

回転培養を利用した多芽体による園芸作物の大量増殖

田中正美 小代寛正

I 緒言

育成された優良品種は大量に増殖し、早急に普及される必要があるが、その増殖形態は種子繁殖性作物ではF₁種子による場合が多い。一方、栄養繁殖作物では株分けや挿し木等の手段が用いられているが、必ずしも繁殖効率は高くなく、実用性に乏しいものが多い。そこで外植片から多数の植物体を再生する組織培養技術の利用があげられる。^{8) 9) 15)} この組織培養技術は栄養繁殖作物のみならず、雑種性が強く種子では商品品質が安定しない作物やF₁の交配親の維持等において効果的な技術である。また、組織・細胞培養や遺伝子組換え等の培養技術で作られた有用変異の増殖には特に有効と考えられる。さらに、生長点から再分化するため、分化した培養植物はウイルス病等の病害が除去される。

ここでは遺伝的安定性が高い効率的な増殖法として回転培養による苗条原基からの再分化法^{7) 17) 19)}を応用して、本県特産の園芸作物に適用し、多芽体からの再分化法の実用性について検討した。

なお、本培養法は、田中が1984年7月～9月の3ヶ月間、当時の農林水産省野菜試験場育種部育種第1研究室で依頼研究員として研修中に、園芸作物として初めてアスパラガスを対象に試験を開始したことに始まり¹⁰⁾、1989の生物資源部発足と同時に本格的に検討を開始した。ここでは1994年までの結果について報告する。

II 材料及び方法

1. 供試材料

花卉ではシュクコンカスミソウ（プリストルフェアリー）、トルコギキョウ（白扇、紫紺源氏、天竜乙女、アーリーパープル、都紫、源氏の雪、霧の峰、源氏桜）、カーネーション（タクマ、ポートレート、ロマンザ、アリス、タンゴ）、リンドウ（阿蘇晩成）、エゾ系リンドウ、カラー（チルドシアーナ）、野菜ではイチゴ（とよのか）、キュウリ（天馬）、メロン（サンデー春型、ホームランスター）、スイカ（SA75）、カンショ（高系14号）、の11作物23品種を材料に供した。いずれもハウス内で栽

第1表 培地一覧

1. 回転培養用培地							
培地名	基本培地	地名の変更	ホルモバランス		適用作物		
A(NK)	MS		NAA 0, 0.02, 0.2, 2, 4		シュクコンカスミソウ、トルコギキョウ		
			kin 0, 0.02, 0.2, 2, 4		カーネーション、リンドウ、イチゴ		
			25組合せ		キュウリ、メロン類、スイカ、カンショ		
B(NB-1)	MS		NAA 0, 0.02, 0.2, 0.4		シュクコンカスミソウ、トルコギキョウ		
			BA 2, 5		リンドウ、キュウリ、サンデー春型メロン		
			5組合せ		カンショ		
C(NB-2)	MS		NAA 0, 0.02, 0.2, 2, 4		カラー		
			BA 0, 0.02, 0.2, 2, 4				
			25組合せ				
D(NB-3)	MS		NAA 0, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1		カラー		
			BA 0.5, 1, 2, 3, 4				
			8組合せ				
E(NB-4)	MS	1/2組成	NAA 0.02		トルコギキョウ		
		ショ糖10g/l	BA 2	1組合せ	リンドウ、エゾ系リンドウ		
2. 苗条化及び発根培地							
MSまたはHI（ハイボネックス3g）に寒天、ゲルライトまたはカット綿液体の6組合せ							

培された植物体の茎頂または側芽の生長点を1~2枚の葉原基を付けた0.3~0.4mmの大きさに無菌的に切り取り培養した。

2. 回転培養用培地と培養条件

回転培養用培地としては、MS培地 (Murashige and Skoog, 1962) を基本とし、それにNAAとカイネチンおよびNAAとBAの濃度をそれぞれ組み合わせて用いた。一部ではMS組成や糖濃度を改変した培地もあった (第1表)。これらの培地は20mm試験管にそれぞれ5ml分注して供試した。

培養条件のうち、回転数は1分間当たり3回とし、培養温度は23℃または25~26℃、照度は4,000lux、日長は16時間または24時間とした。なお、用いた回転培養装置は日本医科機器社製メリクロン回転培養器LH-500-RDおよびLH-1000-RDである。

3. 継代と苗化および変異の検討

初期培養は作物によって異なり、30日以上、100日程度を目安に形態形成の変化を調査した。2回目以降の継代間隔は基本的には30日とし、形態形成ができた同一組成の新鮮培地に分割して移植し、増殖の程度は継代時に芽の数を数えて調査した。

苗化培地はMS培地またはハイポネックス3gの寒天培地および液体培地を用い、苗条化と発根を促した。発根した植物体は7cmポットまたは50穴のプラグトレーに移植し、ミスト灌水を利用して順化と苗化を図り、成苗率を調べると同時に、サンプルについて変異の発生を決定した。

4. 品種間差異の検討

品種分化の進んだ作物では、数品種を選んで培養反応の違いについて検討した。すなわち、トルコギキョウは白扇他7品種、カーネーションはタクマ他4品種、メロンはネット系のサンデー春型とノーネット系のホームランスターを供試した。

III 結果及び考察

ホルモンバランスのちがいで生長点は異なった器官分化をすることが知られている。²⁰⁾ このホルモンの働きに緩やかな回転を加えて培養すると一定のホルモンバランスで細胞集塊的な組織体である苗条原基と呼ばれる組織を形成する。田中ら¹⁷⁾ によると1年生作物であるハプロパプスの遺伝生理学的な研究を進めるなかでこの栄養体生殖法が見いだされ、この苗条原基は再分化培地上で速やかにシュートを展開して苗条化し、その苗条は

遺伝的に極めて安定し、また、増殖効率に優れることから、茎頂培養に代わってウイルスフリー植物の大量増殖技術として注目されるようになった。¹⁸⁾ しかし、苗条原基の作成は必ずしも簡単でないため、回転培養で苗条原基より容易に形態形成が可能な多芽体からの増殖を試みた。

多芽体は1から4,5枚の幼葉を持つ組織塊であり、約10個以上の芽をもつ組織塊を多芽体とした。多芽体はすでに器官分化が進んでいるため容易に分割ができ、苗条化も簡単である等、産業化を考えたとき苗条原基より有利と考えられる。このような観点から以下の実験を行った。

1. シュクコンカスミソウ

シュクコンカスミソウの大量増殖は生長点を利用した静置培養が多く、⁷⁾ 回転培養による例は少ない。¹⁹⁾ また、回転培養による長期継代はなされていない。ここでは、初代培養、長期継代及び増殖等の一連の技術について、その可能性を回転培養法による多芽体形成について検討するとともに、多芽体からの苗化を試みた。

第2表 初期培養培地のホルモンバランスがシュクコンカスミソウの形態形成に及ぼす影響

NAA濃度 mg/ℓ	kin濃度 mg/ℓ					BA濃度 mg/ℓ
	0	0.02	0.2	2	4	5
0	S	S	S	MS	MS	MS
0.02	S	S	MS	MS C+MS	MS	-
0.2	C+S C+R	S S+R	C+S S+R	MS C+MS	MS	C*+MS
0.4	-	-	-	-	-	C*+MS
2	C+R	C+R	C*	C*	C*	-
4	C+R	C+R	C+R C	C*	C*	-

注) S:シュート C:カルス R:根 MS:多芽体
C*:カルスと多芽体の中間塊 (培養40日目)

1) 初代培養

多芽化は培養開始30日目前後から始まり、40日目には第2表に示すように、オーキシン濃度が低く、サイトカイニン濃度が比較的高い場合に多芽体が形成され、サイトカイニン濃度が高くなると芽の分化が増加し、一部にカルスをまじえた多芽体が形成された。この多芽体は試験管ごとにはぐしてMS培地に植えつけると、約20日目

頃から苗条化をはじめ、65日目の調査では初期培養の多芽体で2~4の節をもち1~5cmの大きさの30~100本の苗条となった(第3表)。

2) 継代と増殖

継代と初期培養で増殖のよかった2種類の培地を用いた。すなわち、NAA濃度が0または0.4mg/ℓでBA濃度が5mg/ℓの培地である。多芽体を2芽ごとに分割し、移植して検討した結果、第4表に示したように継代時の芽数は20個前後となり、NAA濃度が0の培地では6代、NAA濃度が0.4の培地では31代と3年近くにわたって継代を維持することが可能であった。

3) 苗化

初代培養の多芽体は先に述べたように苗条化が容易であった。また、継代した多芽体では、第4表に示したように200本前後の苗条を叢生した。

発根は苗条を1本毎にほぐし、発根培地に移植した結果、25~40日で発根し、カット綿を支持体としたハイポネックス液体培養地で最も発根が優れ、MS培地でみられたビトリフィケーションの発生はみられなかった(第5表)。

順化は発根培地ごとに移植して、活着率、成苗率などを調査したが、ハイポネックス液体培地で育成した株が安定した(第6表)。これは、培地の洗浄が容易であること、カット綿を取り去る必要がないことから根の損傷が少ないためと考えられた。

培養初代の数種の培地で形成した多芽体について、苗化・順化後、15cmの素焼き鉢で栽培した結果、初年目は一部に抽台しない株や草丈に違いがみられた(第7表)。しかし、変異株とみられた株も2年目は抽台し、他と大差ない草丈が観察された。

第3表 初期培養培地のホルモンバランスがシュクコンカスミソウの幼芽数及び苗条化培地での苗条数に及ぼす影響

回転培養培地のホルモンバランス mg/ℓ			移植時 (40日目)		移植後 65日目	
NAA	kin	BA	幼芽数	分割数	苗条数	
0	0		2	1	6	
0	0.02		2	1	2	
0	0.2		3	1	5	
0	2		12	4	28	
0	4		18	5	33	
0.02	0		3	2	8	
0.02	0.02		1	1	2	
0.02	0.2		15	5	41	
0.02	2		14	5	40	
0.02	4		20	5	71	
0.2	0		3	3	10	
0.2	0.02		2	1	8	
0.2	0.2		2	2	8	
0.2	2		16	6	65	
0.2	4		22	6	44	
2	0		C	2	C	
2	0.02		C	2	C	
2	0.2		C*	2	C	
2	2		C*	2	10	
2	4		C*	3	57	
4	0		C	2	C	
4	0.02		C	2	C	
4	0.2		C	3	1	
4	2		C*	3	C	
4	4		C*	4	55	
0			5	20	10	95
0.2			5	23	8	63
0.4			5	21	8	77

注) C:カルス C*:カルスと多芽体の中間塊

第4表 シュクコンカスミソウ多芽体の継代が後代の多芽体幼芽数及び苗条化培地での苗条の増殖に及ぼす影響

培地のホルモン バランス mg/ℓ	NNA	BA	幼芽数 又は 苗条数	継 代 回 数																
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
0.04	5	幼芽数	28	21	20	24	22	24	~	29	24	-	20	-	24	-	24	20	14	
		苗条数	249	222	198	-	-	284		70	265		-		274		260	212	146	
0	5	幼芽数	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32			
		苗条数	24	16	24	20	24	18	23	24	20	-	25	24	-	23 (継続)				
			210	193	-	-	-	-	-	-	-	-	231	-	256					
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	
0	5	幼芽数	32	24	23	26	24	28	~	34										
		苗条数	359	270	268	-	-	326												

注) 7回目は移植せずに60日間継続培養した

第5表 シュクコンカスミソウの多芽体由来苗条からの発根及び生育に及ぼす苗化培地の影響

組成	培地 支持体	供試数	移 植 後 日 数							
			30日目				75日目			
			発根率	発根率	発根程度	展開葉数	草丈	シュー数	カルス程度	ガラス化の有無
MS	0.8%寒天	702	18%	86%	2.1	8	24mm	13	中~大	有~無
MS	カット綿	591	83	93	3.2	6	15	12	中~大	有
HI	0.8%寒天	46	28	92	2.4	9	32	9	中~大	無
HI	カット綿	102	66	98	4.3	18	63	5	小~中	無

注) ガラス化: ビトリフィケーション

第6表 シュクコンカスミソウの苗条の順化及び成苗化に及ぼす苗化培地の影響

組成	培地 支持体	供試数	活着指数				活着度	活着率	成苗率
			0	1	2	3			
MS	0.8%寒天	31	18	5	6	2	0.74	42%	26%
MS	カット綿	38	10	7	14	7	1.29	74	55
HI	0.8%寒天	41	5	15	10	11	1.66	88	51
HI	カット綿	74	5	11	38	20	1.99	93	78

注) 活着指数: 鉢あげ後14日目の生育程度を0~3で調査
 活着度: $\sum nx/3n$ 活着率: $\sum nx/n$
 成苗率: $\sum n(\text{活着指数} \geq 2)/n$

第7表 シュクコンカスミソウ多芽体形成の初期培地が苗化後の変異(抽苔性)に及ぼす影響

初期培養培地のホルモンバランス mg/l	供試数	草 丈 cm										平均値
		0~10~20~30~40~50~60~70										
NAA	kin	BA	株 体 数									
0.02	4	36	1	1	6	7	6	7	7	1	37.1	
0.2	2	10	1		2	2	2	3			39.0	
2	4	20			1	5	5	4	4	1	41.5	
0		5	9		1	3		1	4		41.1	
0.2		5	22	1		7	8	3	3		38.5	
0.4		5	9	1	1		4	1	2		42.5	
合計		106	4	2	8	24	25	18	23	2	38.9	

2. トルコギキョウ

トルコギキョウの増殖は、葉や根から不定芽を形成しやすく、回転培養による増殖法の報告は少ない。^{2) 3)}
⁴⁾しかし、不定芽を経由する葉片や根の培養は変異の可能性が大きいと考えられる。そこでシュクコンカスミソウと同様の手法を用い、8品種について大量増殖を試みた。

1) 初代培養

多芽化は培養開始50日目前後から始まり、70日目には第7表に示すように、NAA濃度が0.02mg/lと低く、カイネチン濃度が0.2mg/l以下の培地とNAA濃度が0.

02mg/lでBA濃度が2mg/lの培地で多芽体が形成された。しかし、サイトカイニンの種類で異なった反応を示し、カイネチンではシュート化後に多芽体化した。BAでは一部にカルスをまじえた多芽体が形成された(第8表)。

第8表 初期培養培地のホルモンバランスがトルコギキョウ(白扇)の形態形成と苗条化培地での苗条数に及ぼす影響

回転培養培地のホルモンバランス mg/l			形態形成		移植後44日目苗条数
NAA	kin	BA	置床後日数		
			30日	90日	
0	0		S	S・MS	30
0	0.02		S	S	2
0	0.2		S	S	4
0	2		D	D	
0	4		D	D	
0.02	0		S・CR	S・MS・R	18
0.02	0.02		C・D	S・MS	30
0.02	0.2		C	C・MS	40
0.02	2		C・D	C	
0.02	4		D	D	
0.2	0		C・D	Ctr	
0.2	0.02		C	C+S	2
0.2	0.2		C	C	
0.2	2		C	C	
0.2	4		C	C	
2	0		C	C	
2	0.02		C	C	
2	0.2		C	C	
2	2		C	C	
2	4		C	C	
4	0		D	D	
4	0.02		D	D	
4	0.2		D	D	
4	2		D	D	
4	4		D	D	
0		5	D		
0.02		2	C	MS	53
0.02 ^{注)}		2	C	MS	46
0.2		5	D		

注) 1/2MS組成にショ糖濃度を10g/lに低減
 S:シュート C:カルス R:根 r:毛根
 MS:多芽体 D:枯死

第9表 トルコギョウ（白扇）多芽体の異なる回転数での継代が後代の多芽体幼芽数及び苗条化培地に移植後の苗条の増殖に及ぼす影響

回転数	幼芽数 又は 苗条数	継 代 回 数																	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
3	幼芽数	21	22	18	19	18	17	20	23	11	20	10	18	16	19	18	20	19	(継続)
	苗条数	148	-	16	-	-	153	-	200	65	162	52	-	-	-	152	-	173	
2	幼芽数									19	12	15	14	(中止)					
	苗条数									169	71	113	70						

第10表 トルコギョウの多芽体形成と継代及び苗条の増殖における品種間差

品 種 名	継 代 回 数								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
白 扇	21	20	18	19	18	17	20	23	11(65)
紫紺源氏	12	-	-	-	16	-	-	-	18(161)
天童乙女	20	-	-	-	18	-	-	-	15(124)
ア-リ-バ-ル	18	-	-	-	15	-	-	-	18(143)
都 紫	12	-	-	-	18	-	-	-	14(119)
源氏の雪	11	-	-	-	10	-	-	-	14(86)
霧の峰	10	-	-	-	14	-	-	-	10(82)
源氏桜	5	-	-	-	7	-	-	-	7(43)

注) 白扇は培養時期が異なる。
試験管当たりの多芽体の幼芽数
()内は苗条化培地での苗条数

形成された多芽体のビトリフィケーションが著しかったので培地組成を半分にし、ショ糖の添加を30gから10gに変更し、NAA濃度を0.02mg/lでBA濃度を2mg/lの培地で検討した結果、ビトリフィケーションはみられなく、より安定した増殖を示した。^{4) 22)}

2) 継代と増殖

継代培地は初期培養で増殖が安定した1/2MS培地を用い、多芽体を2芽ごとに分割、移植して検討した結果、各継代時の芽数は20個前後となり、15代と1年以上にわたって継代を維持することが可能であった。また、回転数を毎分3回から2回に変更して検討したが、増殖に著しい違いは見られなかった(第9表)。

3) 苗化

多芽体からの苗条化は、第9表に示したようにMSゲルライト培地に移植後44日目の調査で、時により変動はあるが、150本程度の苗条を叢生した。

なお、苗化はシュクコンカスミソウと同様の手順で行い、カット綿ハイポネックス液体培地上で50日程度の発根促進後、プラグポットに鉢上げし、ミスト灌水で順化した。

4) 品種間差

供試したいずれの品種も60日前後の初期培養で多芽体

第11表 初期培養培地のホルモンバランスがカーネーションの形態形成に及ぼす影響

NAA濃度 mg/l	kin濃度 mg/l				
	0	0.02	0.2	2	4
0	S+R	S+R	S	MS	D
0.02	S+R	S+R	S	MS	D
0.2	S+R	S+R	S+R	S+R	C・0
2	S+C+R	S+R	C+R	S・0	0
4	C・0	C・C+R	C・0	C・0	0

注) S:シュート C:カルス R:根
MS:多芽体 0:変化のない個体
(培養50日目)

を形成し、約30日間隔で8ヶ月間の継代が可能であった。しかし、多芽体の芽の数は源氏の雪、霧の峰および源氏桜で少なく、特に、源氏桜で10芽以下と劣り、都紫では多芽体の一部がカルス化する傾向が強かった。また、苗化は、増殖のよい品種で120~150本程度、源氏桜では40本程度となった(第10表)。

3. カーネーション

カーネーションのウイルスフリー化は早くから取り組み、ペーパーウィック法による生長点培養技術が定着している。しかし、回転培養による増殖法の報告はみられない。そこで、シュクコンカスミソウと同様の手法を用い、5品種について大量増殖を試みた。

1) 初代培養

多芽化は培養開始30日目前後から始まり、50日目には第11表に示すように、NAA濃度が0.02mg/l以下と低く、カイネチン濃度が2mg/lの狭い範囲で多芽体が形成され、その数も5~7芽と少なかった。

2) 継代と増殖

継代培地は初期培養で安定したNAA濃度が0.2mg/lでカイネチン濃度が2mg/lの培地を用い、多芽体を2芽ごとに分割して供試した。また、増殖率がトルコギョウより劣ったため継代間隔を60日間として検討した

第12表 カーネーション (タクマ) 多芽体の異なる回転数での継代が後代の多芽体幼芽数及び苗条化培地に移植後の苗条の増殖に及ぼす影響

回転数	幼芽数 又は 苗条数	継 代 回 数																
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
3	幼芽数	15	16	16	18	15	11	17	16	16	13	15	16	-	16	-	-	14 (継続)
	苗条数	60	81	72	82	56	-	68	-	84	-	97	-	-	72	-	-	-
2	幼芽数			24	25	20	-	24 (中止)										
	苗条数			142	210	140		180										

第13表 カーネーションの多芽体形成と継代及び苗条の増殖における品種間差

品 種 名	継 代 回 数						
	1	2	3	4	5	6	7
タ ク マ	15	16	16	18	15	11	17(68)
ポ ー ト レ ー ト	14	20	-	16	13	-	16(56)
ロ マ ン ザ	12	10	-	12	14	-	15(41)
ア リ ス	8	6	-	10	-	-	9(33)
タ ン ゴ	10	5	-	7	18	-	10(29)

注) タクマは培養時期が異なる。
試験管当たりの多芽体の幼芽数、
()内は苗条化培地での苗条数

結果、継代時の芽数は15個前後と多くなり、14代と2年以上にわたって継代を維持することが可能であった。また、回転数を毎分2回と低速回転にすると増殖は高まった(第12表)。

3) 苗化

多芽体からの苗条化は、第12表に示したようにMSゲルライト培地に移植後60日目の調査で、40倍程度の増殖本数となった。また、回転数を2回転に遅くした試験では70倍程度の増殖となった。

苗化はシュクコンカスミソウ等より生育むらが多いため、生育の進んだ苗条からハイポネックスゲルライト培地に移植し、約50日程度の発根促進後、プラグポットに鉢上げし、ミスト灌水で順化した。

なお、他の作物で良好な結果を示したカット綿液体培地は、この場合、発根が多く、苗条の生育を抑制した。

4) 品種間差

供試したいずれの品種も40日前後の初期培養で多芽体を形成し、約60日間隔で12ヶ月間の継代が可能であった。多芽体の芽数は品種間差があり、アリス、タンゴで少なくなった(第13表)。

4. その他の花卉類

リンドウ属については、プロトプラスト培養や遺伝子

第14表 初期培養培地のホルモンバランスがリンドウの形態形成と苗条化培地での苗条数に及ぼす影響

回転培養培地のホル モンバランス mg/l			形態形成	苗 条 数	
NAA	kin	BA	置 床 後 40 日 目	移植時	移植後 50日目
0	0		S+R	4	4
0	0.02		S+R	6	8
0	0.2		S+R・S	3	3
0	2		S	2	5
0	4		S・S*	3	11
0.02	0		S+R・S	4	4
0.02	0.02		S+R・S	4	4
0.02	0.2		S+R	4	4
0.02	2		S	3	3
0.02	4		S	1	4
0.2	0		S+R・S	1	1
0.2	0.02		S+R	1	1
0.2	0.2		S	2	2
0.2	2		S	1	1
0.2	4		S	1	1
2	0		C		
2	0.02		C		
2	0.2		C		
2	2		C→R		
2	4		C→R		
4	0		D		
4	0.02		C→R		
4	0.2		C→R		
4	2		C→R		
4	4		C→R		
0		5	C・S	2	2
0.02		2	S+R・S+C	2	6
0.02*		2	S+MS	8	28
0.2		5	C・S	1	1

注) 1/2MS組成にショ糖濃度を10g/lに低減
S:シュート C:カルス R:根 D:枯死
MS:多芽体 S*:不定芽をもつシュート

導入を念頭に省力で、安定した技術の確立を目指した。
また、カラーについても、その可能性について検討した。

1) リンドウおよびエゾ系リンドウ

NAAとBAの組合せで苗条原基の形成がなされた例

第15表 リンドウ及びエゾ系リンドウ多芽体の継代が後代の多芽体幼芽数及び苗条化培地に移植後の苗条の増殖に及ぼす影響

品種名	幼芽数 又は 苗条数	継 代 回 数																	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
リンドウ	幼芽数 苗条数	8 28	6 25	6 26	8 25	4 18	7 21	6 24	6 23	8 (中止) 23									
エゾ系 リンドウ	幼芽数 苗条数	13 41	16 54	16 48	15 45	16 53	13 41	15 40	13 38	12 40	15 -	16 -	15 -	13 46	16 42	18 -	17 58	15 -	14 (継続)

注) リンドウとエゾ系リンドウの培養時期は異なる。

は多い。^{1) 2) 3)}ここでは、NAAとカイネチンの組み合わせで検討したが、多芽体や苗条原基は形成されなかった。また、渡辺ら²⁴⁾が用いた低NAAと高BAの組み合わせでも多芽体の再現はできなかった(第14表)。しかし、トルコギキョウで多芽体が形成されたMS培地の組成を半分にし、糖の添加を10gに変更し、さらに、NAA濃度を0.02mg/lで、BA濃度を2mg/lとした培地で検討した結果、40日の初期培養でリンドウは7~8芽、エゾ系リンドウでは16~20芽の多芽体を形成し、30日間隔でリンドウは9代、エゾ系リンドウは18代以上の継代が可能であった(第15表)。

苗化はシュクコンカスミソウと同様の方法で実施したが、カット綿を支持体としたハイポネックス液体培地で発根が優り、順化も容易であった(第16表)。しかし、発根前に花芽分化した個体は試験管内で開花枯死した。

第16表 リンドウにおけるハイポネックス発根培地の支持体の違いが発根及び順化に及ぼす影響

支持体	発根率 %			順化率 %	
	置床後日数			移植時期	
	10	20	30	4月下旬	8月中旬
カット綿	60	83	100	26/26(100)	81/100(81)
寒天	3	40	83	20/32(63)	21/38(55)

2) カラー

NAA濃度とBA濃度を組み合わせた培地で生長点からの培養を検討したが、多芽体は形成されなかった(第17表)。また、4pu培地で多芽体化した5mm以下の幼球を回転培養で培養するとNAA濃度が0.02mg/l、BA濃度が0.5mg/lの培地で、培養後、40日前後に15個前後の芽をもつ多芽体が形成された。しかし、苗化は不安定で、継代もできなかった(第18表)。

第17表 初期培養培地のホルモンバランスがカラーの形態形成と苗条化培地での苗条数に及ぼす影響

回転培養培地のホルモンバランス mg/l		形態形成		苗条数
NAA	BA	置床後	移植後	
		35日目	60日目	40日目
0	0	0	0	
0	0.02	S	S+R	1
0	0.2	S	S	1
0	2	S	S	1
0	4	D	D	
0.02	0	0	SS	1
0.02	0.02	S	SS	1
0.02	0.2	S	S+R	1
0.02	2	S	S	1
0.02	4	D	D	
0.2	0	S	S+R	1
0.2	0.02	S	S	1
0.2	0.2	S	S+R	1
0.2	2	0	SS	1
0.2	4	0	SS	1
2	0	0	SS	1
2	0.02	S	SS	1
2	0.2	S	P*	
2	2	S	P*	
2	4	S	P*	
4	0	0	SS	1
4	0.02	0	SS	1
4	0.2	S	P*	
4	2	S	P*	
4	4	0	C	

注) S:シュート C:カルス R:根 D:枯死
SS:小シュート P:肥大 0:無変換 *:脱色

第18表 4PU培地で多芽体化したカラー幼芽の継代と形態形成に及ぼす回転培養培地のホルモンバランスの影響

回転培養培地のホルモンバランス mg/l		形態形成		苗条数
NAA	BA	置床後40日目	芽数	移植後60日目
0	1	S+R	3	3
0.01	2	S*	9	
0.02	0.5	MS	16	18
0.02	1	S*	6	
0.05	4	P*		
0.1	1	S+R	2	2
0.1	2	P*		
0.1	3	C		

注) S:シュート C:カルス R:根 D:枯死
MS:多芽体 P:肥大 *:脱色

第19表 初期培養培地のホルモンバランスがイチゴの形態形成と苗条化培地での苗条数に及ぼす影響

回転培養培地のホルモンバランス mg/l		形態形成	苗条数	
NAA	kin	置床後40日目	移植時	移植後30日目
0	0	D		
0	0.02	S+R	2	2
0	0.2	S+R	1	1
0	2	S	2	2
0	4	MS	8	11
0.02	0	D		
0.02	0.02	0		
0.02	0.2	0		
0.02	2	S・C	3	1
0.02	4	S・C	2	2
0.2	0	0		
0.2	0.02	D		
0.2	0.2	D		
0.2	2	S・C	2	2
0.2	4	S・C	1	1
2	0	D		
2	0.02	D・0		
2	0.2	D・0		
2	2	0		
2	4	0		
4	0	D		
4	0.02	D		
4	0.2	D		
4	2	D・0		
4	4	D・0		

注) S:シュート C:カルス R:根 D:枯死
MS:多芽体 0:無変化

5. 野菜類

野菜類については、イチゴ、キュウリ、メロン、スイカ、カンショなど5種類の作物について検討を行った。

1) イチゴ

NAAとカイネチンを組み合わせた培地で検討し、NAA無添加でカイネチンが4 mg/lの培地で多芽体が形成され、シュクコンカスミソウと同様の手順で苗化が可能であったが、順化は容易ではなかった(第19表)。しかし、その後いくつかの報告では、複数のオオキシニンとサイトカイニンを組み合わせた培地を使用し、女峰等で多芽体による増殖が確認されている。^{5) 6)}

2) キュウリ

NAA濃度が0.2mg/l以下でカイネチン濃度が4 mg/lの培地で培養25日目頃から苗条原基様体が形成され始め、NAA濃度が0.02mg/lではカイネチン濃度が0.02 mg/l以上でも苗条原基様体が形成された。しかし、多芽体は形成されなかった。また、苗条原基様体からの苗条はビトリフィケーションがひどく苗化しなかった(第20表)。

第20表 初期培養培地のホルモンバランスがキュウリの形態形成と苗条化培地での苗条数に及ぼす影響

回転培養培地のホルモンバランス mg/l			形態形成		苗条数
NAA	kin	BA	置床後30日目	置床後67日目	移植後27日目
0	0		S	S	1
0	0.02		S	S	1
0	0.2		S	S	1
0	2		S	S	1
0	4		S・SP	S・C	3
0.02	0		S・C+R	C	
0.02	0.02		C	C	
0.02	0.2		C・SP	C	
0.02	2		C・C+SP	C・C+SP	7
0.02	4		SP	SP・MS	6
0.2	0		C	C・C+R	
0.2	0.02		C	C・C+R	
0.2	0.2		C	C	
0.2	2		C	C	
0.2	4		C・C+SP	C・D	
2	0		C	C	
2	0.02		C	D	
2	0.2		D	D	
2	2		D	D	
2	4		D	D	
4	0		D	D	
4	0.02		D	D	
4	0.2		D・C	D・C	
4	2		D	D	
4	4		D	D	
0		5	C	C・D	
0.02		2	C	C・D	
0.4		5	C	C・D	

注) S:シュート C:カルス R:根 D:枯死
MS:多芽体 SP:苗条原基 0:無変化

3) メロン

ネット系ではグリーンパール、ノーネット系ではプリンスを用い、NAA濃度とBA濃度を組み合わせた培地で苗条原基の形成が報告されている。^{11) 12)}ここでは、多芽体の形成を目的に試験を実施した。

ネット系のサンデー春型メロンはNAA無添加でカイネチンが0.02mg/ℓ以下の培地で培養25日目から多芽化した。芽の数は7~13個と少なく、ビトリフィケーションが著しく、継代や苗化はできなかった(第21表)。

ノーネット系のホームランスターでは低濃度のホルモンバランスでシュート化はみられるが、多芽体や苗条原基の形成は認められなかった(第22表)。

第21表 初期培養培地のホルモンバランスがメロン(サンデー春型)の形態形成と苗条化培地での苗条数に及ぼす影響

回転培養培地のホルモンバランス mg/ℓ			形態形成		苗条数
			置床後		移植後
NAA	kin	BA	30日目	77日目	39日目
0	0		MS	MS	8
0	0.02		MS・S	MS	9
0	0.2		S	S	2
0	2		PS・S	PS・D	1
0	4		P	P	
0.02	0		PS+R	PS	2
0.02	0.02		PS+R	PS・PS+R	2
0.02	0.2		PS・PS+R	PS・PS+R	3
0.02	2		P	P・PS	1
0.02	4		PC・P	P・C	
0.2	0		C	C	
0.2	0.02		P	PS・PC	
0.2	0.2		PC・P	PS・P	
0.2	2		C・P	C・P	
0.2	4		C	C	
2	0		C	C	
2	0.02		0	C	
2	0.2		0	C	
2	2		P	C	
2	4		0	C	
4	0		D	D	
4	0.02		D	D	
4	0.2		D・C	D	
4	2		D	D	
4	4		D	D	
0		5	PC	P・C	
0.02		2	0	0	
0.4		5	PC	C	

注) S:シュート C:カルス R:根 D:枯死
MS:多芽体 P:肥厚 PS:肥厚シュート
PC:肥厚カルス 0:無変化

4) スイカ

NAA濃度が0.2mg/ℓ以下でカイネチン濃度が2~4mg/ℓの培地で培養25日目頃から多芽体の形成が見られた(第23表)。しかし、ビトリフィケーションがひどく苗化しなかった。

5) カンショ

供試した培地の範囲内では、70日目までの培養期間内での苗条原基や多芽体の形成は見られなかったが、NAA濃度の低い培地でシュート化した個体は、通常の茎頂培養より生育が早いため、腋芽を利用した増殖体系に利用可能と思われた(第24表)。

第22表 初期培養培地のホルモンバランスがメロン(ホームランスター)の形態形成と苗条化培地での苗条数に及ぼす影響

回転培養培地のホルモンバランス mg/ℓ			形態形成		苗条数
			置床後		移植時
NAA	kin	BA	19日目	37日目	
0	0		S	S	3
0	0.02		S	S	3
0	0.2		S	S	2
0	2		PS+R	PS	4
0	4		PS	PS	3
0.02	0		S・0	S・0	2
0.02	0.02		S+R	S+R	5
0.02	0.2		PS+R	PS+R	3
0.02	2		PS	PS	2
0.02	4		PS・0	PS・D	1
0.2	0		0	D	
0.2	0.02		0	S・0	1
0.2	0.2		S・0	SR・D	1
0.2	2		0	S	2
0.2	4		0	D	
2	0		0	D	
2	0.02		0	D	
2	0.2		0	D	
2	2		0	D	
2	4		0	D	
4	0		0	D	
4	0.02		0	D	
4	0.2		D	D	
4	2		D	D	
4	4		D	D	

注) S:シュート C:カルス R:根 D:枯死
MS:多芽体 0:無変化 PS:肥厚シュート

第23表 初期培養培地のホルモンバランスが
スイカの形態形成と苗条化培地での
苗条数に及ぼす影響

回転培養培地のホル モンバランス mg/l			形 態 形 成		苗条数
NAA	kin	BA	置 床 後		移植後 38日目
			32日目	67日目	
0	0		0・D	D	
0	0.02		S・0	S・0	1
0	0.2		S・0	S	1
0	2		MS・0	MS・D	8
0	4		MS・0	MS+SP	8
0.02	0		0	D	
0.02	0.02		C	D	
0.02	0.2		D	D	
0.02	2		MS	MS・D	8
0.02	4		MS	MS+SP	11
0.2	0		C・0	D	
0.2	0.02		C・0	D	
0.2	0.2		C・D	D	
0.2	2		0・D	MS	10
0.2	4		MS	MS	7
2	0		0	D	
2	0.02		0	D	
2	0.2		D・0	D	
2	2		D・0	0	
2	4		D・0	D	
4	0		D	D	
4	0.02		D	D	
4	0.2		D・0	D	
4	2		D・0	D	
4	4		D・0	D	

注) S:シュート C:カルス R:根 D:枯死
MS:多芽体 SP:苗条原基様体 0:無変化

IV 摘要

花卉類6種(シュクコンカスミソウ、トルコギキョウ、カーネーション、リンドウ、エゾ系リンドウ、カラー)、野菜類5種(イチゴ、キュウリ、メロン、スイカ、カンショ)の計11種類の作物で回転培養による多芽体からの大量増殖の可能性について検討した。

1) シュクコンカスミソウではNAAとBAの組み合わせで、20芽以上の多芽体が形成され、長期間にわたって継代が維持でき、ハイポネックス・カット綿液体培地を利用することで苗化も容易であった。ちなみに、1個の生長点から多芽体をつくり、3回の継代増殖後に苗化すると、約240日で7万本の成苗が得られた。

2) トルコギキョウでは1/2MS培地の糖を10gとし、NAAとBAの組み合わせで、品種によっても異なるが7~20芽程度の多芽体を形成し、継代や苗化もシュクコンカスミソウと同様の手順で可能であった。

3) カーネーションではNAAとカイネチンの組み合

第24表 初期培養培地のホルモンバランスが
カンショの形態形成と苗条化培地での
苗条数に及ぼす影響

回転培養培地のホル モンバランス mg/l			形 態 形 成		苗条数
NAA	kin	BA	置 床 後		移植時
			34日目	70日目	
0	0		0	S+R・D	1
0	0.02		0	S	2
0	0.2		S+C	S+C+R	6
0	2		S+C	S+C+R	4
0	4		S+C	S+C	2
0.02	0		0	S+R	2
0.02	0.02		S+R	S+R	11
0.02	0.2		C	C+R	
0.02	2		S+C・C	S+C+R	6
0.02	4		S+C	S+C	5
0.2	0		C+R・C	S+R・C	1
0.2	0.02		C+R・C	S+R・D	2
0.2	0.2		C	C	
0.2	2		C	C	
0.2	4		C	C	
2	0		0	D	
2	0.02		C・D	C・D	
2	0.2		C	C・D	
2	2		0	0	
2	4		0	0	
4	0		D	D	
4	0.02		D	D	
4	0.2		D	D	
4	2		D	D	
4	4		D	D	
0		5	C	C	
0.02*		2	C・0	S+C・C	4

注) 1/2MS組成にショ糖濃度を10g/lに抵糖
S:シュート C:カルス R:根 D:枯死
MS:多芽体 S*:不定芽をもつシュート 0:無変化

わせで、品種による違いはあるが、継代を60日間隔にすることで10~15個程度の多芽体を形成し、長期の継代が可能であった。また、苗条化したものからゲルライト培地に移植、発根させる方法で苗化が可能であった。

4) リンドウやエゾ系リンドウでは、トルコギキョウと同じ培地で多芽体が形成でき、継代は容易であった。しかし、花芽形成との関係で発根が抑制され、苗化に注意が必要である。

カラーは継代と苗化についてさらに検討が必要である。

5) 野菜類のうち、イチゴはNAAとカイネチンを組み合わせた培地で多芽体を形成し、シュクコンカスミソウと同様の手順で継代、苗化が可能であった。しかし、キュウリをはじめとするウリ類では、多芽体もしくは苗条原基は形成できるものの苗化が困難であり、ビトリフィケーションの克服と器内ハードニングの検討および多芽体を形成しなかったカンショについてはさらに検討する必要がある。

6) シュクコンカスミソウ、トルコギキョウおよび

カーネーションについては、回転培養による多芽体を利用した大量増殖技術として普及現場に技術移転した。

謝辞

本研究の当初から適切にご指導を頂いた当農業研究センター特別研究員新関宏夫氏(平成元年～平成4年)と本報告をまとめるに当たり、適切なる御助言と御校閲を頂いた当農業研究センター農産園芸研究所特別研究員荒武義信氏の両氏に深く感謝します。

V 引用文献

- 1) 天野良彦・西澤秀治・谷口研至・近藤勝彦・西村繁夫(1989) : リンドウの苗条原基法によるクローン増殖 育種学会雑誌39(別2) 112-113
- 2) 深井誠一ら(1987) : トルコギキョウの葉片培養による植物体再生 昭和62年秋 園芸学会発表要旨集 528-529
- 3) 深井誠一ら(1989) : トルコギキョウ組織の培養による大量増殖 第11回 植物組織培養要旨集 95
- 4) 市橋正一(1981) : 組織培養における培地の新しい考え方 新花卉 第110号 115-120
- 5) 宮城県農業センター(1992) : イチゴの苗条原基による増殖法 バイオテクノロジー試験成績概要書 67-68
- 6) 宮城県農業センター(1993) : イチゴの苗条原基による増殖法 バイオテクノロジー試験成績概要書 95-96
- 7) 宮崎県総合農業試験場(1989) : 宿根カスミソウの組織培養による増殖 生物学試験概要集 41
- 8) 森下正博(1985) : 野菜・花きにおける組織培養の利用「野菜の大量増殖と変異」28-33
- 9) 大澤勝治(1988) : 組織培養による種苗の増殖 農業及び園芸 第63巻 第1号 92-98
- 10) 齊藤猛雄(1990) : 苗条原基法 最新バイオテクノロジー全書② 野菜の組織・細胞培養と増殖 農業図書 51-54
- 11) 下西恵・野村幸雄・永井輝行・吉岡啓子・大澤勝次(1989) : メロン苗条原基の継代培養と植物再生能の安定性 育種学雑誌第39巻(別2) 110-111
- 12) 下西恵・野村幸雄・永井輝行・吉岡啓子・大澤勝次(1993) : メロンの苗条原基誘導と植物再生能の維持 植物組織培養 10(1) 17-24
- 13) 静岡県農業試験場(1990) : 宿根カスミソウの組織培養 生物学試験成績書 後-178-179
- 14) 静岡県農業試験場(1990) : トルコギキョウの組織培養 生物学試験成績書 後-175-177
- 15) 高柳謙治(1983) : 組織培養技術の今後の展開方向 - 育種及び種苗の大量増殖への実用化 - 高水準種苗関係技術開発委員会編集 日本種苗協会 -31-
- 16) 高柳謙治・西尾剛・田中正美・藤沢修(1984) : 昭和59年園芸学会(秋季大会)発表要旨、208-209
- 17) 田中隆荘(1983) : 有用一年生植物のクローン化「種苗生産と育種新技術」シーエムシー刊 171-197
- 18) 田中隆荘・谷口研至(1985) : 組織培養技術情報調査報告書「急速大量増殖及びクローン増殖における組織培養技術の応用」36-47
- 19) 谷口研至・田中隆荘(1990) : 苗条原基と大量増殖 バイオホルティ 9-13
- 20) 谷本静史(1981) : 組織培養と植物ホルモン 新花卉 第110号 98-101
- 21) 鳥取県果樹野菜試験場(1989) : 胚様体・苗条原基の利用技術の開発 生物学試験概要集
- 22) 山口隆(1988) : 花き類の栄養繁殖による種苗の増殖 農業及び園芸 第63巻 第1号 87-91
- 23) 山形県立農業試験場(1991) : リンドウの苗条原基誘導条件の解明 平成3年度 生物・情報工学部試験成績概要書 -47-
- 24) 野菜・茶業試験場編(1988) : リンドウの大量増殖技術確立 花き試験研究成績概要集(公立) -近畿・中国・九州- 熊本 8

Summary

Micropropagation through Multiple Shoots of Rotary Liquid Culture in some Garden Crops

Masami TANAKA and Tomomasa SHODAI

Tissue-cultured multiple shoots of garden crop were induced from apical domes of shoot tip in MS liquid medium supplemented with auxin(NAA) and cytokinin(kinectin or BA) in combination by shaking at 2~3 cycles/minute on rotary culture equipment. These multiple shoots subcultured at 30 days cycles on the same fresh medium. Vigorous regeneration of plantlets and root formation was accelerated in MS or hyponex(N:6.5 P:6 K:19) hormone free medium, and acclimation was succeeded some garden crops.