

## キク花卉培養による多芽体形成と植物体再生

古 谷 博

キーワード：キク，花卉培養，多芽体，苗化

花き園芸における組織培養技術は、すでにカーネーション等のウイルスフリー苗やラン・観葉植物等のメリクロン苗が実用化されている。近年、他の栄養繁殖性作物においても、組織培養を利用した種苗増殖技術が確立されてきている。

組織培養により植物組織切片から再生植物を得る手法には、不定芽を直接分化させて植物体とする方法と、脱分化してカルスを形成した後に苗条形成を図り、不定芽を生育させ植物体にする方法がある。大量増殖を図る場合には、後者の方が増殖率も高く効率がよい。

しかし、多くの植物でカルスを経て再分化した植物には色々な変異固体が現れることが報告されている。一般的には変異固体は劣悪な形質が現れる場合が多く、再分化前のカルス細胞にすでに変異が起きている場合と、培地に添加した植物ホルモンやその他の成分が変異誘発源として働いていることが考えられる<sup>12,25)</sup>。

キクの組織培養に関する研究は、莖頂<sup>1,5,9)</sup>を始め、小花<sup>7,8,10,18)</sup>、花芽<sup>24)</sup>、花床<sup>20)</sup>、花柄<sup>19)</sup>、花卉<sup>15,20,21)</sup>、莖<sup>2,14)</sup>、葉<sup>2)</sup>の組織切片から植物体を再生し得ることが報告されている。最近では、葉肉プロトプラスト培養系の確立や、その系を利用した植物体再生の報告<sup>3,17)</sup>もある。これら再生植物の中には、体細胞染色体数の増減による花の大きさやモザイク花等の花形変異個体が見られる<sup>7,14,17)</sup>。

そこで、培養によって現れる変異の幅を拡大したり変異個体を効率的に誘起できれば、組織培養を突然変異育種に利用できると考えられる。そのためには培養手法の容易な、しかも、一度に多数の再生植物が安定して得られる培養系の確立が必要である。その一方法として、キクの花弁培養系の確立を目的に一連の試験を行った結果、舌状花弁切片からの多芽体形成ならびに植物体再生について、若干の知見が得られたので報告する。

### 材料及び方法

キクの花弁培養系の確立を図るために行った試験の構成を第1表に示した。また、各試験に共通した基本的な培養方法は以下のとおりである。

供試材料は秋ギクの代表的品種である‘秀芳の力’とスプレーギクの数品種を用いた。培地は全て基本培地に Murashige and Skoog:1962(以下MSと略称)を用いシヨ糖30g/lと所定の植物ホルモンを添加し、pHを5.8~6.0に調整した後、寒天8g/lを加えて融解後、φ18×105mmの試験管に5mlずつ分注して二重のアルミホイルで栓をし、120°Cで15分間オートクレーブ殺菌して使用した。試験規模は1区試験管数10本を基準とし、培養は全て25°C、約3,000 lx、16時間照明の恒温培養器内で行った。

#### 試験1. 花卉培養における莖葉の再分化

キクの舌状花弁から再生個体を効率良く得るため、植物ホルモンの種類と濃度、ならびに舌状花弁の培養部位とその置床方法が莖葉再分化に及ぼす影響について検討した。

秋ギク‘秀芳の力’の季咲きのハウス栽培において外側花弁がほぼ水平に開花した花弁を採取し、70%アルコールに数秒間浸漬後、直ちに流水下で洗い0.5%次亜塩素酸ナトリウム液で15分間振盪殺菌した。その後、滅菌水で3回洗浄し、殺菌済みの眼科用ハサミを用いて培養に供する外植体を作成した。

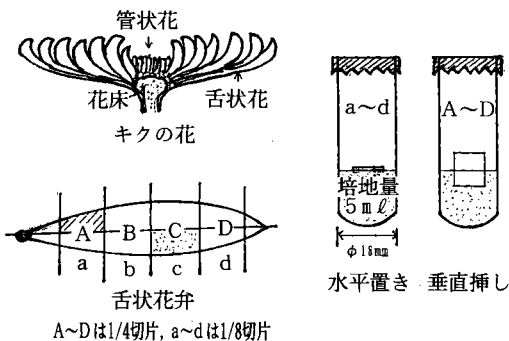
##### 1) 植物ホルモンの種類と濃度

MS培地に添加する植物ホルモンとして、ベンジルアデニン(BA)とナフタレン酢酸(NAA)を使用し、各々2.0、

第1表 試験の構成

試験の構成	試験項目	試験区	供試品種	
試験1 花卉培養における茎葉の再分化	(1) 植物ホルモンの種類と濃度	BA 2.0, 5.0, 10.0mg/ℓ NAA 2.0, 5.0, 10.0mg/ℓ	BA+NAA (9区)	‘秀芳の力’
	(2) 培養部位と置床方法	舌状花卉 1/4切片垂直挿し, 1/8切片水平置き		‘秀芳の力’
試験2 多芽体の効率的形成法	(1) 植物ホルモンの種類と濃度	BA 2.5, 5.0, 10.0mg/ℓ NAA 2.5, 5.0, 10.0mg/ℓ	BA+NAA (9区)	‘ハート’ ‘マーガレットマム’
	(2) 寒天濃度	0, 2, 4, 6, 8, 10g/ℓ		‘ジュム’
試験3 多芽体継代増殖法ならびに苗化法	(1) 多芽体継代培養	BA 2.0+NAA 0.2mg/ℓ, NAA 0.2mg/ℓ, GA 10.0mg/ℓ, ホルモンフリー		‘秀芳の力’
	(2) 苗化培養	MS濃度 1, 1/2, 1/4倍+ショ糖 30, 15g/ℓ Hiponex 1, 2, 3g/ℓ+ショ糖 30, 15g/ℓ		‘秀芳の力’
	(3) 多芽体増殖培養	BA 1.0+NAA 1.0mg/ℓ, NAA 1.0, 0.2, 0.02mg/ℓ, ホルモンフリー		‘ジュム’
	(4) 多芽体の低温貯蔵	温度 2℃ 期間 0, 20, 40, 60, 80, 100日		‘ジュム’

(注) 培地はMSを基本に、ショ糖30mg/ℓ添加、pH5.8~6.0に調整、寒天は試験2(2)以外は8g/ℓ加えた。



第1図 花卉の培養部位及び置床方法

5.0, 10.0mg/ℓを組み合わせで検討した。外植体には舌状花卉の子房を含む約2cmの長さの切片を用い、挿し芽の要領で培地面に置床した。

2) 培養部位と置床方法

BA, NAA各10mg/ℓ添加したMS培地に、次の方法により調整した外植体を置床した(第1図)。長さ約6cmの舌状花卉の先端と基部約1cmの部分を除き、残りを4等分したものをそれぞれの基部に近い切断面を培地面に置床した。この方法を以下「垂直挿し」と略称する。更に、4等分したものを中央で2分割した約1×1cmの大きさの切片を、花卉の表側と裏側の表面がそれぞれ培地面に接するように置床した。この方法を以下「水平置き」と略称する。

### 試験2. 多芽体の効率的形成法

試験1において花卉切片から莖葉が再分化する際、緑色の芽の原基とみられる集塊(以下多芽体と称す)が観察された。そこで、カルスからの多芽体形成に及ぼす植物ホルモン及び寒天濃度の影響について検討した。

スプレーギク品種‘ハート’、‘ジェム’及び‘マーガレットマム’の季咲きハウス栽培において、外側花卉がほぼ水平になった開花時の花卉を採取し、試験1と同様に殺菌して供試した。外植体には舌状花卉の先端と基部を取り除いて約1×1cmの大きさの切片を用いた。

#### 1) 植物ホルモンの種類と濃度

試験1と同様に、MS培地に添加する植物ホルモンはBAとNAAを用い、各々2.5, 5.0, 10.0mg/ℓを組み合わせた9区について検討した。

#### 2) 寒天濃度

BAとNAA各々10mg/ℓを添加したMS培地を用い、寒天濃度0, 2, 4, 6, 8, 10g/ℓについて検討した。

### 試験3. 多芽体継代増殖法ならびに多芽体からの苗化法

秋ギク品種‘秀芳の力’とスプレーギク品種‘ジェム’の花卉切片から形成した多芽体を供試し、多芽体の継代増殖に及ぼす植物ホルモンの影響について検討した。また、継代増殖した多芽体から一度に多数の再生植物を安定して得るために、多芽体からの不定芽の生育(苗化)に及ぼす培地条件について、更に、多芽体の苗化培地へ移植後の低温貯蔵期間が不定芽の生育に及ぼす影響について検討した。

#### 1) 多芽体継代培養

花卉切片カルスから形成した多芽体を、予めホルモンプリーのMS培地に移植して培養を1か月間行った後、BA2.0+NAA0.2mg/ℓ, NAA0.2mg/ℓ, GA10.0mg/ℓ, 及びホルモンプリーの4試験区に約5mmの集塊に分割した多芽体を移植した。約2か月間培養した後、多芽体の増殖ならびに多芽体からの不定芽の生育について調査した。

#### 2) 苗化培養

多芽体からの不定芽の生育と発根に及ぼす苗化培地の無機塩類とシヨ糖濃度について検討した。すなわち、MS培地と1/2, 1/4に希釈したMS培地およびHyponex (Hyponex Company製 6.5-6-19)の1, 2, 3g/ℓ培地とシヨ糖添加量15, 30g/ℓを組み合わせた12試験区を設け、NAA0.2mg/ℓ添加培地で継代増殖した多芽体を約5mm集塊に分割移植し、2か月間培養後の不定芽の生育について調査した。

#### 3) 多芽体増殖培養

花卉由来カルスから形成した多芽体を約5mm集塊(平均生体重180mg)に分割して、BA1.0+NAA1.0mg/ℓ及びNAA0, 1.0, 0.2, 0.02mg/ℓ添加培地に移植し、40日間培養後の多芽体の増殖量を調査した。その後、苗化培地(Hyponex 2g+シヨ糖15g/ℓ培地)に移植して増殖多芽体からの不定芽の生育について調査した。

#### 4) 多芽体の低温貯蔵

低温貯蔵は増殖多芽体をHyponex 2g/ℓにシヨ糖15g/ℓ添加した苗化培地に分割移植し、所定期間2℃の冷蔵庫で行った。その後、25℃の培養室に移して2か月間培養後の不定芽の生育状況について調査した。

## 試験結果

### 試験1. 花卉培養における莖葉の再分化

#### 1) 培地の植物ホルモン組成と莖葉再分化との関係

舌状花卉基部切片の莖葉再分化に及ぼす植物ホルモンの影響について検討した結果を第2表に示した。

BA, NAA各2.0, 5.0, 10.0mg/ℓの組合せで検討した結果、何れの区もカルス形成率は100%であった。しかし、カルスからの莖葉再分化率はNAA2.0mg/ℓ区では低かったが、BA, NAA共に5.0~10.0mg/ℓ区では40~50%と優れた。また、切片当りの不定芽形成数は、すべての試験区で1~2本と少なかった。

第2表 花卉培養の植物ホルモン濃度が莖葉再分化ならびに発根に及ぼす影響

BA mg/ℓ	NAA mg/ℓ	莖 葉 再分化率%	切片当り不 定芽形成数	発根率 %
2.0	2.0	10	2.0	10
	5.0	40	1.5	10
	10.0	40	1.0	10
5.0	2.0	20	2.0	0
	5.0	40	1.3	0
	10.0	40	1.3	0
10.0	2.0	20	1.5	0
	5.0	40	1.5	0
	10.0	50	1.5	0

## 2) 培養部位及び置床方法と茎葉再分化との関係

花卉の培養部位と切片の置床方法が茎葉再分化に及ぼす影響について検討した結果を第3, 4表に示した。

舌状花卉の1/4切片を垂直挿した場合は、切片当たり2~3本の不定芽の形成が見られた。培養部位別では、先端部の方がカルスからの茎葉再分化率が高く、切片当たりの不定芽形成数及び発根率ともわずかによかった。次に舌状花卉の1/8切片を培地に水平置きした場合には、培養部位による差はほとんど見られず、再分化率はどれも80~100%と優れていた。また、45日後の調査時における1cm以上伸長した不定芽数は、いずれの部位とも1切片あたり6~10本と1/4切片より多かった。

培養部位別の不定芽形成数は、基部の方が先端部よりわずかに多い傾向にあったが、カルスからの根の形成率

第3表 花卉の置床方法ならびに培養部位の違いが茎葉再分化に及ぼす影響 (1)

培養部位	茎葉再分化率 %	切片当たり不定芽形成数	発根率 %
A	50	1.8	0
B	70	1.6	0
C	80	3.3	20
D	90	3.3	40

注) 1/4切片垂直挿し、供試品種 '秀芳の力' 培養部位A~Dは第1図参照

第4表 花卉の置床方法ならびに培養部位の違いが茎葉再分化に及ぼす影響 (2)

置床方法	培養部位	茎葉再分化率 %	切片当たり不定芽形成数	発根率 %
花卉の接 地面表側	a	100	7.8	80
	b	100	9.7	70
	c	90	6.0	20
	d	90	6.2	30
花卉の接 地面裏側	a	100	7.3	80
	b	100	7.5	30
	c	100	6.8	50
	d	80	5.8	80

注) 1/8切片水平置き、供試品種 '秀芳の力' 培養部位a~dは第1図参照

は培養部位による一定した傾向はなかった。また、置床方法の違いによる不定芽形成数は、培地に接する面が花卉の表側と裏側との差はほとんど見られなかった。

なお、カルスから茎葉が再生する際、カルスの一部に苗条原基に類似した緑色の芽の集塊(多芽体)を認めた。この多芽体の形成は不定芽の生育に伴い、その基部や培地内にも観察された。

以上の結果、キクの花弁培養は開花時の舌状花卉を約1×1cmの小切片にし、BAとNAAを5.0~10.0mg/ℓ添加したMS培地に水平に置床すれば、1切片から数本の不定芽が発生することが認められた。

## 試験2. 多芽体の効率的形成法

## 1) 培地の植物ホルモン組成と多芽体形成との関係

舌状花卉切片からの多芽体形成に及ぼす植物ホルモンの影響を検討した結果を第5表に示した。

BA, NAA各2.5, 5.0, 10.0mg/ℓの組合わせて試験した結果、供試した2品種ともカルス形成率は100%であった。しかし、カルスからの不定芽形成率は品種により異なった。すなわち、'マーガレットマム'ではBA2.5と5.0mg/ℓ区で33~75%と多かったが、'ハート'ではBA2.5+NAA2.5mg/ℓ区の25%以外は不定芽の形成は見られ

第5表 花卉培養のホルモン濃度が多芽体形成に及ぼす影響

ホルモン濃度		供試品種 'ハート' 'マーガレットマム'			
BA mg/ℓ	NAA mg/ℓ	不定芽 発生率%	多芽体 形成率%	不定芽 発生率%	多芽体 形成率%
2.5	2.5	25.0	25.0	33.3	16.6
	5.0	0.0	28.6	75.0	0.0
	10.0	0.0	28.6	37.5	37.5
5.0	2.5	0.0	62.5	25.0	0.0
	5.0	0.0	75.0	50.0	50.0
	10.0	0.0	57.1	0.0	62.5
10.0	2.5	0.0	75.0	0.0	62.5
	5.0	0.0	100.0	0.0	62.5
	10.0	0.0	100.0	12.5	87.5

なかった。

カルスからの多芽体形成率についてみると、2品種ともBAが5.0mg/ℓ以上の試験区で多かった。NAAについては‘ハート’では2.5mg/ℓ、‘マーガレットマム’は5.0mg/ℓの試験区で、いずれも多芽体形成率50%以上となり、BA、NAA共に10.0mg/ℓ区では88~100%と非常に高かった。

## 2) 培地の寒天濃度と多芽体誘導との関係

BA、NAAとも10.0mg/ℓ添加したMS培地を用い、その培地に加える寒天濃度が多芽体形成に及ぼす影響について検討した結果を第6表に示した。

カルスからの不定芽形成は寒天濃度が低く軟らかい培地ほど早く、しかも生育がよい傾向が認められた。またカルスからの多芽体形成は寒天濃度が6g/ℓ以上の試験

第6表 花卉培養の寒天濃度が多芽体形成に及ぼす影響

寒天濃度 g/ℓ	不定芽及び多芽体形成程度*			
	多	中	少	無
0	12.5	37.5	37.5	12.5
2	25.0	12.5	62.5	0.0
4	25.0	12.5	62.5	0.0
6	0.0	25.5	75.0**	0.0
8	0.0	12.5**	87.5**	0.0
10	0.0	12.5**	87.5**	0.0

注) 供試試験管数に対する割合%、

\*\*印は多芽体、供試品種‘ジェム’

第7表 多芽体継代培養における植物ホルモンが生育に及ぼす影響

試験区	多芽体生育状況*				不定芽伸長		
	植物ホルモン	X	L	M	A	総数	本数/試験管
BA2.0 + NAA0.2mg/ℓ		0	100	0	0	0	0.0
BA2.0 + GA10.0mg/ℓ		30	0	0	70	83	11.9
NAA0.2mg/ℓ		0	10	80	10	2	2.0
GA10.0mg/ℓ		0	0	0	100	164	16.4
ホルモンフリー		10	0	30	60	43	7.2

注) \* 供試試験管数に対する割合%、供試品種‘秀芳の力’

X: 褐変枯死個体, L: 水浸状カルス, M: 多芽体増殖, A: 不定芽伸長

区において見られ、そのほとんどはカルスの表面に直接形成されたが、一部は不定芽の生育に伴い寒天内の不定芽基部にも形成された。

以上の結果、花卉切片カルスから不定芽の伸長を抑え多芽体形成を図るためには、外植体には1×1cm位の小切片を供試してBA、NAA各10mg/ℓと寒天8g/ℓを添加したMS培地に置床すればよいことが分かった。

## 試験3. 多芽体継代増殖法ならびに苗化法

### 1) 多芽体継代培養と培地の植物ホルモン組成との関係

ホルモンフリーで培養した多芽体を継代培地に分割移植し、2か月間培養後の多芽体の生育状況について調査した結果を第7表に示した。

BA+NAA添加区へ移植した多芽体は、全て水浸状カルスとなった。NAA0.2mg/ℓ添加区では多芽体からの不定芽の伸長は見られず、金平糖状の多芽体の形態が維持され、1か月間後にはφ18mmの試験管内一杯になるまでに増殖した。GA10mg/ℓ添加区では試験管当たり15本と多数の不定芽が伸長し、生育も旺盛であった。しかし、伸長した不定芽は軟弱で徒長しており大部分は順化時に萎縮した。また、ホルモンフリー培地では多芽体と不定芽の伸長とが混在した状態にあった。

以上より、花卉由来のカルスから形成した多芽体は、NAA0.2mg/ℓ添加培地で継代培養すれば増殖可能であることが分かった。

### 2) 多芽体からの苗化と培地組織との関係

NAA添加培地で増殖した多芽体から、多くの不定芽を

再生させるための苗化培地について、無機塩類とシヨ糖濃度について検討した結果を第2図に示した。

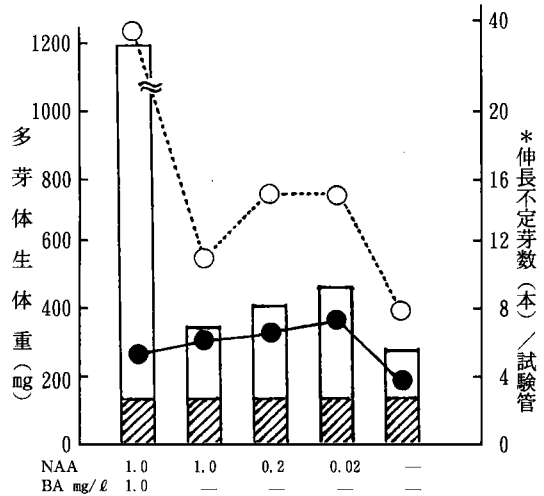
シヨ糖30g/l区では、移植した約5mm集塊の多芽体が褐変枯死するものが少し見られたが、全体的に不定芽の伸長は良好であった。

移植2か月後の試験管当りの順化可能な不定芽数は、培地の無機塩類濃度による差よりも、シヨ糖の添加量の方が影響が大きかった。すなわち、多芽体から伸長した不定芽数はMSの無機塩類やHyponexの濃度による差は殆ど無かったが、シヨ糖添加量は15g/lと標準の半量にした方が多かった。なお、Hyponex 1g/lでは伸長した不定芽の葉色が薄く無機塩類不足と考えられた。また、伸長した不定芽は生育に伴い発根して完全な再生植物となり、その後の順化養成も容易であった。

以上より、増殖した多芽体はホルモンフリーの1/4 MS またはHyponex 2g/lにシヨ糖を15g/l添加した培地に移植して培養すれば、5mm集塊の多芽体から5~6本の不定芽が揃って伸長し、発根した再生植物が得られた。

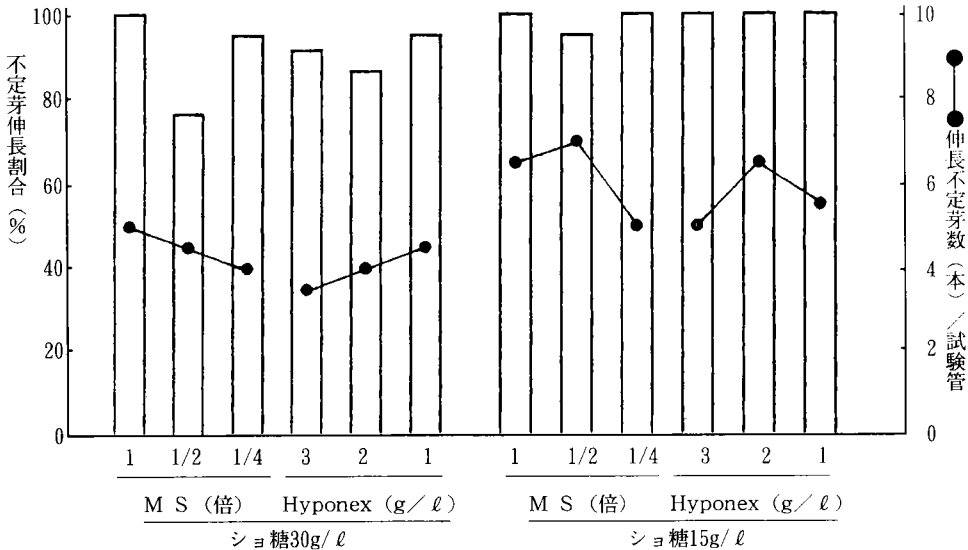
3) 多芽体器内増殖と培地内植物ホルモン組成との関係

多芽体増殖培地の植物ホルモン濃度が、苗化培地に移植後の不定芽の生育に及ぼす影響を検討した結果を第3



第3図 多芽体の増殖に及ぼす植物ホルモンの影響

注) 培養40日後の生体重  
 培養開始時の生体重 (約180mg)  
 \* 苗化培地へ移植3か月後の不定芽生育本数  
 苗化培養の試験管当り  
 多芽体培養時の試験管当り



第2図 多芽体の苗化培地における無機塩類とシヨ糖濃度が不定芽の生育に及ぼす影響

図に示した。

約5mm集塊(平均生体重180mg)の大ききで分割移植した多芽体は、40日間培養後には $\phi$ 18mmの試験管内一杯に増殖した。その増殖率はBA+NAA添加区で6.8倍と高く、1試験管当りの多芽体の生体重は1g以上となった。また、NAAのみ添加区の増殖率は2.0~2.7倍であり、NAA濃度の薄い区ほど多い傾向にあった。しかし、ホルモンフリー区では1.8倍と劣った。

増殖した多芽体をHyponex苗化培地へ分割移植し、2か月後に順化可能な大ききに生育した不定芽本数は、ホルモンフリー区からの移植では試験管当たり4.4本であった。NAA添加区で増殖した多芽体はNAAの濃度による差はなく、いずれも6本とホルモンフリー区よりは多かった。

#### 4)多芽体の低温貯蔵

Hyponex苗化培地へ分割移植して一定期間2°Cで貯蔵した後、25°Cで培養した結果を第8表に示した。

所定期間2°Cで貯蔵した多芽体は貯蔵中には不定芽の伸長は見られなかったが、25°Cの恒温室に移して培養を続けた結果、貯蔵期間による差はなく、全ての多芽体から不定芽が伸長し、2~3か月後には順化可能な大ききに生育した。試験管当りの再生植物は7~9本と、試験した貯蔵期間20~100日間の範囲内では、ほとんど差は見られなかった。また、順化後の生育も冷蔵の影響は見られず順調であった。

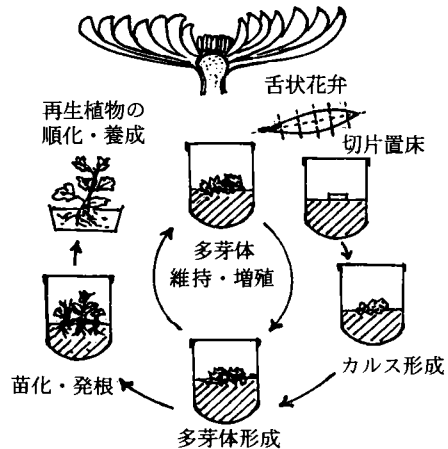
以上の結果、キクの舌状花卉切片から形成した多芽体をNAA添加MS培地で増殖した後、Hyponex苗化培地へ分割移植し多数の再生植物を得る培養系が確立できた(第

第8表 多芽体の低温貯蔵が不定芽形成に及ぼす影響

低温貯蔵日数	不定芽伸長割合* %	順化可能な不定芽本数**
0	100	6.9
20	100	7.7
40	100	7.9
60	100	6.8
80	100	7.7
100	100	6.7

注) 低温貯蔵後、約3か月間25°Cで培養後の調査

\*試験管数、\*\*試験管当たり本数、供試品種‘ジェム’



第4図 キクの花弁培養系模式図

4図)。また、多芽体の低温貯蔵は、その後の苗化に影響ないことが明らかとなった。

## 考 察

### 培養部位と植物ホルモン

キクの組織培養に関する研究は、ウイルスフリー化や大量増殖、また、突然変異育種に関するもの等が多数報告されている。培養部位はその目的から、茎頂、茎片、葉片、花片、小花、管状花、花梗等の組織切片が供試されているが、再分化に対する植物ホルモンの適正濃度は外植体により異なっている<sup>2,7,8,9,10,14,19,21</sup>。

花器組織の培養については、管状花ではBA $10^{-5}$ +IAA $10^{-5}$ mol,あるいはBA 1+NAA 1mg/lによりカルス形成から茎葉が再分化し、多数の再生植物が得られている<sup>7,8</sup>。舌状花卉では、BA 1+IAA 1mg/lで不定芽が形成し<sup>19</sup>、IAA, KIN, BA単独及びIAAを除いた二者の混合培地では、再分化せずIAAを加えることにより植物体の再生が可能である<sup>16,20,21</sup>。

以上の報告では、いずれもサイトカニンとオーキシンとの相乗効果が細胞分裂が促進され、BAにIAAまたはNAAの併用でカルス形成ならびに茎葉の再分化が得られている。NAAは合成オーキシンで植物体内で破壊されにくく、生体内で徐々にオーキシンに変化して長期間植物体内で働くために、IAAなどよりも有効である<sup>19</sup>と考えられ、本試験ではオーキシンとしてはNAAを使用した結果、安定して好成績を得ることができた。

重松<sup>20</sup>は培養に用いる舌状花卉は開花初期の色づいた時が再分化率が高い。また、花卉の基部の方が先端より

再分化率が高く、直接花卉の表皮より芽が分化すると報告している。

本試験では、培養部位として外側花卉がほぼ水平となった開花時の舌状花を供試した。花卉の1/4切片を外植体とした場合は、重松の報告とは反対に先端のほうが再分化率が高く、切片当りの不定芽形成数も多い傾向にあった。しかし、約1×1cmの大きさの1/8切片を外植体とした場合には舌状花卉の培養部位による差は見られなかった。

以上のように、外植体が小さいほど多くの不定芽再生が得られた。これは花卉を小さく切断することによって生じた組織断面積が大きくなり、培地に添加したホルモンが吸収されやすくなるためにカルス形成が旺盛に行われ、多数の不定芽が形成したと推察される。

### 多芽体形成とその増殖

莖頂培養による大量増殖法は、遺伝的に安定なクローン苗を大量に増殖することを目的に、腋芽増殖を促進させ多くの苗状を得る方法として確立され、現在多くの植物で応用されている。

藤野<sup>9)</sup>はキクの莖頂培養において、NAAの量が一定の場合はBAの量が多くなるに従って萌芽率は高く、1切片当りの萌芽数はNAAに対してBA濃度が高い培地で多かったと報告している。また、Jaacov<sup>9)</sup>はKinetin+IAA, Earle<sup>11)</sup>はKinetin+NAAでカルスからの莖葉再生ならびに多芽体形成が盛んに行われると報告しており、今回行った試験のBA, NAA各2.0～10.0mg/lの範囲内ではBA濃度が高い区でカルスからの莖葉再分化率が高く、1切片当りの不定芽形成数も多かったことと一致する。

重松<sup>20)</sup>は花床片カルスから多数の芽の形成を認め、大石<sup>10)</sup>は花卉カルスから再分化した莖葉の多くは、多芽体あるいは集塊状に小さな莖葉が密生し、ホルモンフリー培地へ移植しても発根せず同様な形態を維持して増殖したことを認めている。

本試験においてはBA, NAA各10mg/l添加した寒天8g/lの標準培地で、花卉切片カルスからの多芽体形成が認められた。多芽体は最初カルスから緑色の芽の原基(集塊)が形成し、その集塊を核として周囲に金平糖状の芽の増加が観察された。しかし、寒天濃度が低く軟らかい培地では水浸状の異常莖葉が見られた。

これは、莖頂培養で頂部を下向きに置床するとmultiple shootの形成が抑制されleafy callusのみになったというEarle<sup>11)</sup>の報告と同様な現象とみなされる。すなわち、形成した芽が培地中に埋もれるために、培地中の高濃度の無機イオンや植物ホルモンの影響を強く受ける結果起こることが考えられる。

田中<sup>22)</sup>が発表した苗条原基による大量増殖法は、現在色々な作物で応用されつつある。苗条原基は組織学的には分裂細胞の集塊とみなされる新しい組織体であり、一方で高い増殖能を持ち、他方では栄養体繁殖によって多年にわたり同質な細胞群を作り続けていく能力をもっている<sup>23)</sup>ので、大量増殖法として非常に優れている。

苗条原基が生長点と葉原基の分化が見られない均質な集塊として増殖していくのに対し、本試験において花卉切片カルスから形成した多芽体の形態は、第5図に示したように腋芽と葉の分化発達の見られる苗条が多数集まった金平糖状の小集塊である。また、多芽体は集塊の基部に少量のカルスが付着しており、苗化培地に移植すれば比較的容易に植物体に再生するなど、苗条原基と類似した点が多く認められた。

次に、多芽体を分割してNAA添加培地に移植後培養を続けると、多芽体の形態を維持したまま増殖が可能であった。また、増殖した多芽体は、約5mm集塊に分割してホルモンフリー培地に移植すると一部の多芽体から不定芽の生育が認められた。しかし、BA添加培地では水浸状カルスとなり、GA添加培地では多芽体の多くの芽が伸長した。このことは、植物ホルモンを含まない培地では頂芽優勢が現れ、ホルモン添加培地ではNAAは横方向への移動による腋芽分裂あるいは発達、BAは細胞分裂促進、GAは腋芽の伸長生長促進へと、その生理作用<sup>13)</sup>が働いた結果と考えられる。

### 多芽体の苗化

寒天培地に分割移植した多芽体の生長は、光、温度その他多くの要因の影響を受ける。これらの諸要因の中で培地内の植物ホルモンと無機塩類及び糖濃度の影響が大きいと考えられる。一般に植物ホルモンを含む培地で一定期間培養した植物組織は、その後、ホルモンを含まない培地に移植した場合に不定芽や不定根が形成されることが多い<sup>6)</sup>。

本試験で得られた多芽体もMSの基本にNAA0.2mg/l添加した培地では全く発根は見られなかった。しかしホルモンフリーのMSあるいはHyponex培地へ約5mm大の集塊で分割移植すると、根をもった再生植物を多数得ることができた。この場合、MSの無機塩類濃度を減じるよりも、シヨ糖添加量を標準の半量に減じた方が良好な結果が得られた。Hyponexは1g/lでは再生した莖葉の色が薄く、実用的にはHyponex2g/l+シヨ糖15g/lがよいと判断した。また、多芽体からの不定芽の生育は多芽体を集塊で分割移植した場合、頂芽優性が各腋芽に現れ、その集積効果として多数の不定芽の伸長が起きたと考え



られる。

重松<sup>20)</sup>によると、花卉より再生した幼植物はMS培地では発根が劣るので、Whiteの培地かHyponex培地(Hyponex 1 g/ℓ + ショ糖30 g/ℓ)に移植すると発根が促進される。また、大江<sup>15)</sup>はキクの組織培養個体の水挿し法による順化の効率化を報告している。しかし、本試験における増殖多芽体は前記した苗化培地に移植して培養を続けられ、不定芽が生育すると共に根の形成した再生植物が容易に育成できた。

キクの挿し穂、挿し苗の冷蔵期間は2°Cで40日が限度とされている<sup>11)</sup>。しかし、多芽体は2°Cで100日間の貯蔵を行っても、その後の不定芽の生育に何ら影響なく、多芽体は低温で不定芽の生育が抑えられ暗黒に対しても強いことが認められた。これは深井<sup>4)</sup>の茎頂の低温保存における報告とも一致する。

以上述べたように、キクの花弁切片からカルスを経て多芽体形成を図り、その多芽体の形態を維持したまま増殖し、その後、苗化培地に分割移植すれば再生植物が効率的に多数得られる培養系が確立できた。この培養系の利用により、増殖過程での放射線照射等の変異誘発処理や低温貯蔵中におけるストレス耐性の選抜等への利用が可能と考えられる。

## 摘 要

キクの舌状花弁切片から効率よく再生個体を得るための植物ホルモンと培養条件、また、カルスからの多芽体形成とその増殖及び多芽体からの苗化培養条件について検討した。

1. 舌状花弁の1/8切片、約1×1cmの大きさを外植体として、BAとNAAを各々5~10mg/ℓ添加したMS培地に置床すればカルスが形成され、カルスから切片当り数本の不定芽の発生が認められた。

2. 舌状花弁の培養部位及び置床方法による不定芽の発生数には差は無かった。

3. 花弁切片から形成したカルスに緑色の芽の原基集塊(多芽体)の形成が認められた。

4. 形成した多芽体を約5mm大の集塊に分割し、NAA0.2mg/ℓ添加したMS培地に移植して培養した結果、多芽体の形態を維持したまま増殖できた。

5. 増殖した多芽体は、ショ糖15g/ℓ添加したホルモンフリーのMSまたはHyponex 2 g/ℓの寒天培地(苗化培地)に約5mm集塊に分割移植すれば、完全な再生植物が多数得られた。

6. 苗化培地に分割移植した多芽体を、2°Cで100日間

貯蔵しても、その後の不定芽の再生ならびに生育に影響は見られなかった。

7. 以上から、キクの舌状花弁切片からカルスを経て多芽体形成を図り、その多芽体の形態を維持したまま増殖し、その後、苗化培地に分割移植すれば再生植物が大量にしかも安定して得られる培養系を確立した。

## 謝 辞

本研究の一部は、1989年野菜・茶業試験場依頼研究員として研修中に行った。本試験を進めるに当たり、元農林水産省野菜・茶業試験場川田譲二花き部長(現全農総合営農対策部)から有益な御助言をいただき、同天野正之切り花花き第一研究室長(現生理生態部長)には直接の御指導いただくと共に試験材料について格段の御配慮をいただいた。ここに記して深く感謝の意を表する。

## 引用文献

- 1) EARLE, E. D., and R. W. LANGHANS: 1974. Propagation of Chrysanthemum in vitro. I. Multiple plantlets from shoot tips and the establishment of tissue cultures. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 99(2): 128-132.
- 2) 深井誠一・大江正温: 1986. キクの葉および茎片培養における器官形成におよぼす植物生長調節物質の影響。大阪農技セ研報. 23: 25-31.
- 3) ———・柴田道夫・天野正之・山崎教道・大江正温: 1988/1989. キクプロトプラストからの植物体再生。大阪農技セ研報. 25: 25-30.
- 4) ———・大江正温: 1989. キク茎頂の低温保存。植物組織培養. 6(1): 10-13.
- 5) 藤野守弘・藤岡作太郎・藤村 良: 1972. 茎頂培養によるキクの増殖。兵庫農試研報. 20: 125-130.
- 6) 原田 宏・駒嶺 穆編集: 1989. 植物細胞組織培養。理工学社. 80.
- 7) 市橋万貴子・藤野守弘: 1976. キクの小花培養の利用法。兵庫農総セ研報. 25: 1-6.
- 8) IIZUKA, M., E. MATSUMOTO, A. DOI, R. MADRIGAL and A. FUKUSHIMA: 1973. Tubularfloret of chrysanthemum and cineraria in vitro. Jpn. J. Genet. 48(2): 79-87.
- 9) JAACOV, J. B., and R. W. LANGHANS: 1972. Rapid multiplication of chrysanthemum plants by stem tip proliferation. Hort Science. 7(3): 289-290.
- 10) 鎌田 健・渡辺重吉郎・飯塚宗夫・小杉 清: 1975.

キクの管状花培養と変異性. 園学要旨, 昭50, 春: 306-307.

11) 是松博文・古谷 博: 1977. キク苗の低温処理が開花に及ぼす影響. 広島農試報告, 39: 43-48.

12) KUCKUCK, H., G. KOBABE and G. WENZEL 著 (足立泰二訳): 1987. 植物育種学概説. 講談社, 102.

13) 倉石 晋著: 1976. 植物ホルモン. 東京大学出版会, 142.

14) 宮崎貞巳・田代洋丞・島田恒治: 1976. キクの組織培養(第1報) 器官形成に関する品種間差異. 佐賀大農彙報, 40: 31-44.

15) 大江正温: 1983. キク組織培養株の馴化過程における水挿しの利用. 大阪農技セ研報, 20: 37-40.

16) 大石一史・桜井雍三: 1988. キクの花弁組織からの再分化した個体の変異について. 愛知農総試研報, 20: 278-284.

17) 大塚寿夫・末松信彦・戸田幹彦: 1985. キクのプロトプラスト培養と植物体再分化. 静岡農試研報, 30: 25-33.

18) 小山田高士・高野泰吉: 1981. 無機多量要素の培地

組成がキクの小花培養に及ぼす影響. 名城大農学報, 17: 21-32.

19) ROEST, S., and G. S. BOKELMANN: 1975. Vegetative propagation of *Chrysanthemum morifolium* Ram. in vitro. Scientia Hortic, 3: 317-330.

20) 重松康司: 1975. 草花の放射線照射と組織培養. 遺伝, 29(1): 9-15.

21) ———: 1978. キクにおける花からの個体培養に関する研究(第2報) 個体発生における IAA, Kinetin, BAの影響. 園学要旨, 昭53, 春: 340-341.

22) TANAKA, R., and H. IKEDA: 1983. Perennial maintenance of annual haplopappus gracilis(2n=4) by shoot tip cloning. Jpn. J. Genet. 58: 65-70.

23) 田中隆荘: 1984. 種苗産業と育種技術. シーエムシー, 171-197.

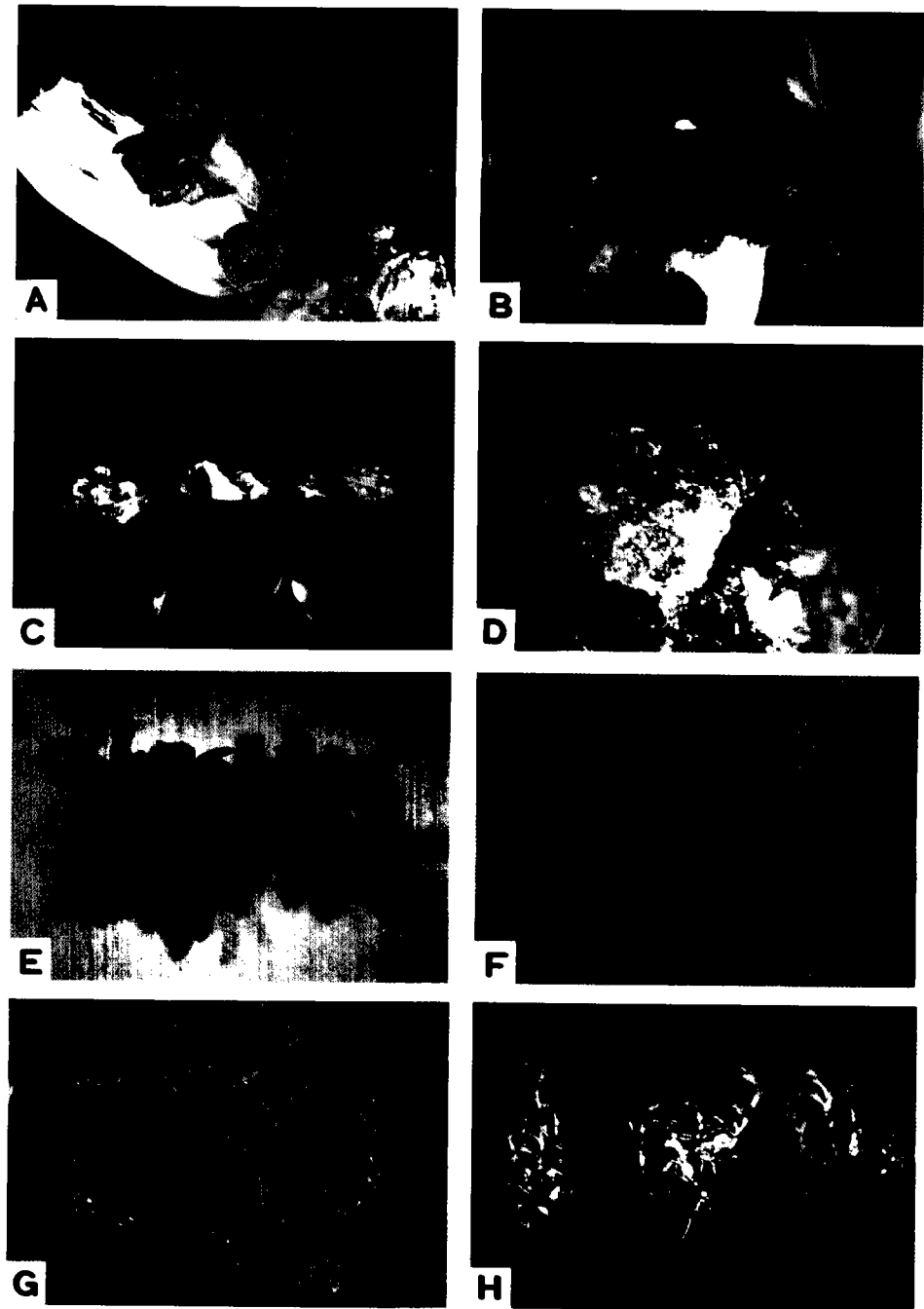
24) TSUKAMOTO, Y. and Y. FUJIME: 1971. Flower bud culture of chrysanthemum in vitro. Jour. Japan. Soc. Hort. Sci. 40(3): 262-267.

25) 若狭 暁: 1982. 植物組織培養の育種への利用. 農技研報, 33: 121-200.

Formation of Multiple Shoots and Regeneration  
from Tissue-Cultured Petal Segments  
in *Chrysanthemum morifolium* Ram.

Hiroshi FURUYA

Key words: chrysanthemum, petal segments culture, multiple shoot, regeneration



A 舌状花弁からの不定芽再生 (花弁基部)      B 舌状花弁からの不定芽再生 (1/4切片)  
C 1/8切片からのカルス形成                      D カルスからの多芽体形成  
E 花弁切片由来多芽体集塊 (多芽体)              F 多芽体の個々の芽の形態  
G 増殖多芽体    H 多芽体の苗化

第5図 キクの花弁切片培養による多芽体形成と植物体再生

