

ミヤコワスレの組織培養による大量増殖

誌名	福岡県農業総合試験場研究報告. B, 園芸 = Bulletin of the Fukuoka Agricultural Research Center. Series B, Horticulture
ISSN	02863030
著者	近藤, 英和 田中, 幸孝 中村, 新一
巻/号	7号
掲載ページ	p. 69-74
発行年月	1988年1月

ミヤコワスレの組織培養による大量増殖

近藤英和・田中幸孝・中村新一・豆塚茂実
(園芸研究所野菜花き部)

ミヤコワスレの組織培養による大量増殖法を確立するため、生長点からのカルス経路による増殖及び葉柄からの茎葉の再分化について検討した。

生長点からのカルス形成は非常に低率であったが、NAA及びBAを各2.0ppm添加した培地ではカルスの生育が優れていた。カルスからの茎葉分化はNAA 0.1ppm, BA 2.0ppm添加したハイポネックス培地が優れていた。シュートの増殖は移植63日後ではNAA 0.2ppm, BA 2.0ppmを添加したハイポネックス培地、108日後にはBA 4.0ppmを添加したMS培地が優れていたが、MS及び1/2MS培地では株の褐変が多数認められた。発根はNAA 0.1ppm以下の濃度で発根率、根長ともに優れ、また新しい固化剤であるゲルライトは寒天に比べ根数は少なかったが、根長は1.7倍に伸長した。

葉柄からの茎葉の再分化は、BAを単独で添加した1/2MS培地では置床15日後にシュートの発生が認められ、103日後にはBA 4.0ppmを添加した1/2MS培地で11.5本のシュートを形成した。

[Keywords : *Gymnaster savatierii* KITAMURA, mass propagation, tissue culture
callus regeneration]

緒 言

ミヤコワスレは我が国原産のキク科植物で紫色、桃色、白色等の可れんな花であり、最近、需要が高まっている。染色体数は $2n=18, 27, 36$ であるが、本試験に供試した鮮青味紫色種は $2n=27$ の三倍体であるため、種子繁殖が出来ない。繁殖は通常株分け又は挿芽で行われるが、長期にわたる栄養繁殖の結果、花弁、花径、葉形等の形態の変異、花色、葉色等の色彩の変異及び低温感応、生育最低温度等の生理的変異が発生している。また、最近ウィルス病による生育不良、花弁の縮、あるいは花色の淡色化等が大きな問題となっている。

これらの対策として、無病の優良系統を短期間で大量に増殖する必要があるが、ミヤコワスレの組織培養による大量増殖に関する報告はキク、カーネーションに比べ極めて少ない。

本報告は生長点培養及び葉柄からの再分化による大量増殖のための培地について検討したものでありその概要を報告する。

材料及び方法

材料は露地栽培中の株を供試した。採穂株の殺菌は根出葉及び根を除去し、30分間流水で洗浄後、

次亜塩素酸ナトリウム1%液に10分間浸漬、滅菌水で3回洗浄した。

培地は基本培地として Murashige & Skoog 培地³⁾ (以下MS培地)、1/2の塩類濃度にしたMS培地 (以下1/2MS培地)、及びハイポネックス培地(3g/l, 以下Hyponex培地)を用い、しょ糖30g/l, pH5.8とし、特別の場合を除いて寒天(WAKO)8g/lを添加した。

培養条件は全期間を通して25℃、16時間照明、光量2,000~3,000 luxとした。

試験方法は次のとおりである。

1. カルス経路による大量増殖

1) 生長点からのカルス形成

休眠芽の生長点を0.3~0.5mmの大ききで摘出し、ベンジルアデニン(以下BA)及び α -ナフトレン

第1表 カルス形成のための培地組成

試験区	基本培地	NAA	BA
1	MS	0.5 ^{ppm}	0.5 ^{ppm}
2	"	0.5	1.0
3	"	0.0	2.0
4	"	1.0	2.0
5	"	2.0	2.0

酢酸(以下NAA)を第1表に示した濃度で添加したMS培地に各区30個体置床した。培養は培地8mlをいれた直径24mmの試験管でおこなった。

2) カルスから再分化

カルスを3mm角に分割し、NAA 0.2ppm、BA 2.0ppm及びNAA 0.1ppm、BA 1.0ppmを添加したMS培地及びHyponex培地、NAA 2.0ppm、BA 1.0ppmを添加したMS培地に移植した。培養は培地20mlを入れた培養フラスコで行った。

3) シュートの増殖

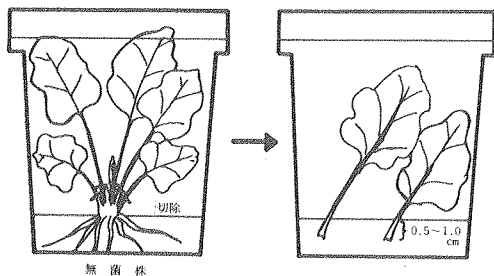
シュートは1~2mmの腋芽をつけて1節毎に分割し、NAA及びBAを第2表に示した濃度で添加したMS培地、1/2MS培地及びHyponex培地に移植した。培養は培地50mlを入れたプラントボックスで行った。

4) 発根

NAA濃度が発根に及ぼす影響を検討するため、第3表に示した培地を供試した。また、固化剤が発根に及ぼす影響を検討するため、NAAを0.1ppm添加したMS培地に寒天8g/l及びGelrite 3g/lを加え固化した培地を供試した。培養は培地50mlを入れたプラントボックス内で行った。

2. 葉柄からの再分化

上記の手法で無菌的に生育した株から切除した葉をNAA及びBAを第2表に示した濃度で添加したMS培地、1/2MS培地及びHyponex培地に置床した。葉は葉柄部を0.5~1.0cm培地中に斜めに挿入した。



第1図 葉柄の置床方法

第2表 シュート増殖のための培地組成

試験区	NAA	BA	基本培地
1	0.2 ^{ppm}	2.0 ^{ppm}	各区ともMS
2	0.2	4.0	1/2MS
3	0.2	8.0	Hyponex
4	0.0	2.0	
5	0.0	4.0	
6	0.0	8.0	

第3表 発根のための培地組成

試験区	基本培地	NAA
1	Hyponex	0.0 ^{ppm}
2	M S	0.0
3	"	0.0018
4	"	0.018
5	"	0.1
6	"	0.18

結果及び考察

1. カルス経路による大量増殖

1) 生長点からのカルス形成

カルスの生育はNAA 2.0ppm、BA 2.0ppmを添加した培地で最も優れ、置床100日後には7~14mmとなった。この中の1個体は置床75日後には直径13mmのカルスから茎葉の分化が認められた(第4表)。

0.3~0.5mmの生長点の培養では培養中の枯死が多く、全区平均の褐変率は30.7%、汚染率は63.3%と高率であり、生存率は0~16.7%、平均6.0%であった。汚染率が高かったことについては、露地栽培株を用いたことが最も大きな要因であり、さらに生長点が土中又は地際部にあるため、殺菌が十分にできなかったものと思われる。しかし、今回以上の高濃度でしかも長時間の殺菌処理は汚染率の低下には有効と思われるが、殺菌剤による組織の傷みが大きく

第4表 NAA及びBAがカルス形成に及ぼす影響

NAA	BA	置床数	枯死数		生存数	カルス		カルス+シュート		生長点 肥大
			褐変	汚染		数	直径	数	直径	
0.5 ^{ppm}	0.5 ^{ppm}	30	11	19	0	0	— ^{mm}	0	— ^{mm}	0
0.5	1.0	30	6	23	1	1	2.5	0	—	0
0.0	2.0	30	6	19	5	3	3.8	0	—	2
1.0	2.0	30	18	12	0	0	—	0	—	0
2.0	2.0	30	5	22	3	2	7.0	1	14.0	0

なり、褐変率が上昇する恐れがある。このため、採芽株は温室内で殺菌土を用いて鉢栽培を行い、さらに採芽2～3日前に殺菌剤の散布を行う必要がある。大塚ら⁴⁾は基礎培地の無機塩の濃度は薄いほうが退化枯死する組織は少なく、そのためには Hyponex 培地が最も良いと報告している。この点については今後、生長点の大きさとの関連も含めて検討する必要がある。

2) カルスからの再分化

シュートの形成率は NAA 0.1 ppm, BA 1.0 ppm を添加した MS 培地が 36.3% で最も高く、次いで NAA 0.2 ppm, BA 2.0 ppm を添加した Hyponex 培地が 31.0% であった。一方、NAA 2.0 ppm, BA 1.0 ppm を添加した培地では 11.3% と最も低くなった。根のみの分化率は NAA 2.0 ppm, BA 1.0 ppm を添加した MS 培地が最も高く 50.0% であり、MS 培地が Hyponex 培地に比べ高かった(第2図)。

1カルス当たりのシュート数はMS培地が1本であったのに対し、Hyponex 培地では 2.3～5.0 本と多かった(第5表)。

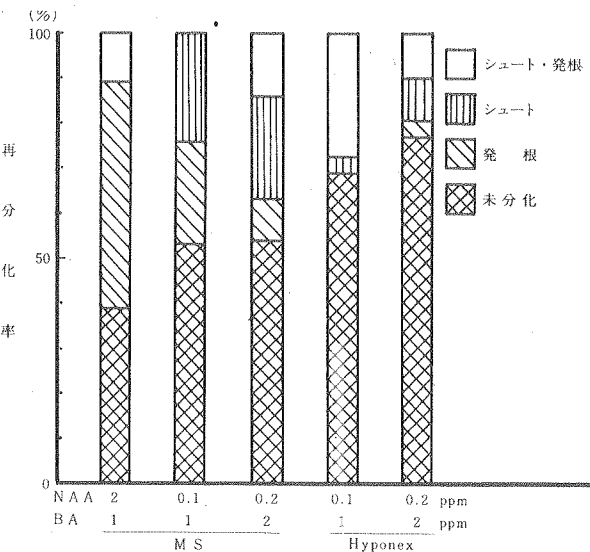
以上のことから、カルスからの茎葉の再分化には NAA 0.2 ppm, BA 2.0 ppm を添加した Hyponex 培地 が最も良いと思われる。また、再分化に用いるカルスは黄緑色又は緑色の部位が再分化率が高いようである。

森下ら²⁾はミヤコワスレと同じキク科のフキでは BA 1.0 ppm を単独で添加した培地が最も茎葉の再分化率が高いと報告している。若狭⁸⁾はイネの薬培養で形成させたカルスからの茎葉分化率の向上、とくに分化植物体数の増加にはカルス形成後4～8日の若いカルスの使用がよいとしている。さらに、高濃度のしょ糖とBAの添加は茎葉分化を促進したと報告している。本研究でもBA濃度が最も高い区が茎葉の再分化率、シュート発生本数ともに優れ、さらにMS培地よりHyponex培地がシュート本数が多かったことから、ミヤコワスレでは培地の塩類濃度は低いほうがカルスからの茎葉分化に適していると推察される。

今後、再分化率を高めるために、カルスの移植時期及び分割の大きさ等について検討する必要がある。

第5表 培地がカルスからの再分化に及ぼす影響

基本培地	NAA	BA	発根		シュート		シュート+発根	
			カルス径	カルス径	カルス径	シュート数	カルス径	シュート数
MS	2.0	1.0	9.4	—	—	12.0	1:0	
"	0.2	2.0	7.0	7.0	1.0	—	—	
"	0.1	1.0	8.2	8.2	1.0	11.4	1.0	
Hypo	0.2	2.0	14.0	14.0	5.0	14.4	5.0	
nex	0.1	1.0	13.0	13.0	2.3	15.0	3.0	



第2図 培地によるカルスからの再分化の相異

3) シュートの増殖

シュート数は63日後にはHyponex培地が多く、とくにNAA 0.2 ppm, BA 2.0 ppm 添加区では 8.7 本となった。108日後には、培地では 1/2 MS 培地、次いでMS培地が多くなり、植物生育調節剤の濃度及び組合せではNAA無添加区が多くなる傾向が認められ、BA濃度は4.0～8.0 ppm が優れていた。とくに、BA 4.0 ppm を添加したMS培地では 23.4 本となり、発根培地へ移植できる草丈1cm以上の本数も 11.3 本と最も多かった(第6表)。

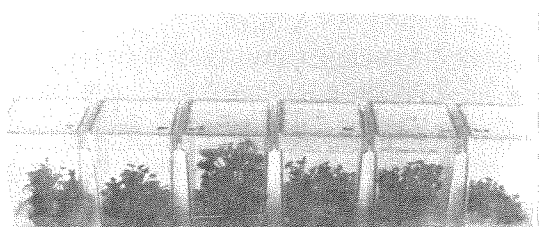
最大シュートの草丈及び葉数はMS培地が最も優れ、とくに葉数は他の培地の約2倍となった。1/2 MS 培地と Hyponex 培地は草丈、葉数ともに同程度であった。

茎葉の形態は、Hyponex 培地では根出葉のみが展開したのに対し、MS 培地では一部で抽台が認めら



NAA	0.2	0.2	0.2	0.0	0.0	0.0 ppm
BA	2.0	4.0	8.0	2.0	4.0	8.0 ppm

写真-1. Hyponex 培地での生育状況(102日後)



NAA	0.2	0.2	0.2	0.0	0.0	0.0 ppm
BA	2.0	4.0	8.0	2.0	4.0	8.0 ppm

写真-3. MS 培地での生育状況(102日後)



NAA	0.2	0.2	0.2	0.0	0.0	0.0 ppm
BA	2.0	4.0	8.0	2.0	4.0	8.0 ppm

写真-2. 1/2 MS 培地での生育状況(102日後)

れ、茎出葉が展葉した。さらに腋芽が伸長し分枝となった株も認められた(写真1~3)。

同一培地で長期間培養を行った結果、MS 培地及び 1/2 MS 培地で株の褐変が発生し、108 日後には

両培地の全ての区で認められたが、Hyponex 培地では全く認められなかった。このため、MS 培地及び 1/2 MS 培地で増殖を行う場合には2ヶ月程度で新しい培地へ移植するのが良いと思われる。

今後、培地の塩類濃度と褐変との関連及び発根培地への移植時期の検討が必要である。

4) 発根

NAA 濃度が発根に及ぼす影響について検討した結果、0.1ppm 以下では10日後には発根率100%、根長15mm 以上になった。しかし、0.18ppm では発根及び根の伸長は抑制され、発根率50%、根長4.5mm にすぎなかった。Hyponex 培地とMS 培地をNAA 無添加で比較すると、発根にはほとんど差は認められなかった(第7表)。

固化剤による発根の差はGelriteが寒天に比べ根数

第6表 培地の種類及びNAA・BA濃度がシュートの増殖に及ぼす影響

基本培地	NAA ppm	BA ppm	63 日 後				108 日 後				
			最大シュート		シュート数	褐変率	最大シュート		四次培地の移植本数	褐変率	
			草丈 mm	葉数 枚			草丈 mm	葉数 枚			
Hyponex	0.2	2.0	23.2	5.4	8.7	0.0	37.2	7.9	9.0	5.7	0.0
	0.2	4.0	11.6	3.2	7.1	0.0	20.9	4.9	12.3	6.0	0.0
	0.2	8.0	16.0	5.2	4.6	0.0	21.2	5.7	10.3	4.2	0.0
	0.0	2.0	9.4	4.1	7.1	0.0	15.8	5.2	15.1	8.4	0.0
	0.0	4.0	9.6	3.3	7.0	0.0	13.3	4.6	16.1	6.3	0.0
	0.0	8.0	9.0	3.7	6.9	0.0	19.8	4.6	13.9	7.6	0.0
1/2 MS	0.2	2.0	9.7	4.7	4.4	22.2	15.6	5.1	12.4	4.8	44.4
	0.2	4.0	14.4	3.7	6.1	0.0	23.2	4.3	18.6	6.9	22.2
	0.2	8.0	12.3	4.4	5.3	0.0	22.1	5.3	20.8	8.0	33.3
	0.0	2.0	14.3	5.3	6.4	0.0	18.9	6.1	16.8	3.7	77.8
	0.0	4.0	11.9	4.3	4.4	100.0	12.8	4.0	15.1	3.7	100.0
	0.0	8.0	10.3	4.9	5.4	22.2	21.9	5.6	20.3	5.3	88.9
MS	0.2	2.0	15.2	8.5	4.0	33.3	22.8	11.0	7.2	5.0	66.7
	0.2	4.0	13.6	8.1	5.2	44.4	23.2	11.0	8.9	5.4	88.9
	0.2	8.0	15.8	6.0	5.5	16.7	42.8	7.8	15.3	8.3	16.7
	0.0	2.0	19.8	7.6	5.1	22.2	32.2	11.0	16.3	6.1	77.8
	0.0	4.0	20.1	9.0	6.3	0.0	35.8	11.8	23.4	12.8	88.9
	0.0	8.0	12.9	5.2	7.4	0.0	30.1	7.6	19.0	5.8	88.9

は劣ったが、根長は4週間後に72.9mmと約1.7倍になった。根数は、寒天では移植3週間後から4週間後の1週間で2.1本増えたのに対し、Gelriteでは1.5本の増加にとどまっている。根長は同じ1週間で寒天がわずか4.8mm伸長したのに対し、Gelriteでは約5倍の25mm伸長し、期間がさらに長くなると、寒天では根の先端が褐変枯死することが多かったが、Gelriteではさらに伸長を続けた(第8表)。

Gelriteはヘテロ多糖類でカチオンの共存下でゲル化し、寒天に比べ透明度が高い。下村ら⁵⁾は固化の程度は可溶性金属塩の濃度に比例し、根の伸長を良くするが、これは植物の種類、品種で異なり、オレンジではある種の酵素で分解されるため使用できないと報告している。この酵素による分解はミヤコワスレでは全く問題がなく、一般に寒天は海藻から作るため純度が低いと細胞分裂を抑制する物質が含まれているといわれており、今後、植物の培養においてGelriteの使用が増加すると思われる。しかし、主成分の50%がグルコースであり、カリウムが2%その他ナトリウム、カルシウム等が若干含まれているため、培養時には培地の組成を見直す必要がある。

多田ら⁶⁾はミヤコワスレの発根にはNAA 0.1ppmを添加したHyponex培地が良く、30日後には鉢上げできるとしているが、本研究ではGelriteの使用で3週間で鉢上げできることが明らかになった。

第7表 NAA濃度が発根に及ぼす影響

基本培地	NAA	7日後			10日後		
		発根率	根数	最大根長	発根率	根数	最大根長
Hypoxex	0.0	46.7%	0.6本	4.2mm	100.0%	5.1本	15.0mm
MS	0.0	60.0	1.0	3.9	100.0	3.8	15.2
	0.0018	80.0	3.0	7.6	100.0	5.4	21.0
	0.018	80.0	1.5	6.2	100.0	2.8	17.6
	0.10	93.3	1.7	11.5	100.0	5.6	25.6
	0.18	40.0	0.6	2.1	50.0	0.7	4.5

第8表 固化剤が発根に及ぼす影響

固化剤	3週間後			4週間後		
	根数	根長	葉数	根数	根長	葉数
寒天	5.3本	38.8mm	5.6枚	8.4本	43.6mm	6.7枚
Gelrite	4.9本	47.9mm	5.7枚	6.4本	72.9mm	6.1枚

2. 葉柄からの再分化

葉柄からの再分化はほとんどの区で認められたが、MS培地ではカルスの状態から再分化しない区が多かった。シュートの形成はBAを単独で添加した1/2MS培地が最も早く、置床15日後に認められた。シュート本数は1/2MS培地が最も多く、同培地にBA単独で4.0ppm添加した区では103日後に11.5本を示した。草丈及び葉数は1/2MS培地が優れる傾向がみられた(第9表)。

葉切片からの茎葉の分化については、大塚ら⁴⁾の報告ではIAAとBAの組合せで10~20%の茎葉分化率が確認されている。本研究では葉柄からの分化について検討した結果、全区の平均で77.8%の分化率となった。これは大塚らが2×10mmの葉切片からの再分化を試みたのに対し、本研究は葉柄を含む葉1枚からの再分化であり、外植体の大きさが最も影響したと思われる。さらに、NAAあるいはIAA等のオーキシン類の添加は必要ないと思われる。

葉柄からの増殖法は、ミヤコワスレのような生長点培養において生存率が極めて低い植物では生存率の向上及び培養期間の短縮によって大量増殖がより効率となるので、有効な手法と思われる。森ら¹⁾はタバコのウイルス病葉片のカルス培養によって無ウイルス株を多数育成しており、武田⁷⁾もカーネ

第9表 培地の種類が葉柄からの再分化に及ぼす影響

基本培地	NAA	BA	草丈	葉数	シュート数	
Hyponex	0.2ppm	2.0ppm	1.0mm	1.0枚	0.5本	
	0.2	4.0	0.6	2.5	2.0	
	0.2	8.0	0.7	3.0	3.0	
	0.0	2.0	2.3	4.0	11.0	
	0.0	4.0	0.7	4.0	5.0	
	0.0	8.0	カルス形成後汚染			
	0.2	2.0	2.2	5.0	0.5	
	0.2	4.0	2.5	5.0	5.5	
	0.2	8.0	シュート形成後汚染			
	0.0	2.0	2.1	3.5	4.0	
1/2MS	0.0	4.0	2.0	6.5	11.5	
	0.0	8.0	シュート形成後汚染			
	0.2	2.0	0.3	2.0	2.5	
	0.2	4.0	カルス形成のみ			
	0.2	8.0	カルス形成のみ			
	0.0	2.0	1.0	2.5	4.5	
	0.0	4.0	カルス形成のみ			
	0.0	8.0	0.4	3.0	4.5	
	MS	0.2	2.0	0.3	2.0	2.5
		0.2	4.0	カルス形成のみ		

ーションのカルスから無ウイルス株を育成した。本研究ではウイルスの検定は行っておらず、無病株の確認はできなかった。しかし、置床した生長点の大きさが0.3~0.5 mmと小さく、また育成株の生育、草丈及び花色から判断するとウイルスはほとんど除去されたように思われる。

カルス経路による大量増殖を図る場合には変異の検定が必要となる。これについては現在検討中であるが、葉色、草丈及び花色等に若干変異と思われる株が認められた。しかし、交配育種が難しいミヤコワスレにとっては有効な育種法の一つであると思われる。

引用文献

- 1) 森 寛一(1986): 無菌培養の確立法. クローン植物大量生産の実際技術, 13~24
- 2) 森下正博・嘉儀 隆・山田貴義(1980): フキの花茎および葉柄組織からのウイルスフリー株大量育成. 大阪府農業技術センター研究報告 第17号. 1~6
- 3) Murashige, T. and F. Skoog(1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 437~497
- 4) 大塚寿夫・太田光輝・戸田幹彦(1984): 組織培養による大量増殖技術の確立に関する研究 ミヤコワスレ組織培養における培地条件. 昭和58年度静岡農試試験研究成果概要集, 78
- 5) 下村講一郎・鎌田博(1986): 植物組織培養における培地固型化剤の役割. *植物組織培養* 3(1), 38~41
- 6) 多田邦雄・福岡新一・荏原利代子(1985): 宿根草, 花木類のウイルスフリー苗生産. 園芸植物の器官と組織の培養, 176~193
- 7) 武田恭明(1974): 茎頂培養によるカーネーションの無病苗育成と実用化に関する研究. 滋賀県農業試験場特別報告 第11号, 4~33
- 8) 若狭 暁(1982): 植物組織培養の育種への利用培養法の改良と変異体作出. 農業技術研究所報告D 第33号, 121~200

Studies on the Mass Propagation by Tissue Culture in *Gymnaster Savatierii* KITAMURA.

KONDO Hidekazu, Yukitaka TANAKA, Shinichi NAKAMURA and Shigemi MAMETSUKA

Summary

In order to establish the mass propagation method by tissue culture in *Gymnaster savatierii* KITAMURA, the possibility of in vitro propagation by callus derived from shoot tip and petiole was investigated.

Callus were obtained from the shoot tip on Murashige and Skoog medium (MS medium) mixed with 2.0mg/l of BA (6-benzyl-aminoprine) and NAA (α -naphthyl acetic acid), although the callus formation was poor.

The differentiation from callus was observed on Hyponex medium mixed with 2.0mg/l of BA and 0.1mg/l of NAA.

Number of shoots increased on Hyponex medium mixed with 2.0mg/l of BA and 0.1mg/l of NAA for 63 days subculturing of the shoot. After 108 days, number of shoots increased on MS medium mixed with 4.0mg/l of BA, although the browning of multipuled shoots were observed on MS and 1/2 MS medium.

Root formation was favourable below 0.1mg/l of NAA. By using Gelrite instead of Agar, root length elongated, and number of roots decreased.

1/2 MS medium mixed with 4.0mg/l of BA was the most favourable medium for differentiation from petiole.