

培養増殖中の温度と継代がスターチス・シヌアータの開花に及ぼす影響

深山貴世*・稲本勝彦・土井元章・今西英雄

大阪府立大学農学部 599-8531 堺市学園町

Influences of Temperature and Subculturing in Vitro on Subsequent Flowering of *Limonium sinuatum* Mill.

Takayo Miyama*, Katsuhiko Inamoto, Motoaki Doi and Hideo Imanishi

College of Agriculture, Osaka Prefecture University, Gakuen-cho, Sakai, Osaka 599-8531

Summary

Lateral buds from flower stalks of annual statice (*Limonium sinuatum* Mill. 'Early Blue') were cultured in vitro at 20 °C or 27 °C on a half strength Murashige-Skoog medium containing 0.01 mg · liter⁻¹ NAA, 1.0 mg · liter⁻¹ BA, 30 g · liter⁻¹ sucrose, and 8 g · liter⁻¹ agar. The emerging shoots were excised from clumps of multiple shoots and subcultured for 4 weeks at 20 °C on a hormone-free rooting medium. The rooted plantlets were transplanted into pots and grown at 20 °C. The bolting percentage of the plants derived from the primary culture at 20 °C was 67%, whereas that of plants kept at 27 °C was only 13%. When divided clumps of multiple shoots were subcultured twice for multiplication using the same medium as in the primary culture, plants failed to bolt. However, when comparable shoots were subjected to 2 °C for 4 weeks during the final subculture for multiplication or rooting culture, almost all plants bolted. Repeated subculture for multiplication following the low temperature treatment resulted in a decrease in the bolting percentage.

These results indicate that high temperature and repeated subculturing during in vitro multiplication cause a disappearance of the flowering potential of the micropropagated statice plants, whereas low temperature treatment during subculture can restore it.

Key Words: bolting, *Limonium sinuatum* Mill., low temperature treatment, micropropagation, repeated subculture.

緒 言

スターチス・シヌアータ (*Limonium sinuatum* Mill.) においては、形質が均一で生育の旺盛な培養苗を用いた切り花生産が近年増加している。しかし、培養苗を促成栽培に用いた際、不開花や開花遅延が起こる例がみられ、問題となっている。スターチス・シヌアータは、催芽種子あるいは本葉を展開した段階で低温に遭遇することにより春化され、抽だい・開花する (吾妻・犬伏, 1986; 吾妻ら, 1983; 藤田, 1986)。この低温の効果はその直後に 30 °C 近い高温に遭遇することにより消去されるが (吾妻・犬伏, 1986; 藤田, 1986)、低温遭遇後しばらく 20 °C 付近の温度域で栽培すると、その後高温に遭遇しても開花能力は失われない (吾妻・犬伏, 1986; 吾妻ら, 1983; Shillo, 1976)。これらの実験結果から、組織培養中の温度が培養苗のその後の開花に関係していることが

推察される。本実験では、この点を明らかにするとともに、増殖のために行われる継代培養が開花能力に及ぼす影響についても検討し、さらに、培養期間中の低温処理により苗に開花能力を付与できないかを検討した。

材料および方法

大阪府立大学の圃場において栽培された 'Early Blue' を供試した。抽だいから約 10 日経過して 10~15 cm に伸長した花穂を採取し、表面殺菌後、節を含む約 1 cm の切片に調製した。培養は宮本ら (1991) の方法に準じて行った。初代培養として、それらの切片を NAA 0.01 mg · liter⁻¹, BA 1.0 mg · liter⁻¹, ショ糖 30 g · liter⁻¹, 寒天 8 g · liter⁻¹ を加えた 1/2 MS 培地 (以下増殖培地) に外植し、4 週間培養した。初代培養において形成された多芽体を分割して再び増殖培地に置床し、4 週間培養する継代培養 (以下継代培養) を 0 ないし数回行った。その後多芽体からシュートを切り出し、ショ糖 30 g · liter⁻¹ と寒天 8 g · liter⁻¹ のみを加えた 1/2 MS 培地 (以下発根培地) に置床し、4 週間培養する発根培養を行っ

1997 年 12 月 10 日 受付. 1998 年 2 月 20 日 受理.

本報告の一部は平成 9 年度園芸学会春季大会において発表した。

*現在: 兵庫県立中央農業センター農業大学校

た。初代培養では口径 24 mm のガラス試験管に外植体を 1 本、継代ならびに発根培養では縦 6 cm×横 6 cm×高さ 10 cm のプラスチックボックス (ケニス理化学機器, M 130 AZ) に植物を 5 本置床し、特記しない限り 20 °C、植物育成用蛍光灯 (松下電器 (株), FL 20 S・PG) による 16 時間照明下で培養した。また、試験管の蓋には 1 つ、プラスチックボックスの蓋には 4 つの各 0.8 cm² の穴をあけ、通気性膜 (孔径 0.5 μm; 日本ミリポア (株), FWMS 01800) を貼付した。

以上のような初代培養から発根培養の過程で、培養温度や継代回数を変える処理を行い、植え出し後の抽だいをみた。ただし、処理の詳細は結果の項で述べる。発根後の苗の植え出しは粒状ロックウール (日東紡績 (株), 66 R) を培地とした 196 穴角型プラグトレイに行い、さらに約 30 日後に、同じ培地を用いて直径 24 cm のプラスチックポットに鉢上げした。植え出し後の栽培は 20 °C の自然光型グロースキャビネット内で行った。抽だいの調査は植え出しから 150 日後で打ち切った。なお、この抽だいたした花茎はいずれも開花に至った。

結 果

実験 1. 初代培養における培養温度が抽だいに及ぼす影響

初代培養時の温度を 20 °C ならびに 27 °C に設定した。継代培養を行わずに 20 °C の発根培養に移し、以後先述の方法に従って抽だいをみた。20 °C 区における抽だいは 67%、抽だい時の平均葉数が 27 枚であったのに対し、27 °C 区ではそれぞれ 13%、36 枚であった (第 1 表)。

実験 2. 継代培養の繰り返しに及ぼす影響

初代培養の後、継代培養を 0~4 回繰り返し、発根培養に移した。初代培養後ただちに発根培養に移した場合、抽だいは 67% であったのに対し、継代培養を 1 回行うと抽だいは 43% と低くなり、2 回以上行くと全く抽だいが観察されなくなった。

Table 1. Effects of temperatures at primary culture on the subsequent bolting of potted *Limonium sinuatum* 'Early Blue'.

Temperature (°C)	No. of observed plant	Bolting (%)	No. of leaves at bolting
20	27	67	27 ± 3 ²
27	8	13	36

The buds of flower stalks were cultured at 20 °C or 27 °C for 4 weeks. The emerging shoots were excised from the clumps of multiple shoots and cultured for 4 weeks on a hormone free rooting medium. The rooted plantlets were transplanted into pots and grown at 20 °C.

² Mean ± standard error.

実験 3. 増殖のための継代培養中における低温処理が抽だいに及ぼす影響

2 回の継代培養を経て増殖した多芽体を分割して増殖培地に置床し、2 °C 4 週間の低温処理を暗黒下で行った。低温処理終了後そのまま 20 °C で 4 週間培養してから、シュートを切り出して発根培養に移した。増殖培地に置床後、低温処理を行わず 20 °C で 4 週間培養してから発根培養に移す区を対照区とした。低温処理を行わなかった苗では 11% しか抽だいたしなかったのに対し、低温処理を行うとすべての個体が抽だいた (第 2 表)。

実験 4. 発根培養中における低温処理が抽だいに及ぼす影響

2 回の継代培養により増殖した多芽体から切り出したシュートを発根培養に移し、20 °C で 4 週間培養した後そのまま暗黒下で 2 °C 4 週間の低温処理を行ってから植え出した。20 °C 4 週間の発根培養後、低温処理を行わずただちに植え出した区を対照区とした。低温処理を行わなかった対照区では全く抽だいたしなかったのに対し、低温処理を行うと 89% が抽だいた (第 2 表)。

実験 5. 低温処理後の継代培養の繰り返しに及ぼす影響

2 回の継代培養を経て増殖した多芽体を分割して増殖培地に置床し、ただちに暗黒下で 2 °C 4 週間の低温処理を行った後、そのまま 20 °C で 4 週間培養した。その後 0~3 回の継代培養を繰り返し、発根培養に移した。低温処理後、継代培養を行わずにただちに発根培養に移して得られた苗では、100% 抽だいたした。しかし、低温処理後増殖のために 1 回継代すると植え出し後の抽だいは 11% と著しく低くなり、2 回以上繰り返すと抽だいが全く観察されなくなった (第 3 表)。

Table 2. Effects of low temperature treatment during subculturing for the multiplication or rooting culture on the subsequent bolting of potted *Limonium sinuatum* 'Early Blue'.

Timing of low temperature treatment	Low temperature treatment	No. of observed plant	Bolting (%)	No. of leaves at bolting
Subculture for multiplication ²	No	9	11	36
	Yes	8	100	21 ± 1 ^x
Rooting culture ^y	No	10	0	—
	Yes	9	89	19 ± 3

² Clumps of multiple shoots subcultured twice were divided into small ones and transplanted on a medium for multiplication. They were subjected to 2 °C for 4 weeks and then 20 °C for 4 weeks. The shoots were excised and cultured on a rooting medium at 20 °C. The rooted plantlets were transplanted into pots and grown at 20 °C.

^y Shoots excised from the clumps of multiple shoots subcultured twice were transplanted on a rooting medium. They were subjected to 20 °C for 4 weeks and then 2 °C for 4 weeks. The rooted plantlets were transplanted into pots and grown at 20 °C.

Control plants received no cold treatment.

^x Mean ± standard error.

Table 3. Effects of repeated subcultures for multiplication after low temperature treatment on the subsequent bolting of potted *Limonium sinuatum* 'Early Blue'.

Replication of subculture	No. of observed plant	Bolting (%)	No. of leaves at bolting
0	8	100	21 ± 1 ²
1	9	11	24
2	9	0	—
3	10	0	—

Clumps of multiple shoots were subjected to 2 °C for 4 weeks. Then they were divided into small clumps and subculturing at 20 °C for 4 weeks was repeated. The subcultured shoots were transferred onto a rooting medium at 20 °C and finally transplanted into pots.

² Mean ± standard error.

考 察

本実験において抽だいた花茎は、いずれも開花に至ったため（データ省略）、抽だいた率は培養苗の開花能力の指標となると考えられた。

実験1において培養温度 20 °C 区で植え出した植物の 67% が抽だいたし、一方、27 °C 区で抽だいた率が下がったことから、培養苗の開花能力は高温下での培養により消失するものと考えられる。また実験2の結果より、20 °C 下で培養した場合でも、増殖のために多芽体の継代を繰り返すことにより開花能力が失われることが示された。

今回の実験1において、20 °C 区よりも 27 °C 区で培養中の生育が早いことが観察された（データ省略）。また、実際の培養苗生産においては、増殖のために継代培養の繰り返しが不可欠となっている。培養温度を高くすることと、継代培養を繰り返すことは、増殖効率を高める点で有利である一方で、これらは培養苗の開花能力を消失させていく原因となっていると考えられる。そこで、増殖のために継代培養を2回繰り返し、開花能力がほぼ失われたと考えられる小植物を用い、培養段階で低温処理を行うことにより開花能力を再付与できないかを検討した。その結果、発根培養に移す直前の継代培養（実験3）あるいは発根培養時における 2 °C 4 週間の低温処理（実験4）が開花能力の再付与に有効であることが示された。しかし、低温処理後再び増殖のための継代培養を繰り返すと、この開花能力が再度失われる（実験5）。これに加えて低温処理後高温で培養することでも開花能力が失われるであろうことは、実験1の結果から類推され、培養器内低温処理は培養の最終段階に行う必要がある。催芽種子に対して低温処理を行った場合、その後冷蔵庫育苗（吾妻・犬伏, 1986; 上山・嶋本, 1997）等を組み合わせることにより、低温の効果が安定する。本研究では、20 °C で発根、順化させることにより低温の

効果の安定化を図っているが、培養器内低温処理を実用技術とするためには、植え出し後の栽培条件についてもさらに検討を進める必要がある。

摘 要

1. スターチス・シヌアータ (*Limonium sinuatum* Mill.) 'Early Blue' の花穂切片を外植体とし、4 週間の初代培養を 20 °C ならびに 27 °C 下で行った後、20 °C 4 週間の発根培養に移し、器外に植え出して 20 °C で栽培した。20 °C 区では 67% が抽だいたのに対し、27 °C 区では 13% にとどまった。

2. 初代培養後、20 °C での 4 週間の継代培養を繰り返し、最後に発根培養を行って植え出したところ、初代培養後ただちに発根培養に移した場合、抽だいた率は 67% であったのに対し、1 回継代培養を行うと抽だいた率は 43% と低くなり、2 回以上継代培養を行うと全く抽だいたが観察されなくなった。

3. 継代培養中に 2 °C 4 週間の低温処理を行い発根培養に移した場合、また発根培養中に同様の低温処理を行った場合、いずれも植え出し後の抽だいた率が著しく高くなった。

4. 継代培養中に 2 °C 4 週間の低温処理を行っても、その後 20 °C で増殖のための継代培養を繰り返すと、植え出し後の抽だいた率が低下した。

5. 以上より、スターチス・シヌアータの培養苗生産においては、高い培養温度や継代培養の繰り返しが培養苗の開花能力の消失を引き起こす原因となること、培養中に低温処理を行うことにより培養苗に開花能力を再付与することが示された。

引用文献

- 吾妻浅男・島崎純一・犬伏貞明, 1983. 種子の低温処理によるスターチス・シヌアータの開花促進について. 園学雑, 51: 464-474.
- 吾妻浅男・犬伏貞明, 1986. スターチス・シヌアータの種子春化苗が高温を受けるときの苗齢と脱春化との関係. 園学雑, 55: 221-227.
- 藤田政良, 1986. スターチス・シヌアータの促成栽培に関する研究 (第2報) 苗冷蔵及び長日処理の開花及び収量に及ぼす影響. 和歌山県農試研報, 11: 13-22.
- 宮本芳樹・藤田政良・藤岡唯志, 1991. スターチスの通気性フィルター利用による培養器内発根同時順化法. 園学雑, 60 (別1): 434-435.
- Shillo, R. 1976. Control of flower initiation and development of statice (*Limonium sinuatum*) by temperature and daylength. Acta Hort. 64: 197-203.
- 上山茂文・嶋本久二, 1997. スターチス・シヌアータのセル成型苗での育苗途中での植物体春化处理が抽だいた開花に及ぼす影響. 園学雑, 66 (別2): 554-555.