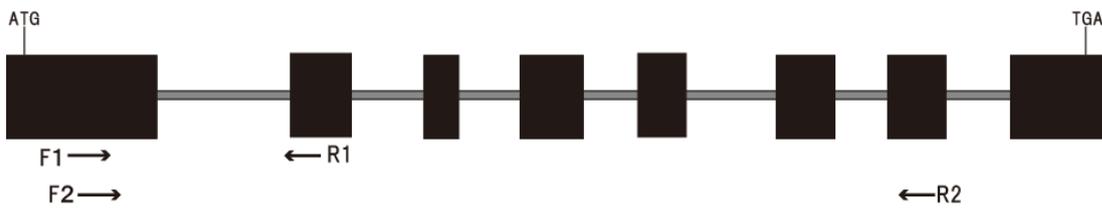


図 3-4. *NnAp1* の構造と *in situ* ハイブリダイゼーション用プライマーセットの位置
 8つのエクソン(■)と7つのイントロン(—)。矢印 F1-R1 は定量 RT-PCR のプライマーセット。矢印 F2-R2 は、*NnAPI* を標的とした *in situ* ハイブリダイゼーションの RNA プロブ作製のためのテンプレート cDNA 増殖用プライマーセットの位置。

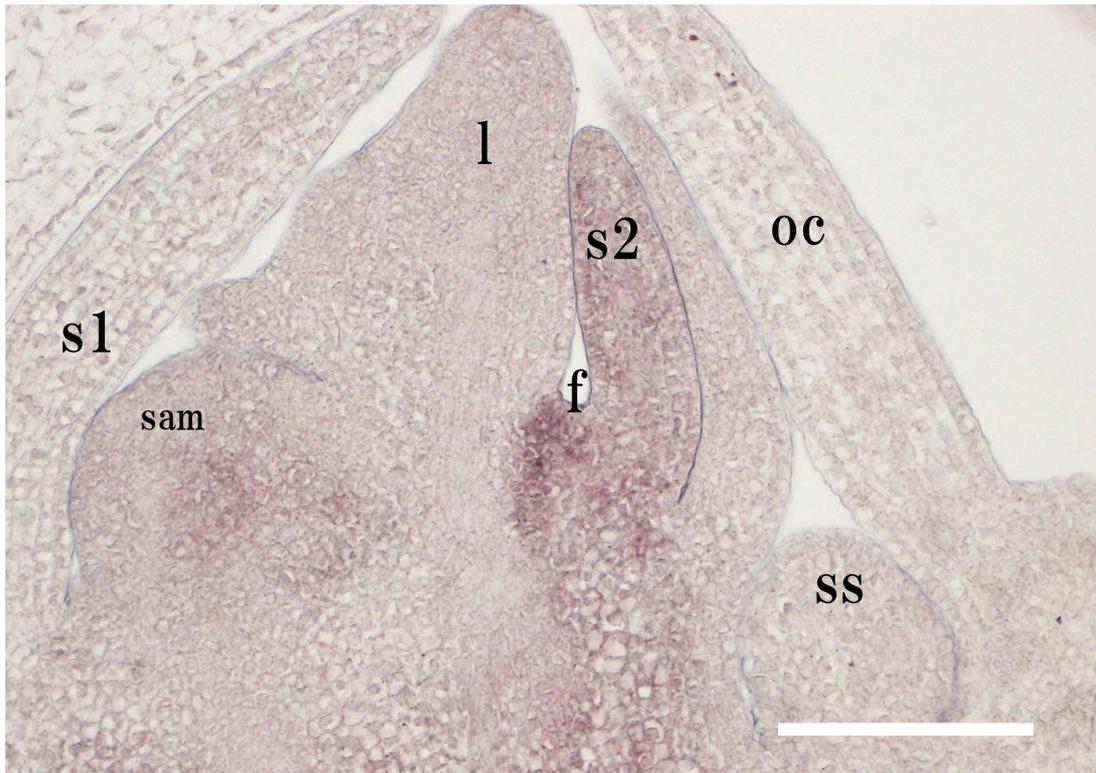


図 3-5. *APETALA1* (*NnAPI*) 遺伝子の頂芽での発現パターン

種レンコンから栽培した植物体の頂芽縦断切片に対して、*API* のアンチセンス RNA をプローブとして *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。*NnAPI* の発現部位がシグナルで示されている。

f, 花芽; l, 普通葉; oc, 托葉鞘; s1, s2, 鱗片葉; sam, 頂芽分裂組織; ss, 側枝。スケールバー 200 μ m。



図 3-6. 定量 RT-PCR 解析に用いた植物体

時期をずらして 3 回 (① 2013 年 4 月 29 日、② 5 月 13 日、③ 6 月 10 日) 播種した。プラスチック容器で慣行法、自然光の下で栽培し、それぞれの写真下中央に示された日にサンプリングを行った。サンプリングした個体のうち、代表的な個体の全体像を示した。DAP, 播種後の日数。スケールバー 5 cm。

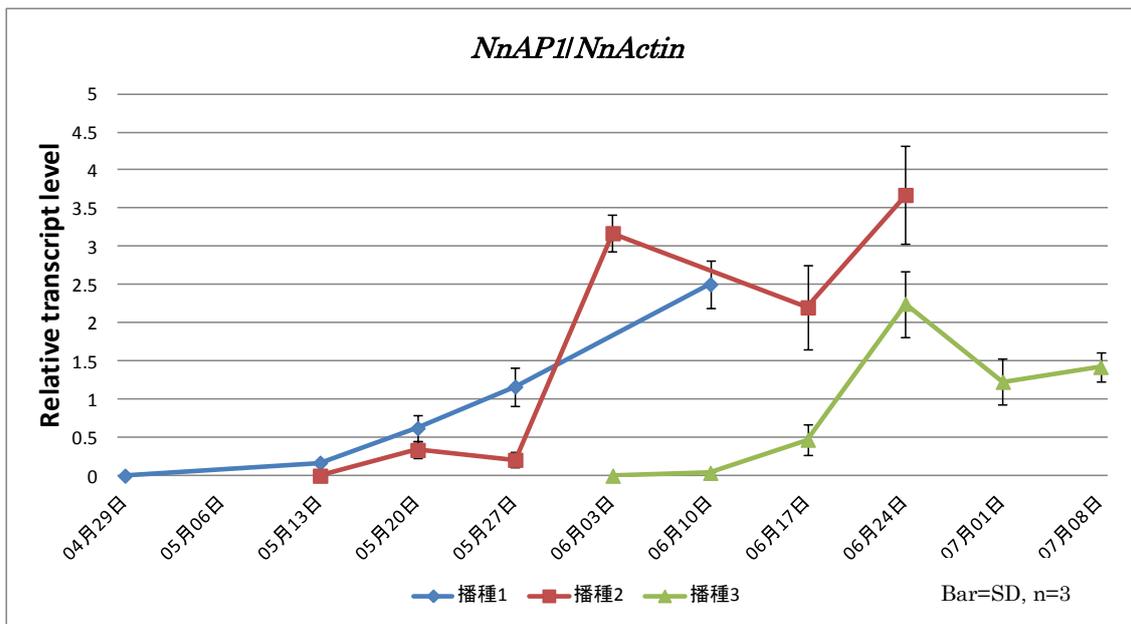


図 3-7. 播種後の *NnAPI* 遺伝子の発現量の経時的変化

頂芽内での *NnAPI* の発現を定量 RT-PCR により経時的に調べた結果を示した。播種の時期をずらして3回 (① 2013年4月29日、② 5月13日、③ 6月10日) 行い、図 3-6 で示したサンプリング日に、ハスの頂芽から全 RNA を抽出・精製 (RNeasy Mini Kit、Qiagen) した。コントロールとしてハウスキーピング遺伝子である *NnActin* を使用して標準化し、*NnAPI* の相対的な発現解析を行った。その結果、①、②、③のいずれの播種期でも播種後7日から14日にかけて、種子から第1節と第2節の普通葉の伸長展開が開始するのと同時期に *NnAPI* の発現も上昇が開始していた。

3.4 考察

ハスを種レンコンから栽培した場合、生育期に形成されるすべての節に花芽が形成されていることを確認した（表 3-3）。この結果は、種レンコンから栽培した場合の花芽形成は日長の影響を受けていないことを示唆している。

生育期に形成されたすべての節に花芽形成が認められたが、多くの花芽が開花に至らず枯死した。頂芽内に形成されていた花芽を除き、節間伸長の完了した節で花芽形成が認められた 296 個の花芽中 16 個の花芽のみが開花したが、それ以外はすべて枯死した。枯死した 280 個の花芽の発達ステージや大きさはさまざまだった。ハスが生育期間を通じ、生育不能な花芽を形成し続けることは不可解である。また、開花のみられた節が、第 11 節から第 15 節に集中していた。この原因は、形成された花芽が開花に至る条件が温度など環境の影響を受けていることが考えられる。先行研究では、ハスの地下茎の肥大にはフィトクロムが関与し、短日条件で促進されることが示されている (Masuda et al. 2006, 2007)。本研究結果より、花芽形成は日長の影響を受けていないことが示唆された。ハスの花の開花時には花托のデンプン量が上昇することが示されている (Grant et al. 2008)。地下茎の肥大が短日条件下で開始することにより、光合成産物の転流先が花から地下茎へとバランスが変わったことが、短日条件下で形成された花芽が開花に至らないことの一因である可能性もある。

次に種子から栽培した場合の植物を材料として光学顕微鏡および SEM を用いて節の形態観察を行った。胚発生の過程で形成された第 1 節から第 4 節に、花芽形成は確認できなかった。播種後形成された第 5 節から第 10 節にも、花芽は特定されなかった。観察したすべてのサンプルで、第 11 節以降に花芽が確認された。

さらに、生育過程のどの時点で栄養生長から生殖生長へ相転換するかを検討するため、頂芽内での *NnAPI* の発現量を定量 RT-PCR により経時的に調べた。その結果、播種後 7

日から 14 日にかけて、種子から第 1 節と第 2 節の普通葉の伸長展開が開始するのと同時期に *NnAPI* の発現も上昇していた。形態観察の結果から、この時期は頂芽内で第 6 節から第 10 節が形成されている時期に相当すると考えられた。さらに、播種の時期を変えて同様の実験を行ったが、同じ結果が得られた。このことから、*NnAPI* の発現の変化は日長に依存していないことが示された。以上の結果から、発芽後、第 5 節から第 10 節が形成される過程のどこかで、生殖生長へ転換し、それ以降、常に各節に 1 つの花芽が形成されることがわかった。*NnAPI* の発現の上昇と形態観察で花芽形成が確認できるまでに時差が生じることは、*NnAPI* の発現が開始後もその後の花芽形成のプロセスが進み、形態として確認できるまでに時間を要しているためと考えている。

第4章. 総合考察

器官形成と分枝

ハスの完成した種子の内部には、子葉、第 1 節の普通葉、第 2 節、第 3 節、第 4 節の普通葉と托葉鞘、SAM が形成されていた。この 4 枚の普通葉は互生で、向かい合って形成されていた。休眠中の種子では第 4 節の普通葉基部に未分化の SAM が観察され、第 5 節の器官形成は確認できなかった (図 2-2)。発芽後、第 4 節までの普通葉は主軸の両側に交互に順に伸長、展開した。また、第 4 節までは節間伸長はほとんど認められなかった。ここまでは典型的な単軸生長だった。第 4 節までの普通葉を展開すると同時に、第 4 節普通葉基部の SAM が分化を始め、第 4 節の側枝と第 5 節以降の主軸の器官が形成された。第 5 節以降の節間は第 4 節までと比較すると大きく伸長していた (図 2-2. I)。主軸上には片側に 1 枚の鱗片葉 (s1)、その反対側にもう 1 枚の鱗片葉 (s2) と 1 枚の普通葉 (l) を順に形成した。第 5 節以降の器官構成と、種レンコンから栽培したシュートに形成された節の器官構成は、花芽形成の有無以外は一致した。種子から栽培した場合、形態観察で花芽が確認できるのは第 11 節以降であった。

先行研究 (Eichler 1878; Wigand and Dennert 1888; Miki 1927; 南川 1974) でハスの器官形成や分枝についていくつかの相異なる解釈が述べられており、統一した理解が得られていなかった点について以下のように結論を示した。先行研究間の第 1 の相違点は、ハスの分枝様式が仮軸か単軸かである。先行研究の解釈では、仮軸説では、1 枚の普通葉 (l) と 2 枚の鱗片葉 (s1, s2) は l, s1, s2 の順で交互に主軸の両側に形成され、主軸は花芽で終わり、鱗片葉 (s1) の腋芽として発生した側枝が次の節の主軸となるという解釈である。一方、単軸説は、主軸の片側に 1 枚の鱗片葉 (s1)、その反対側にもう 1 枚の鱗片葉 (s2) と 1 枚の普通葉 (l) が軸の同一側に形成される、特異的な 3 葉構造であるとした。本研究の結果、ハスは単軸生長と解釈した。主な理由は次の 4 点である。

① 種子中に形成されていた第 4 節までは、典型的な単軸生長である。②第 5 節以後、最初に花芽が形成されるまでの間は、花芽すなわち花茎とは無関係な生長であり、ss

を側枝とする単軸生長が続いていると考えられる。このことは従来の解釈と一致しており、ss の基部のみに前出葉と見られる 2 枚の葉を生じることは ss が側枝であることを支持している。従って、s2 と普通葉が主軸の同じ側に形成されることは単軸生長におけるハス固有の葉序と考えられる。③ 花芽が形成されるようになってからの生長においても、このハス固有の葉序が継続されることから、単軸生長も継続していると考えられる。従って花芽は側生であり、その発生位置から s2 の側芽とみなされる。④ 図 2-10 の結果では、普通葉 (l, l') では *NnSTM* がすでに発現していないが、花芽原基 (f, f') では発現していた。このことは、普通葉が花芽より先に分化し発達していること、すなわち本論文で側芽であると解釈する花芽が主軸上の器官よりも遅れて発達することを示しており、単軸説と矛盾しない。

第 2 の相違点は、前出葉が 1 枚かあるいは 2 枚であるかと側枝の葉序である。これまでに 4 つの異なるパターンが示されていた。本研究では、観察したすべてのサンプルで側枝は 2 枚の前出葉 (a1, a2) が向軸側に形成され、側枝 (s1', s2', l', f') の鱗片葉 (s1') は背軸側に生じ、側枝の普通葉 (l') は向軸側に形成されていた。この性質については、変異がないことが明らかとなった。本研究の形態観察の結果をまとめハスの葉序と分枝の模式図を図 2-11 A, B に示した。2 枚の前出葉 (a1, a2) が軸の片側に連続して形成されることは、鱗片葉 (s2) と普通葉 (l) の配列と相同と考えることもできる。また、前出葉が向軸側に形成される性質は単子葉植物で一般的であり (Arber 1925)、この点においては、ハスは水生の単子葉植物と類似していると考えられる。

上述のようにハスの播種後に形成されるシュートでは、主軸の片側に 1 枚の鱗片葉 (s1)、その反対側にもう 1 枚の鱗片葉 (s2) と 1 枚の普通葉 (l) が形成される。鱗片葉 (s2) と 1 枚の普通葉 (l) が軸の片側に形成される葉序は極めてまれである (熊沢 1979)。このため、先行研究では、分枝と葉序の解釈に相違が生じた。以前はハスがスイレン科に分類されていたために、一部の先行研究ではスイレンとの形態比較をしていた。また、

少数の個体を観察した例やサンプルを解剖することなく観察し、観察後また土に戻して栽培し何度も掘り出して観察していた例もあった。これらのことが先行研究間の見解の相違の一因となったと考えている。本研究では、多くの試料を利用することで、観察後の植物体を土に戻して再度観察に供することを避けた。また、先行研究では利用されなかった手法を用いて、微細な SAM や器官の形態やシュート中の遺伝子発現を示した。このことにより、先行研究の見解の相違点に結論を示すことができた。

栄養生長相から生殖生長相への相転換

種子から栽培した植物体の形態観察を行った結果、花芽が確認できるのは、第 11 節以降であった。種レンコンから栽培した場合の節には常に花芽形成が確認されたことから、その頂芽は相転換が完了し生殖生長相であることが示された。この種レンコンから栽培した場合の頂芽を用い、*in situ* ハイブリダイゼーションによる花器官形成の遺伝子発現解析を行った。その結果、種レンコンから栽培した頂芽内の花芽で *NnAp1* 発現が確認された。そこで、種子から栽培したハスの *NnAp1* の発現量を定量 RT-PCR により経時的に調べた。その結果、種子の吸水処理直後には *NnAp1* は発現していないが、播種後 7 日から 14 日には *NnAp1* の発現が開始した。これらの結果は、ハスは播種後まもなく種子形成の過程で形成されていた第 1 節から第 4 節の普通葉を伸長展開するのと同時に、SAM では第 5 節以降の器官形成が開始される。この過程で栄養生長から生殖生長への相転換が起こっていることを示唆している。

栄養生長から生殖生長への相転換は、植物の生活環の中で戦略的に次世代を残すための重要なイベントである。近年、相転換や花成についてシロイヌナズナなどのモデル植物で分子遺伝学的解析が進められてきた (Araki 2001; Wiggle *et al.* 2005)。花成には、*FLOWERING LOCUS T (FT)*、*CONSTANS (CO)*、*SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO1 (SOC1)*、*LEAFY (LFY)* などを筆頭に多くの遺伝子によって複雑に作用、制御さ

れている (reviewd in Srikanth and Schmid 2011; Huijser and Schmid 2011; Pose *et al* 2012)。*APETALA1 (API)* は、これらの花成遺伝子の下流で機能する花メリステムアイデンティティ遺伝子の一つで、MADS-box 転写因子をコードし (Gustafson-Brown *et al.* 1994)、ABC モデルではクラス A の遺伝子としてに分類されている (Coen and Meyerowitz 1991)。シロイヌナズナでは、*API* は花芽の原基で発現することが報告され、相転換の指標として用いられることが多い (Araki 2001; Wigge *et al.* 2005)。イネの *API* オルソログである *OSMADS14*、*OSMADS15*、コムギの *WAPI* も相転換の指標として用いられている (Murai *et al.* 2003; Kobayashi *et al.* 2012)。ハスについては、Yoo ら (2010) により *API* オルソログの *NnAp1* の cDNA 配列 (GU048643.1) が公開され、萼片、花弁、雄蕊、葉などで発現していることが示されている。

本研究の結果、ハスは播種後 7 日から 14 日後に *NnAp1* の発現を開始した。その結果は、時期をずらして 3 回行った播種のいずれのサンプルも同様だったため、*NnAp1* の発現は日長には依存していないことを示していると考えられる。また、種レンコンから栽培した場合は、生育期間中に形成されるすべての節に花芽が形成されていたことから、生殖生長に相転換後の花芽形成も日長には依存的ではないことが示された。

本研究の結果を図 4-1 の模式図に示した。種子中に形成されていた第 1 節から第 4 節は栄養生長相であるとした。形態観察で花芽が確認できたのは第 11 節以降であることから、第 11 節以降をハスの生殖生長相とした。栄養生長相と生殖生長相の間にあたる第 5 節から第 10 節はでは、花芽形成関連遺伝子の *NnAp1* の発現が確認されたことから、これらの節を形成している時期に生殖生長への転換は開始していると示唆された。そこで、第 5 節から第 10 節を相転換相とした。

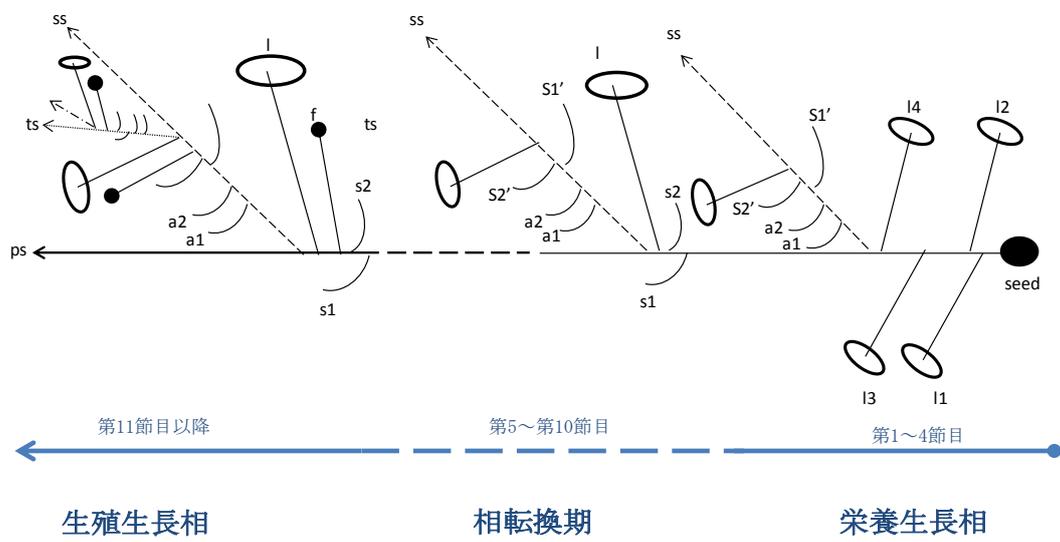


図 4-1. ハスの分枝と相轉換の模式図

a1, a2, 前出葉; f, 花芽; l, 普通葉; oc, 托葉鞘; ps, 主軸; s1, s2, 鱗片葉; ss, 側枝; ts, 3次分枝。

花芽の発達と開花

本研究の形態観察では、胚発生の過程で形成されていた第4節までと播種後形成された第5節から第10節に花芽は特定されなかった。観察したすべてのサンプルで第11節以降に花芽が普通葉背軸側基部に確認された。また、種レンコンから栽培した場合は形成されたすべての節に花芽が確認された。以上の事から、種子から数えて第11節以降の節では常に花芽形成されていることが示された。

また、第11節以降に形成されるすべての節の普通葉の基部に花芽が形成されているにも関わらず、実際に開花に至る数は形成された花芽のごく一部であった。多くの花芽がさまざまなステージで枯死していることが確認された。なぜ、多くの花芽が形成されながら、その大部分が枯死するのか不明である。

花芽が発達し開花に至るための必要条件は不明であるが、仮に形成されたすべての花芽が開花すれば、ハスの園芸的価値は特段に上がる。観賞用園芸品種のハス栽培方法については、過去にさまざまな検討が行われ(長島 1977; 山本・松本 1988; 香取 2000; Tian *et al.* 2009)、慣行の栽培法が確立している。しかし、花芽の発達と開花の条件はわかっていない。人工気象器などの日長や温度がコントロールできる環境条件下で実験ができれば、花芽が開花に至るまでに必要な条件についての検討ができると考えられる。しかし、ハス栽培には大きなスペースと手間を必要とするため、この方法は現実的ではない。露地栽培で栽培条件をコントロールすることは難しく、花芽発達と開花に関する学術論文が少ないのは、これらのことが一因と考えられる。

第 5 章. 摘要

ハスは主にアジアで有用植物として栽培され、地下茎（レンコン）、葉、種子、花の各部位は、食用、薬用、観賞用と幅広く利用されてきた。日本におけるハスの園芸的価値は高く現在も利用されてはいるが、必ずしも盛んではない。その理由の一つに、利用者が望む時期に開花を誘導する技術が確立されていないことが挙げられる。ハスの栽培方法は、これまでに概ね確立されている。しかし、花芽分化や花芽形成に関する研究は限られており、不明な点が多い。本研究では、まずハスの頂芽中に形成された各器官の形態と形成順序の観察を行い、器官形成と分枝について明らかにした。次にハスの花芽分化が生長過程のどの段階で起こるかを明らかにした。

ハスの器官形成と分枝

ハスの器官形成と分枝についての先行研究では、いくつかの相異なる解釈が述べられており、統一した理解が得られていなかった。先行研究間の第1の相違点は、ハスの分枝様式が仮軸か単軸かである。仮軸説では、1枚の普通葉 (l) と2枚の鱗片葉 (s1, s2) は l、s1、s2 の順で交互に主軸の両側に形成され、主軸 (ps) は花芽 (f) で終わり、鱗片葉 (s1)の腋芽として発生した側枝 (ss) が次の節の主軸となるという解釈である。一方、単軸説は、主軸 (ps) の片側に1枚の鱗片葉 (s1)、その反対側にもう1枚の鱗片葉 (s2) と1枚の普通葉 (l) が形成される、3葉構造であるとした。

第2の相違点は、前出葉 (a) の数が1枚かあるいは2枚であるか、また側枝 (s1', s2', l', f) の葉序で、これまでに4つの異なるパターンが示されていた。本研究では、走査型電子顕微鏡と光学顕微鏡を用い、頂芽と各器官の形態観察を行い、器官の形成順序や頂芽中の形成過程の器官の形態、茎頂分裂組織 (SAM) の位置について明らかにした。また、SAM の位置と器官形成の順序をより確実にするために *SHOOT MERISTEMLESS* (*NnSTM*) 遺伝子発現を指標とした *in situ* ハイブリダイゼーション解析を行った。*STM* は、シロイヌナズナやイネのSAMで発現していることが知られている。

栄養繁殖により得た植物体のシュートを観察した結果、休眠していた頂芽が生育を開始し、主軸 (ps) の片側に 1 枚の鱗片葉 (s1)、反対側にもう 1 枚の鱗片葉 (s2) と 1 枚の普通葉 (l) が軸の同一側に形成され、特異的な 3 葉構造が形成されていた。普通葉背軸側基部に花芽形成が確認されていた。また、頂芽内には、器官分化が完了した 2 節と器官分化過程にある上位の 1 節の合計 3 節が形成された。

完熟種子を観察した結果、種子の中には第 1 節から第 4 節までの普通葉 (l) と 1 つの SAM が第 4 節の普通葉基部に形成されていることが確認された。また、種子の中に形成されていた第 4 節までには鱗片葉 (s1、s2) は形成されず、普通葉 (l) のみが形成されていた。発芽初期の植物体を観察した結果、種子中に形成されていた第 1 節から第 4 節までの普通葉 (l) は、連続して主軸 (ps) の両側に交互に展開し、不定根がそれぞれの節に形成された。発芽後、第 1 節から第 4 節の普通葉を展開させるのと同時に第 4 節普通葉基部にあった SAM から、第 4 節の側枝の SAM と第 5 節以降の主軸の器官が形成された。主軸の第 1 節から第 5 節までには花芽形成は確認できなかった。第 5 節以降に形成された主軸の葉序は、花芽の有無に関係なく、栄養繁殖して得た植物体の主軸の葉序と同じ順序で、同じ器官が形成された。

本研究の結果、ハスは単軸生長と解釈した。主な理由は次の 4 点である。① 種子中に形成されていた第 4 節までは、典型的な単軸生長である。② 第 5 節以後、最初に花芽が形成されるまでの間は、花芽すなわち花茎とは無関係な生長であり、ss を側枝とする単軸生長が続いていると考えられる。このことは従来の解釈と一致しており、ss の基部のみに前出葉と見られる 2 枚の葉を生じることは ss が側枝であることを支持している。したがって、s2 と普通葉が主軸の同じ側に形成されることは単軸生長におけるハス固有の葉序と考えられる。③ 花芽が形成されるようになってからの生長においても、このハス固有の葉序が継続されることから、単軸生長も継続していると考えられる。従って花芽は側生であり、その発生位置から s2 の側芽とみなされる。④ 普通葉 (l、l) では

NnSTM が発現していないが、花芽原基 (f、f') では発現していた。このことは、普通葉が花芽より先に分化し発達していること、すなわち本論文で側芽であると解釈する花芽が主軸上の器官よりも遅れて発達することを示しており、単軸説と矛盾しない。

次に、前出葉 (a1、a2) の数と側枝 (s1'、s2'、l'、f') の葉序を観察した。観察したサンプルのすべての節の側枝に 2 枚の前出葉 (a1、a2) が確認され、この 2 枚の前出葉は向軸側に着生していた。側枝の構成器官と形態、葉序は主軸と同一であった。以上の結果から第 2 の相違点について、本研究で観察したすべてのサンプルは 2 枚の前出葉 (a1、a2) が向軸側 (ps) に形成され、側枝 (s1'、s2'、l'、f') の 1 枚の鱗片葉 (s1') は、背軸側に生じ、もう 1 枚の鱗片葉 (s2') と側枝の普通葉 (l') は向軸側に形成されていることを確認した。また、この性質についてはすべての側枝で変化がない事を確認した。

花芽形成期の特定

ハスの花芽形成については、これまで、花卉や雄蕊などの花器官の発達を SEM 観察により示した報告があった。また南川 (1974) は、普通葉が形成される主軸のほとんどの節には、花芽 (潜芽) が形成されているとしているが、実験データや観察記録等は示されていない。花芽がすべての節に形成されるか、生育開始から休眠までの間のどの時点で花芽形成が開始するかという点は不明のままであった。本研究では、これらの疑問点を明らかにするために、栄養繁殖した植物体と種子から栽培した植物体を経時的に掘り出し各節における花芽形成の有無と花芽の形態を観察した。また、生長過程のどの時点から花芽形成が開始するかを明らかにするために、種子から栽培した植物体について経時的に形態観察を行った。さらに、花メリステムアイデンティティ遺伝子の一つである *APETALA1* (*NnAPI*) 遺伝子の頂芽における発現も調べた。

まず、栄養繁殖により得た植物体の各節、さらに頂芽とその内部の節に、花芽が形成されているか否かを確認するために、実体顕微鏡下で観察を行った。生育期間は、栄養

繁殖に用いた種レンコンが植えつけられて生育を開始してから、休眠期に入るまでの5月から10月までであった。花芽の有無をすべての節について調べたところ、すべての普通葉 (I) の背軸側基部に、常に花芽の形成が認められた。また、休眠期に入る直前の生育期終盤に形成された頂芽内の節にも花芽が形成されていた。生育期間中に形成されたすべての節で花芽が形成されているにもかかわらず、開花した数は限られていた。開花しなかった花芽は発達途中で枯死しており、枯死に至った花芽の発達ステージはそれぞれ異なっていた。

次に種子から栽培した場合の植物を光学顕微鏡および SEM を用いて形態観察を行った。種子の成熟中に形成されていた第4節までに、花芽は形成されなかった。発芽後形成された第5節から第10節にも、花芽は特定されなかった。観察したすべてのサンプルで、第11節以降に花芽が普通葉背軸側基部に確認された。

また、生育過程のどの時点で栄養生長から生殖生長へ相転換するかを検討するため、頂芽内の *NnAPI* の発現を定量 RT-PCR により経時的に調べた。その結果、播種後7日から14日にかけて、種子から第1節と第2節の普通葉の伸長展開が開始するのと同時期に *NnAPI* の発現も上昇していた。この時期は形態観察の結果から、頂芽内で第6節から第10節が形成されている時期に相当すると考えられた。さらに、播種の時期を変えて同様の実験を行ったが、同じ結果が得られたことから、*NnAPI* の発現の変化は日長に依存していないことが示唆された。以上の結果から、発芽後、第6節から第10節が形成される過程で、生殖生長へ相転換し、それ以降は常に各節に1つの花芽が形成されていくことがわかった。

以上本研究では、ハスは単軸生長と解釈した。ハスは播種後生育が開始するとまもなく日長には関係なく相転換が起こり、花芽形成のプロセスが開始されることが示唆された。花芽は、十分に生長した植物体では形成されるすべての普通葉基部に形成されるが、その多くは発達途中で異なる発達ステージで枯死したことがわかった。

謝辞

本研究は、東京大学大学院農学生命科学研究科生産・環境生物学専攻植物分子遺伝学研究室において遂行したものである。本研究の遂行および執筆にあたり、根気強くご指導、ご鞭撻を賜りました指導教員堤伸浩教授に心から感謝申し上げます。有村慎一准教授からは温かいご指導を賜り深く感謝いたします。基礎的、具体的な実験手法、研究の進め方についてご指導、ご助力をいただきました高梨秀樹助教に御礼申し上げます。また博士課程（後期）進学にあたりご助力いただき、研究のできる環境を与えてくださいました、同研究科元研究科長生源寺真一教授（現名古屋大学）、同附属旧緑地植物実験所元所長杉山信男教授、同嶋田透教授、同附属生体調和農学前機構長小林和彦教授、同附属技術基盤センター長吉村悦郎教授、同電子顕微鏡室室長金子豊二教授に心より感謝申し上げます。形態観察の研究、手法についてご指導をいただきました、同理学系研究科附属植物園邑田仁教授、東京学芸大学教育学部岩元明敏准教授、東京大学附属博物館池田博准教授、清水晶子氏、本研究科作物学研究室根本圭介教授に心より感謝の意を表します。*in situ* ハイブリダイゼーション法などをご指導いただきました、本研究科育種学研究室長戸康郎前教授、伊藤純一准教授、桧原健一郎助教に心より感謝いたします。サンプルの準備、栽培方法等についてご指導、ご助言をいただきました本研究科附属旧緑地植物実験所南定雄氏、榎本百利子氏、石川祐聖氏、山田徳美氏、本田裕紀郎博士をはじめとする教職員の皆様に感謝いたします。また、日々の研究において、相談ご助言をいただきました本研究室藤本優特任准教授、片山健太研究員、林嘉禾博士、松尾優一博士、名古屋大学農学生命科学研究科高橋宏和助教、本研究室の卒業生栗栖里奈氏、住吉光莉氏、本研究科水族生理学研究室井ノ口繭研究員に感謝いたします。励ましとご助力くださった富田憲司博士をはじめとする技術基盤センターのみなさまに感謝申し上げます。最後に本研究室の佐々木三枝子氏をはじめとするスタッフ、諸先輩および学生諸君、素晴らしい雰囲気の中で研究させていただいたことに深く感謝いたします。

本論文第2章の内容は、以下の雑誌論文に掲載されたデータを含み、その部分のインターネット公開について著作権者である American Society for Horticultural Science より許諾をいただいた。

Ishizuna, F., Tsutsumi, N. 2014. Flower bud formation of Sacred Lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.): A case study of ‘Gyozankouren’ grown in a container. 49: 516-518.

引用文献

Angiosperm Phylogeny Group 2009. An update of the Angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society* 161: 105-121.

Araki, T. 2001. Transition from vegetative to reproductive phase. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4: 63-68.

Barton, M. K., Poethig, R.S. 1993. Formation of the shoot apical meristem in *Arabidopsis thaliana*: An analysis of development in the wild type and shoot meristemless mutant. *Development* 119: 823-831.

Borsch, T., Barthlott, W. 1994. Classification and distribution of the genus *Nelumbo* Adans. (*Nelumbonaceae*). *Beiträge zur Biologie der Pflanzen* 68: 421-450.

Chase, M. W., Soltis, D. E., Olmstead, R. G., Morgan, D., Les, D. H., Mishler, B. D., Dunvall, M. R., Price, R. A., Hills, H. G., Qiu Y., Kron, K. A., Rettig, J. H., Conti, E. J., Palmer, D. Manhart, J. R. Sytsma, K. J., Michaels, H. J., Kress, W. J. K., Karol, G., Clark, W. D., Hedren, M., Gaut, B. S., Jansen, R. K., Kim, K., Wimpee, C. F., Smith, J. F., Furnier, G. R., Strauss, S. H., Xiang, Q., Plunkett, G. M., Soltis, P. S., Swensen, S. M., Williams, S. E., Gadek, P. A., Quinn, C. J., Eguiarte, L. E., Golenberg, E., Learn, G. H., Graham, Jr. S. W., Barrett, S. C. H., Dayanandan, S., Albert, V. A. 1993. Phylogenies of seed plants: an analysis of nucleotide sequences from the plastid gene *rbcL*. *Annals of the Missouri Botanical Garden*

80: 528–580.

Chassat, J. F. 1962. Recherches sur la ramification chez les Nymphaeacées. Bulletin. Société botanique de France 109: 72–95.

Clark, S. E. 1997. Organ formation at the vegetative shoot meristem. Plant Cell 9: 1067-1076.

Coen, E. S., Meyerowitz, E. M. 1991. The war of the whorls: genetic interaction controlling flower development. Nature 353: 31-37.

Croquist, A. 1988. The evolution and classification of flowering plants. New York Botanical Garden. New York.

Diao, Y., Chen, L., Yang, G., Zhou, M., Song, Y., Hu, Z., Liu, J. Y. 2006. Nuclear DNA C-values in 12 species in *Nymphaeales*. Caryologia 59: 25-30.

Eichler, A. W. 1878. Blüthendiagramme construiert und erläutert II. Engelmann. Leipzig.

Endrizzi, K., Moussian, B., Haecker, A., Levin J. Z., Laux, T. 1996. The *SHOOT MERISTEMLESS* gene is required for maintenance of undifferentiated cells in *Arabidopsis* shoot and floral meristems and acts at a different regulatory level than the meristem genes *WUSCHEL* and *ZWILLE*. Plant J. 10: 697-979.

Englar, A. 1898. Syllabus der Pflanzenfamilien. Gebrüder Borntraeger. Berlin.

榎本輝彦 2002. 花はす栽培. 蓮蹊香園. 東京.

Esau, K., Kosakai H. 1975. Leaf arrangement *Nelumbo nucifera*. a re-examination of unique phyllotaxy. *Phytomorphology* 25: 100-112.

Grant, M. N., Miller, E. R., Watling, R. J., Robinson, S. A. 2008. Synchronicity of thermogenic activity, alternative pathway respiratory flux, AOX protein content, and carbohydrates in receptacle tissues of sacred lotus during floral development. *Journal of Experimental Botany* 59: 705-714.

Guo, H. B. 2009. Cultivation of lotus (*Nelumbo nucifera*, Gaertn. ssp. *nucifera*) and its utilization in China. *Genet. Resour. Crop Evol.* 56: 323-330.

Gustafson-Brown, C., Savidge, B., Yanofsky, MF. 1994. Regulation of the Arabidopsis floral homeotic gene *APETALA1*. *Cell* 76: 131-143.

Hayes, V., Schneider, E. L., Carlquist, S. 2000. Floral development of *Nelumbo nucifera* (*Nelumbonaceae*). *Intl. J. Plant Sci.* 161: S183-S191.

Heywood, V. H. 1993. Flowering plants of the world. Oxford University Press. New York.

Hoot, S. B., Magló'n, S., Crane, P. R. 1999. Phylogeny of basal eudicots based on three molecular data sets: *atpB*, *rbcL*, and 18S nuclear ribosomal DNA sequences. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 86: 1-32.

黄建成・田辺賢二・板井章浩 2003. ISSR 分析によるハナナス品種識別. 園芸学研究 2: 259-264.

Huang, X., Chen, J., Huang, G. 1992. Preliminary studies on biosystematic relationship between the two *Nelumbo* species. Acta Horticulturae Sinica 2: 19-23.

Huijser, P., Schmid, M. 2011. The control of developmental phase transition in plants. Development 138: 4117-4129.

ImSabai, W., Ketsa, S., Van Doorn, W. G. 2010. Role of ethylene in the lack of floral opening and in petal blackening of cut lotus (*Nelumbo nucifera*) flowers. Postharvest Biol. Technol. 58: 57-64.

Ito, M. 1986. Studies in the floral morphology and anatomy of *Nymphaeales* IV. Floral anatomy of *Nelumbo nucifera*. Acta Phytotax. Geobot. 37: 82-96.

Kanazawa, A., Watanabe, S., Nakamoto T., Tsutsumi N., Hirai, A. 1998. Phylogenetic relationship in the genus *Nelumbo* based on polymorphism and quantitative variations in mitochondrial DNA. Genes Genet. Syst. 73: 39-44.

香取正人 2000. ハス (*Nelumbo* Adans.) の植え込み時期の相違が出蕾および開花時期に及ぼす影響について. 開発学研究 10: 45-51.

香取正人・野村和成・渡辺慶一・米田和夫 2003. RAPD によるハナハス品種の遺伝的関係. 園芸学研究 2: 153-156.

北村文雄・坂本祐二 1972. 花蓮. 講談社. 東京.

北村文雄・藤川覚 1974. 大賀蓮成立に関する研究. 東京大学農学部園芸実験所研究報告 7: 79-98.

Kobayashi, K., Yasuno, N., Sato, Y., Yoda, M., Yamazaki, R., Kimizu, M., Yoshida, H., Nagamura, Y., Kyojuka, J. 2012. Inflorescence Meristem Identity in Rice Is Specified by Overlapping Functions of Three *API/FUL-Like* MADS Box Genes and *PAP2*, a *SEPALLATA* MADS Box Gene. *Plant Cell* 24: 1848-1859.

Kubo, N., Hirai, M., Kaneko, A., Tanaka, D., Kasumi, K. 2009. Classification and diversity of sacred and American *Nelumbo* species: the genetic relationship of flowering lotus cultivars in Japan using SSR markers. *Plant Genet. Resources and Utilization* 7: 260-270.

熊沢正夫 1979. 植物器官学. 裳華房. 東京.

La-ongsri Q., Trisonithi, C., Balslev, H. 2009. Management and use of *Nelumbo nucifera* Gaertn. in Thai wetlands. *Wetlands Ecol. Manage* 17: 297-289.

Long, J. A., Moan, E. I., Medford, J. I., Barton, M. K. 1996. A member of the KNOTTED class of homeodomain proteins encoded by the *STM* gene of *Arabidopsis*. *Nature* 379: 66-69.

Masuda, J., Urakawa, T., Ozaki, Y., Okubo, H. 2006. Short photoperiod induces dormancy in lotus (*Nelumbo nucifera*). *Ann. Bot.* 97: 39-45.

Masuda, J., Ozaki, Y., Okubo, H. 2007. Rhizome transition to storage organ is under phytochrome control in lotus (*Nelumbo nucifera*). *Planta* 226: 909-915.

三木茂. 1927. はすノ地下茎ニ於ケル分枝法及ビ葉ノ配置ニ就テ. *Bot. Mag.* 41: 522-540.

南川勝次, 斉藤久男 1962. 食用蓮に関する研究 九州農業研究. 24: 37-39.

南川勝次 1974. 農業技術大系野菜編. 10. 農文協. 東京.

Ming, R., Vanburen, R., Li, u Y., Yang, M., Han, Y., Li, L. T., Zhang, Q., Kim, M. J., Schatz, M. C., Campbell, M., Li J., Bowers, J. E., Tang, H., Lyons, E., Ferguson, A. A., Narzisi, G., Nelson, D. R., Blaby-Haas, C. E., Gschwend, A. R., Jiao, Y., Der, J. P., Zeng, F., Han, J., Min, X. J., Hudson, K. A., Singh, R., Grennan, A. K., Karpowicz, S. J., Watling, J. R., Ito, K., Robinson, S. A., Hudson, M. E., Yu, Q., Mockler, T. C., Carroll, A. Zheng, Y., Sunkar, R., Jia, R., Chen, N., Arro, J., Wai, C. M., Wafula, E., Spence, A., Han, Y., Xu, L., Zhang, J., Peery, R., Haus, M. J., Xiong, W., Walsh, J. A., Wu, J., Wang, M., Zhu, Y. J., Paul, R. E., Britt, A. B., Du, C., Downie, S. R., Schuler, M. A., Michael, T. P., Long, S. P., Ort, D. R., Schopf, J. W., Gang, D. R., Jiang, N., Yandel, M., dePamphilis, W. C., Merchant, S. S., Paterson, A. H , Buchanan, B. B., Li, S., Shen-Miller, J. 2013. Genome of the long-living sacred lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) *Genome biology* 14: R41.

三浦功大 2004. 蓮への招待. 西田書店. 横浜.

Murai, K., Miyamae, M., Kato, H., Takumi, S., Ogihara, Y. 2003. *WAP1*, a wheat *APETALA1* homolog, plays a central role in the phase transition from vegetative growth. *Plant Cell Physiol.* 44: 1255-1265.

長島時子 1977. れんこんの主茎第 1 節に形成される葉について. 園芸学雑誌 42: 201-210.

長島時子 2001. 800 年前のハス (中尊寺ハス) の開花. 恵泉女子短期大学研究紀要 32: 1-17.

小笠原小枝 2005. 藕絲-ミャンマー・インダ族の藕絲織と当麻曼羅縁起絵巻. 繊維と工業. 61: 298-302.

Ohga, I. 1926. On the structure of some ancient, but still viable fruits of Indian lotus, with special reference to their prolonged dormancy. *Japanese Journal of Botany* 3: 1-20.

Pose, D., Yant, L., Schmid, M. 2012. The end of innocence: flowering networks explode in complexity. *Curr. Opin. Plant Biol.* 15: 45-50.

Shen-Miller, J., Aung, L. H. Turek, J., Schopf, J. W., Thoulandi, M., Yang, M., Czaja, A. 2013. Centuries-Old viable fruit of sacred lotus *Nelumbo nucifera* Gaertn var *China antique*. *Trop. Plant Biol.* 6: 53-68.

Simon, J. P. 1970. Comparative serology of the order *Nymphaeales*. I. Preliminary survey on the relationships of *Nelumbo*. *Aliso* 7: 243–261.

Srikanth, A., Schmid, M. 2011. Regulation of flowering time: all roads lead to Rome. *Cell. Mol. Life Sci.* 68: 2013-2037.

Takhtajan, A. 1969. Flowering plants. Oliver and body. Edinburgh.

勅使河原宏・大場秀章・清水晶子 1999. 現代いけばな花材事典, 草月出版. 東京.

Tian, D., Tilt, K. M., Sibley, J. L., Dane, F., Woods, F. M. 2009. Response of lotus (*Nelumbo sp.*) to container soil volume. *J. Environ Hort.* 27: 70-79.

Trecul, A. 1854. Vegetation du *Nelumbium codophyllum* et disposition anormale de ses feuilles et de ses stipules. *Annales des sciences naturelles Botaniques* 4: 291-298.

Wang, Q., Zhang, Z. 2004. Lotus flower cultivars in China. China forestry publishing house. Beijing.

Watanabe, S. 1990. The fascinating world of lotus. Parks and Open Space Association of Japan. Tokyo.

渡辺達三・鈴木雅和 1992. 蓮の花弁の色彩について. *造園雑誌* 55: 187-192.

Wigand, A., Dennert P. E. 1888. *Nelumbium speciosum*. Eine Monographische Studie
Bibliotheca Botanica 11: 1-68.

Wigge, P. A., Kim, M. C., Jaeger, K. E., Busch, W., Schmid, M., Lohmann, J. U., Weigel., D.
2005. Integration of spatial and temporal information during floral induction in *Arabidopsis*.
309: 1056-1059.

山本雄慈・松本理 1988. ハスの組織培養生長点からの苗条誘導. 山口農試研報 40:
44-48.

Yang, M., Zhu, L., Xu, L., Pan, C., Liu, Y. 2014. Comparative transcriptomic analysis of the
regulation of flowering in temperate and tropical lotus (*Nelumbo nucifera*) by RNA-seq. *Annals
of Applied Biology* 165:73-95.

Ying, P., Han, G., Mao, Z., Zhang, Y., Huang, J., Qu, L. 2011. The anatomy of lotus fivers
found in petioles of *Nelumbo nucifera*. *Aquatic Botany* 95: 167-171.

Yoo, M., Soltis, P. S., Solitis, D. E. 2010. Expression of floral Mads-box genes in two divergent
water lilies: *Nymphaeales* and *Nelumbo*. *Int. J. Plant Sci.* 171: 121-146.

鄭澤宇・岩田洋佳・二宮正士・田村義保 2005a. P 形フーリエ記述子に基づくハナハス
花卉の部分形状特徴の定量的評価. 育種学研究 7: 133-142.

鄭澤宇・田村義保 2005b. P 型フーリエ記述子を用いたハナハス花卉先端部の輪郭線に
よる品種識別. 園芸学研究: 385-390.