

In vitro で培養したキクの植物体切片の形態形成 に及ぼす培地環境の影響

梁川 正・中美 智子

Effects of Medium Conditions on Morphogenesis of Explants Excised from Chrysanthemum Plantlets Cultured in Vitro

Tadashi YANAGAWA and Tomoko NAKAMI

抄 録：夏・夏秋ギクの品種‘そよかぜ’を用い、無菌株から採取された節、節間、葉切片をBAとNAAを種々の濃度で組み合わせて添加した Murashige and Skoog の培地で無菌培養を行って、形態形成の様相と生長量を検討するとともに、得られた植物体からさらに同様の切片を採取してBAとNAAを添加した培地でさらに培養を行い、形態形成の様相を追求した。節切片、節間切片、葉切片を培養した結果、培地に添加した植物ホルモンの種類と濃度に応じて、シュート、不定芽、不定根、カルスの形成が認められ、シュートから同様の切片を採取してさらに培養を行い、クローン増殖を行うための培地、培養条件が示された。得られた結果は、in vitro 培養によってクローン苗を増殖する際の資料になると考えられた。

I. 結 言

キクは通常さし芽で繁殖されるためウイルスの保毒による病害が問題となり、茎頂培養によるウイルスフリー苗の生産を目的とした多くの研究が行われ、既に実用化されている^{1,5,7,8,9,13)}。一方で、プロトプラストからの植物体再生についての研究などの新しい育種の方法を開発する研究も行われている^{10,11)}。しかし、これらの研究では、茎頂からいかにスムーズに幼植物体を導くかに重点がおかれ、茎頂以外の切片の培養研究では深井ら²⁾の葉片培養についての報告があるだけである。本研究では、茎頂以外の種々の部位から切片を採取して in vitro 培養を行い器官形成に及ぼす培養環境の影響を検討するとともに、in vitro 培養を繰り返すことによる優良品種株のクローン増殖の可能性についても検討した。

II. 材料及び方法

夏・夏秋ギクの品種‘そよかぜ’の茎頂培養由来の無菌株から採取した頂芽切片を継代培養して得られた無菌植物体を培養母株とした。母株の茎頂から3～4 cmの部分を取り除いた茎の下部から、節切片、節間切片(約3 mm長)及び葉切片(約3 mm角)を採取して培地に立てるように置床した。

培地として、Murashige & Skoog⁶⁾ 培地(MS培地)を基本培地として用い、これに植物生長調節物質である6-ベンジルアデニン(BA) 0, 1.0, 10.0 mg/ℓ と α -ナフタレン酢酸(NAA) 0, 0.1, 1.0 mg/ℓ をそれぞれ組み合わせて加えて、計9区の試験区を設定した(第1表)。pHは5.8に調整し、30 g/ℓ のショ糖と8 g/ℓ の寒天を加え、18×140 mmの硬質試験管に10 mlずつ分注後、ア

ルミホイルで栓をした。培地はオートクレーブによって、120℃、1.2気圧で15分間滅菌した。各試験区には20切片を置床し、置床後の切片は温度25±℃、湿度60±10%の恒温室内で、3000luxの蛍光灯16時間日長下で培養を行うことを基準とした。

節切片の組織培養で得られた各試験区のシュート由来の植物体（置床後24週目）の生長量を比較するために、各々4～6本の試験管から植物体を取り出して、茎長、葉数、葉長、

葉幅、根数、根長、新鮮重を測定し、60℃乾燥機に入れ、24時間後に乾物重を測定した。

次に、9種類の試験区において形成された再生植物体から、上記の実験と同様に節切片、節間切片及び葉切片を採取して、1.0mg/ℓ BAと1.0mg/ℓ NAAを添加したMS培地に植え付けた。培養容器には80mlの培地を分注した200mlのエrlenマイヤーフラスコを用い、pH調整、ショ糖、寒天添加、培地滅菌法、培養条件は上記の実験と同様に行った。

第1表 BAとNAAを組み合わせて設定した試験区

試験区	BA (mg/ℓ)	NAA (mg/ℓ)
1	0	0
2	0	0.1
3	0	1.0
4	1.0	0
5	1.0	0.1
6	1.0	1.0
7	10.0	0
8	10.0	0.1
9	10.0	1.0

Ⅲ. 実験結果及び考察

節切片では、すべての試験区で枯死した切片はみられずに植物ホルモ濃度にかかわらず高い確率でシュートが出現した（第2表）。シュート出現の経時比較を行った結果、試験区1及び5では置床後2週間目に早くもシュート出現が100%に達したが、試験区3ではシュート出現が遅れた（第1図）。節切片はシュート出現にともないその後不定根の形成やカルスの形成が認められた。試験区1では、シュートの生長と同時に不定根の形成とその後にカルスの形成がみられた。試験区5では、シュートの形成後、不定根形成及びカルス形成が同じ割合程度で認められた。試験区3でも、不定根形成、カルス形成が同じ割合で認められた。不定根形成に関しては10mg/ℓ BA添加の試験区では形成されず、他の試験区では植物ホルモ濃度の違いによって形成率と形成時期にばらつきがみられた。とくに、試験区4では、他の試験区に比べ、不定根形成の時期が遅かった（第2図）。カルス形成に関しては、形成時期にばらつきがあるものの全ての試験区でカルスが形成された。カルス形成時期についてみると、試験区7, 8, 9区を比較した場合NAA濃度が高いほどカルス形成の時期が早かった（第3図）。

節間切片を用いた培養では、NAA無添加の試験区1,4,7において、60～90%の切片が枯死した（第3表）。NAA添加の試験区2,3,5,6,8,9ではBA濃度により以下のように顕著な違いがみられた。BA無添加の試験区2,3では不定根形成率が高く不定芽形成率は低かった。一方、1mg/ℓ BA添加の試験区5,6ではカルス経由による不定芽形成が高い頻度で認められて、不定根形成もみられ、増殖に利用できるものと考えられた。10mg/ℓ BA添加の試験区8,9ではカルスの経由の不定芽のみを形成するものがみられ、不定根形成はみられなかった。とくに、10.0mg/ℓ BAと1.0mg/ℓ NAA添加の試験区では活発に脱分化して大きなカルスが観察された。

葉切片ではNAA無添加の試験区1,4,7では90～100%の切片が枯死した（第4表）。NAA添加の試験区2,3,5,6,8,9ではBA濃度により以下のように器官形成に顕著な違いがみられた。BA無

第2表 節切片の in vitro 培養による器官形成

試験区	植物ホルモン濃度		供試 切片数	生存 切片数	枯死 切片数	シュート形成 切片数	カルス形成 切片数	不定根形成 切片数
	BA	NAA						
1	0mg/ℓ	0mg/ℓ	18	18	0	17	18	18
2	0	0.1	22	22	0	20	22	22
3	0	1.0	16	16	0	13	16	16
4	0.1	0	18	18	0	18	10	18
5	0.1	0.1	20	20	0	20	20	20
6	0.1	1.0	20	20	0	18	20	18
7	10.0	0	20	20	0	20	2	0
8	10.0	0.1	16	16	0	16	12	0
9	10.0	1.0	18	16	0	18	18	0

置床後 12 週目の結果

第3表 節間切片の in vitro 培養による器官形成

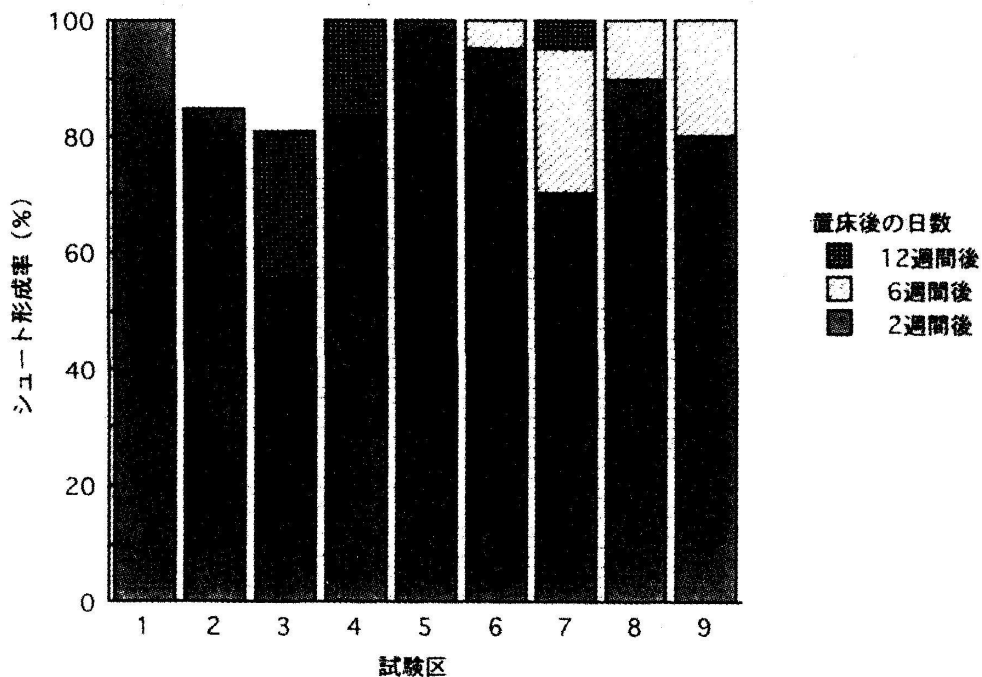
試験区	植物ホルモン濃度		供試 切片数	生存 切片数	枯死 切片数	不定芽形成 切片数	カルス形成 切片数	不定根形成 切片数
	BA	NAA						
1	0mg/ℓ	0mg/ℓ	16	6	10	0	6	0
2	0	0.1	20	20	0	1	20	20
3	0	1.0	18	18	0	0	18	18
4	0.1	0	20	4	16	2	4	2
5	0.1	0.1	20	20	0	10	20	10
6	0.1	1.0	20	20	0	14	20	8
7	10.0	0	20	3	17	3	1	0
8	10.0	0.1	18	18	0	6	18	0
9	10.0	1.0	16	16	0	3	16	0

置床後 12 週目の結果

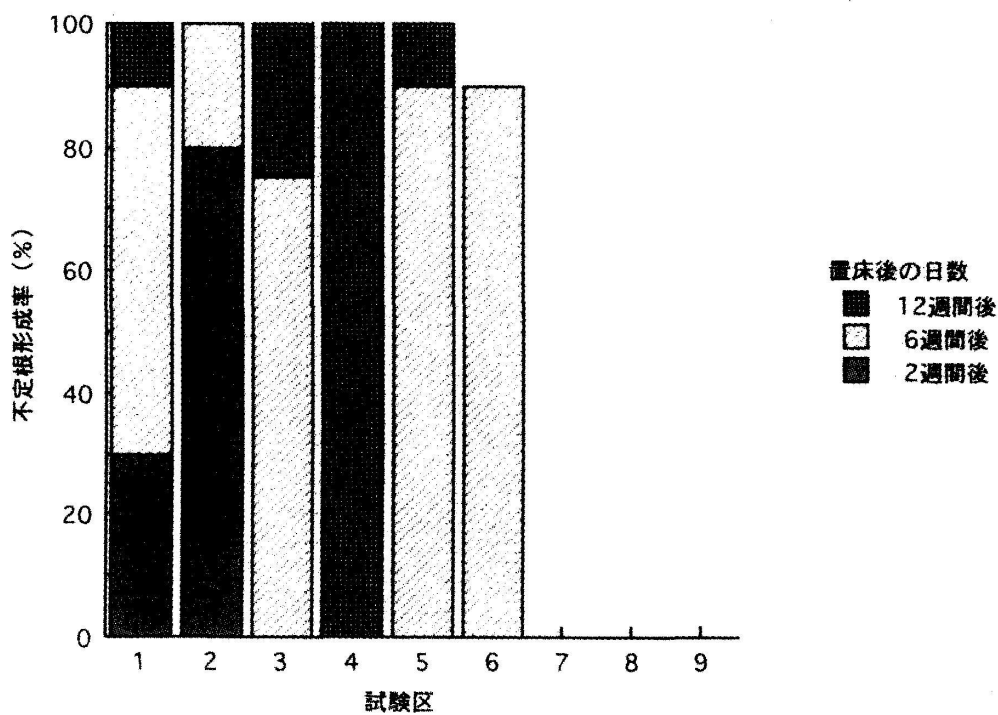
第4表 葉切片の in vitro 培養による器官形成

試験区	植物ホルモン濃度		供試 切片数	生存 切片数	枯死 切片数	不定芽形成 切片数	カルス形成 切片数	不定根形成 切片数
	BA	NAA						
1	0mg/ℓ	0mg/ℓ	18	1	17	0	0	1
2	0	0.1	20	20	0	0	20	20
3	0	1.0	20	20	0	0	20	20
4	0.1	0	18	0	18	0	0	0
5	0.1	0.1	16	16	0	6	16	2
6	0.1	1.0	20	20	0	3	20	2
7	10.0	0	20	2	18	2	2	0
8	10.0	0.1	20	20	0	14	20	0
9	10.0	1.0	18	18	0	4	18	0

置床後 12 週目の結果



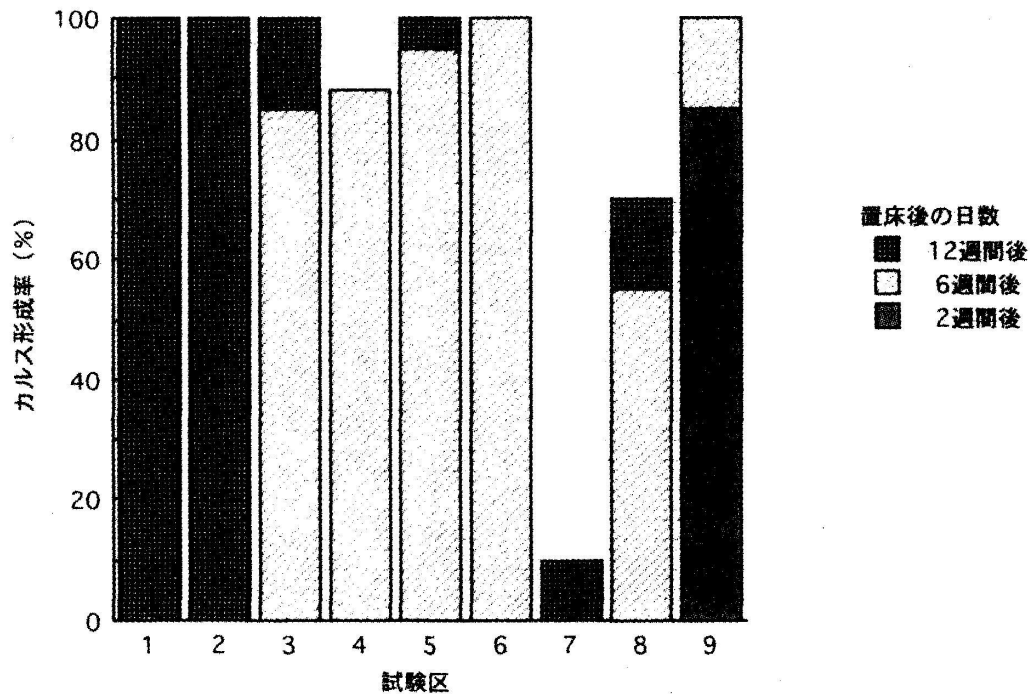
第1図 節切片の in vitro 培養によるシュート形成の経時比較



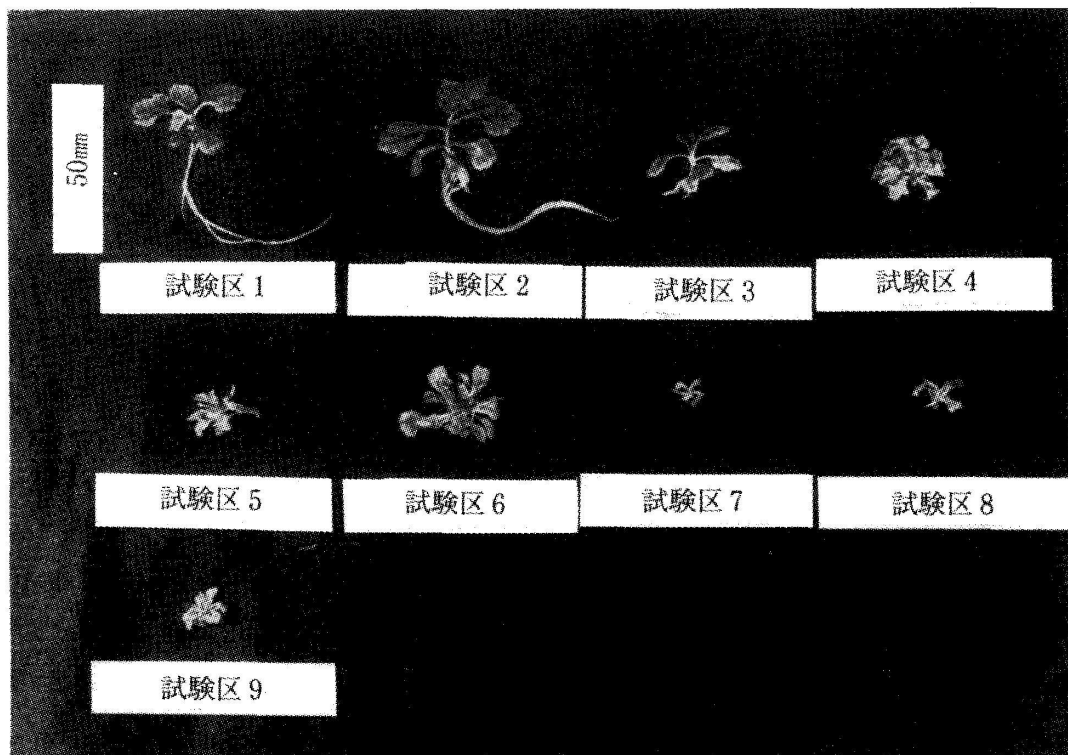
第2図 節切片の in vitro 培養による不定根形成の経時比較

添加の試験区 2, 3 では不定根形成率が高く、不定芽形成はみられなかった。1.0mg/ℓ BA 添加の試験区 5, 6 ではカルスが全ての切片で形成された後に、不定芽及び不定根形成が増加した。10mg/ℓ BA 添加の試験区 8, 9 ではカルス形成が遅れてから不定芽形成がみられた。とくに試験区 8 では高い頻度の不定芽形成を観察した。

植物ホルモン添加により節切片に出現したシュート由来の植物体の生長量について比較した結果、再生植物体の形態は試験区によって異なり、試験区 2 での再生植物体は試験区 1 (ホルモンフリー)



第3図 節切片の in vitro 培養によるカルス形成の経時比較



第4図 各試験区の培地での節切片の in vitro 培養によって得られた再生植物体

に比べ、茎長は約0.7cm、根の長さは約7.2cm長かった。他の試験区では、この両方の区よりも背丈の低い植物体が形成され、試験区6, 7, 8, 9ではBA濃度が高まると、茎の生長が低下して茎長が著しく短く発根もみられなかった(第5表, 第4図)。

培地に添加した植物ホルモンの種類と濃度に応じて、シュート、不定芽、不定根、カルスの形成

第5表 節切片に形成された再生植物体の生長量

試験区	植物ホルモン濃度 BA (mg/ℓ) NAA (mg/ℓ)		茎長 (cm)	葉数	葉長 (cm)	葉幅 (cm)	根長 (cm)	根数	新鮮重 (mg)	乾物重 (mg)
1	0	0	20.3	23.2	1.13	1.01	9.3	4.7	405	67
2	0	0.1	21.1	24.0	0.91	0.99	16.5	3.6	443	76
3	0	1.0	12.7	11.0	1.11	1.07	11.5	6.5	435	60
4	0.1	0	15.0	18.3	0.77	0.79	11.6	3.3	420	60
5	0.1	0.1	13.5	17.0	1.06	1.13	3.5	3.0	870	70
6	0.1	1.0	8.5	15.5	0.66	0.55	-	-	360	60
7	10.0	0	6.0	14.3	0.66	0.51	-	-	260	43
8	10.0	0.1	6.8	16.6	0.65	0.56	-	-	413	56
9	10.0	1.0	9.6	21.6	0.45	0.48	-	-	486	73

置床後 24 週目の結果

第6表 培地組成の異なる再生植物体から採取した節切片の器官形成

初代培養培地の試験区 植物ホルモン濃度 BA NAA			供試 切片数	生存 切片数	枯死 切片数	シュート形成 切片数	カルス形成 切片数
1	0 mg/ℓ	0 mg/ℓ	20	20	0	4	20
2	0	0.1	10	10	0	7	10
3	0	1.0	8	8	0	4	8
4	0.1	0	10	10	0	8	10
5	0.1	0.1	10	5	5	3	5
6	0.1	1.0	10	10	0	5	10
7	10.0	0	10	10	0	8	10
8	10.0	0.1	10	9	1	8	9
9	10.0	1.0	10	10	0	9	10

BA と NAA 添加の MS 培地で培養後 6 週目の結果

が認められ、節切片を利用する場合、節に存在する定芽が生長してシュートに発達したと考えられるが、節間切片や葉切片を用いた場合には不定芽が生長してシュートに発達するので、節だけでなく節間や葉の切片も増殖に利用できることがわかった。節切片を用いて大きなシュートを得るための最適培地は試験区 2 の 0.1mg/ℓ NAA 添加区であり、節間切片と葉切片では不定芽を高率で形成させた BA と NAA 添加培地が最適であると考えられた。

次に、異なる組成の培地で得られた再生植物体から採取した節切片、節間切片及び葉切片を BA と NAA を添加した培地で再培養を行って形態形成の様相を比較した結果、節切片ではすべての試験区でシュート出現が認められたが、試験区 1 では他の区に比べて低い形成率を示した（第 6 表）。

節間切片では、試験区 4, 5, 6 において不定芽形成がみられなかった。他の区でも不定芽形成率は 40% 以下の低い値であった（第 7 表）。

葉切片では、試験区 1 では不定芽形成がみられなかったが、試験区 3 の不定芽形成率は 50% で、他の試験区の不定芽形成率は 40% 以下の値を示した（第 8 表）。

第7表 培地組成の異なる再生植物体から採取した節間切片の器官形成

初代培養培地の試験区 植物ホルモン濃度			供試 切片数	生存 切片数	枯死 切片数	不定芽形成 切片数	カルス形成 切片数
BA	NAA						
1	0mg/ℓ	0mg/ℓ	16	16	0	4	16
2	0	0.1	10	10	0	3	10
3	0	1.0	10	8	2	3	8
4	0.1	0	10	10	0	0	10
5	0.1	0.1	10	5	5	0	5
6	0.1	1.0	10	10	0	0	10
7	10.0	0	10	9	1	1	9
8	10.0	0.1	10	8	2	2	8
9	10.0	1.0	10	10	0	2	10

BA と NAA 添加の MS 培地で培養後 6 週目の結果

第8表 培地組成の異なる再生植物体から採取した葉切片の器官形成

初代培養培地の試験区 植物ホルモン濃度			供試 切片数	生存 切片数	枯死 切片数	不定芽形成 切片数	カルス形成 切片数
BA	NAA						
1	0mg/ℓ	0mg/ℓ	16	16	0	0	16
2	0	0.1	10	10	0	4	10
3	0	1.0	10	10	0	5	10
4	0.1	0	10	9	1	3	9
5	0.1	0.1	10	9	1	3	9
6	0.1	1.0	10	10	0	1	10
7	10.0	0	10	10	0	4	10
8	10.0	0.1	10	8	2	1	8
9	10.0	1.0	10	10	0	3	10

BA と NAA 添加の MS 培地で培養後 6 週目の結果

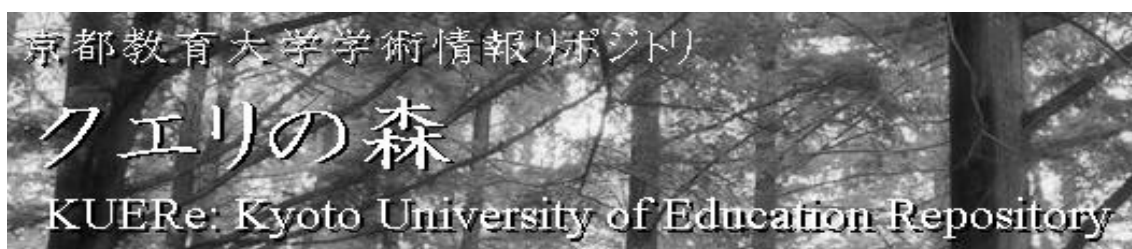
カルス形成についてみると、供試切片の種類にかかわらず、すべての試験区で100%のカルス形成率がみられ、カルス形成時期は葉切片では節切片や節間切片に比べて形成が遅かった。カルスの形成部位については、節切片では培地に接している部位からカルス形成がみられたのに対し、節間切片では上下の切り口からカルス形成がみられ、葉切片では周囲の切り口全体からカルス形成がみられた。

異なる組成の培地で得られた再生植物体から採取した切片を再培養した結果、節切片の場合には初代培養の結果と同様に定芽がシュートに発達したが、節間切片や葉切片では初代培養の培地組成の影響によって変化した形態が再培養に強く影響を及ぼしていると考えられた。すなわち、初代培養の場合に不定芽形成率が高かった試験区ほどに再培養の場合には不定芽形成率が高まらなかった。したがって、増殖を目的として節の他、節間や葉切片を用いる場合にはBA及びNAAを高濃度に添加してカルス形成、不定芽形成を促すよりも再生植物体の形態が著しく変化するほどは植物ホルモンを添加せずに節切片を利用する方が変異も少なくて良いのではないかと考えられる。高山¹⁰⁾らの

茎頂培養によって得られたウイルスフリー株の増殖も節切片を中心として利用している。深井²⁾は葉切片培養におけるカルスの生長と不定芽形成に及ぼす糖の影響や品種比較について検討しており、通常培地に加える糖濃度がショ糖20~30 g/lであるが、ショ糖40 g/lの方がBAとNAAの不定芽形成に対する添加効果が優れると報告し、品種については不定芽形成がみられたのは137品種中49%であったと報じている³⁾。本実験での結果も茎頂培養によって得られたウイルスフリー株をさらに増殖する際の資料になりうると考えられる。また、キク茎頂の低温保存⁴⁾や塩素殺菌剤による *in vitro* 保存¹²⁾の研究が行われているが、保存されたキクの個体を増殖する際にも本実験の節切片を中心とした培養法が利用できるものと考えられる。

引用文献

- 1) 藤野守弘. 1997. 培養苗の生産・利用. キク. 農業技術体系花卉編 5 農山漁村文化協会. pp.471-473.
- 2) 深井誠一. 1986. キクの葉片培養におけるカルスの生長と器官形成に及ぼす糖の影響. 植物組織培養 3: 71-77.
- 3) 深井誠一・陳 忠英・大江正温. 1987. キクの葉片培養におけるシュート形成に関する品種間差異. 大阪農技センター研究報告 24: 55-58.
- 4) 深井誠一・大江正温. 1989. キク茎頂の低温保存. 植物組織培養 6: 10-13.
- 5) 村崎公明・笹原宏之・多田邦雄. 1988. クローン植物生産の実務・花卉. キク. 植物組織培養の世界. 柴田ハリオ硝子. pp.166-167.
- 6) Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-479.
- 7) 大石一史. 1989. ウイルスフリー苗を利用した切り花ギクの生産. バイオホルティ 1: 91-93.
- 8) 大石一史. 1989. キクのウイルスフリー苗の育成. バイオホルティ 1: 97-102.
- 9) 大塚寿夫. 1988. キクのプロトプラストからの植物体再生. 新花卉 139: 16-20.
- 10) 高山 寛. 1987. キクの茎頂培養と増殖. 図解バイオテクノロジー. 農業図書. pp.30-39.
- 11) 山田栄成. 1992. キクのプロトプラスト培養と細胞融合. 図解花のバイオ技術. 誠文堂新光社. pp.136-137.
- 12) 梁川 正・米澤秀一. 1999. キク及びサルビア幼苗の塩素殺菌剤による簡便な *in vitro* 保存. 園芸学会雑誌68別2. p.146.
- 13) 和田 薫. 1992. キク. 増補図解組織培養入門. 誠文堂新光社. pp.56-61.



この文献は、国立情報学研究所において電子化されたものを、本学でテキスト加工したものです。

