リンドウにおける培養中の花らい形成と植物成長調整剤の添加が生育に及ぼす影響

鈴木誉子^{1*}・菅家文左衛門^{1**}・金浜耕基²・金山喜則²

¹ 福島県農業試験場野菜部 963-8041 郡山市富田町字若宮前 20

² 東北大学大学院農学研究科 981-8555 仙台市青葉区堤通雨宮町 1-1

Flower Bud Formation during Culture and the Effects of Plant Growth Regulators on the Growth of Plantlets in *Gentiana triflora* Pall. var. *japonica* Hara and *Gentiana scabra* Bunge var. *buergeri* Maxim.

Takako Suzuki^{1*}, Bunzaemon Kanke^{1**}, Koki Kanahama² and Yoshinori Kanayama²

¹ Fukushima Prefecture Agricultural Experiment Station, Tomitamachi, Koriyama, 963-8041

² Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, Aobaku, Sendai 981-8555

Summary

Flower bud formation in shoot apex cultures was investigated using vegetative buds from the leafing and dormant stages in *Gentiana triflora* Pall. var. *japonica* Hara and *Gentiana scabra* Bunge var. *buergeri* Maxim. A few plantlets had flower buds 105 days after starting the *in vitro* culture. When buds from the dormant stage were used for the culture, 6% or less of the plantlets had flower buds in all lines. After 165 days, more than 50% of plantlets from buds from the leafing stage had flower buds, while flower bud formation was lower in plantlets from buds at the dormant stage. There were no flower buds found on plantlets from buds at the dormant stage during the culture period in *Gentiana scabra*.

The effects of flower buds and of plant growth regulators on shoot formation were examined using *in vitro* node culture. The growth of shoots at the upper nodes from plantlets with flower buds was poorer than that from plantlets without flower buds. By contrast, shoots at the lower nodes from plantlets with flower buds were rather long. In culture medium containing forchlorfenuron and naphthalene acetic acid (NAA), many shoots formed from the nodal segments of plantlets without flower buds. Plant growth regulators also enhanced shoot formation from the nodal segments of plantlets with flower buds. The lengths of the shoots were similar between plantlets with and without flower buds. These results suggest that plantlets with flower buds are still useful for node culture, especially with the addition of forchlorfenuron and NAA.

キーワード： 越冬芽, ホルクロルフェニユロン, 花らい形成, リンドウ, 植物成長調整剤

緒言

リンドウは遺伝的に固定されていないものも多く、種子繁殖すると均一性の面で問題となることがある。挿し芽や株分けの容易な系統もあるが、この方法では増殖量に限りがある。また、リンドウは自殖劣勢がおりやすいことから、交雑育種を行うためには母本の形質を維持することが重要な課題である。これらの問題を解決することを目的として、リンドウの茎頂培養による増殖法が開発され(佐久間, 1993, 1997), 栽培試験によってク

ローン苗の形態的特性に変異が認められないことも確認されている。現在では、萌芽個体の茎頂培養由来のシュートを利用して、節培養によって増殖する方法が一般的である。しかし、この方法ではエゾリンドウやササリンドウの一部の系統では培養増殖中に花らいを形成し、越冬芽を形成することなく開花後枯死するので、その個体からの増殖ができなくなることがある。すなわち、培養中の開花は増殖効率の著しい低下を招くことから、培養されたリンドウの維持・増殖における問題点の一つとなっている。

佐久間の報告(1993, 1997)の他にも、リンドウの増殖法についてはいくつかの報告がある。たとえば、Yamadaら(1991)はジベレリンとベンジルアデニン(BA)を添加して、腋芽から多数のシュート形成を誘導した。Mončillovićら(1997)は、無菌播種で得られたシュートの節から、BAとインドール酢酸を添加した培地でカルスを

2003年12月9日 受付。2004年6月1日 受理。

本報告の一部は平成11年度秋季大会および平成14年度春季大会で発表した。

* Corresponding author.

E-mail: suzuki_takako_01@pref.fukushima.jp

** 現在: 福島県農業試験場会津地域研究支場

誘導し、カルスから多数のシュートを得た。また Hosokawa ら (1996) は、培養個体の葉、茎、根からチジアズロンとナフタレン酢酸 (NAA) を添加して不定芽を誘導した。Hosokawa ら (1998) は、さらに効率的な増殖法として、節の液体回転培養による大量増殖法を開発した。しかし、これらの報告では、培養中の花らい形成についての観察や、花らいを形成した個体の利用に関する検討はなされていない。

そこで本研究では、自然条件下で開花期の異なる数系統のリンドウから、展葉期に茎頂部を、休眠期に越冬芽を採取して茎頂培養を行い、培養個体の花らい形成について比較した。次いで、茎頂培養開始から花らい形成までの期間が短く、増殖が困難な系統を供試し、節培養に及ぼす花らい形成の有無、節位、あるいはホルクロルフェニユロンと NAA 添加の影響を調べた。

材料および方法

培養方法

生長点を含む茎頂組織を約 3 cm の大きさに採取後、2~3 mm 以上の葉を取り除いて 70% エタノールに 60 秒間浸漬し、次いで次亜塩素酸ナトリウム水溶液 (有効塩素濃度約 1%) で 10 分間殺菌した後、滅菌水で 3 回洗浄した。実体顕微鏡下で、葉原基 1~2 対をつけた生長点部分 (0.5~0.7 mm) を切り取って、寒天培地に置床して茎頂培養を行った。節培養は、茎頂培養個体が 4 節に生育し、発根した後に、節ごとに分割して培養した。茎頂培養および節培養では MS 培地 (Murashige・Skoog, 1962) の無機塩類のみを 1/2 に減じた培地 (ショ糖 3%, 実験 1 では寒天 0.7%, 実験 2 ではゲルライト 0.2% を含む) を用いた。培地は pH を 6.0 に調整した後、121°C で 15 分間滅菌した。培養容器としては試験管 (φ 25 × 100 mm) を用い、培地を 10 ml 注いだ後にアルミホイルで密栓した。培養は 20°C、光合成光量子束密度 $23 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 、18 時間照明下で行った。

実験 1. 展葉期と休眠期に採取した茎頂を培養した個体の生育

福島県農業試験場で維持しているエゾオヤマリンドウ早生交雑系、エゾリンドウ中生交雑系、エゾリンドウ晩生交雑系と開花期間が 10 月に限定されるササリンドウのハイジ選抜系を供試した。展葉期 (4 月 27 日) の萌芽個体と休眠期 (12 月 24 日) の越冬芽から茎頂部を採取し、茎頂培養を行った。培養 105 日後と 165 日後に、草丈、および花らい形成と発根を観察により調査した。展葉期は全系統とも 20 個体ずつ供試し、休眠期は、エゾオヤマリンドウ早生交雑系を 13 個体、エゾリンドウ中生交雑系を 17 個体、晩生交雑系を 27 個体、ササリンドウハイジ選抜系を 10 個体供試した。

実験 2. 花らいの形成と植物成長調整剤が節培養個体の生育に及ぼす影響

福島県農業試験場で維持している伊南村由来のササリンドウ 1 系統を用いた。3 月下旬に茎頂を採取して培養後、節培養を繰り返し、約 1 年 2 か月後に花らいを形成した個体と花らいが認められなかった個体を供試した。次に、この培養個体を節位ごとに分けて所定の培地で節培養を行い、12 週間後に草丈、シュート数、発根数、およびカルス形成を観察により調査した。培地はショ糖 3%、ゲルライト 0.2% を含む MS 培地とし、植物成長調整剤添加区と無添加区を設けた。植物成長調整剤添加区には 1-(2-chloro-4-pyridil)-3-phenylurea (ホルクロルフェニユロン) ($1.0 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$) と NAA ($0.1 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$) を添加した。花らいが認められなかった個体は各区 8 個体ずつ供試し、花らいを形成した個体は各区 4 個体ずつ供試した。

結 果

実験 1. 展葉期と休眠期に採取した茎頂を培養した個体の生育

展葉期と休眠期に採取した茎頂を培養した個体の生育を第 1 表に示した。花らい形成率は、展葉期の茎頂培養個体を 105 日間培養するとエゾオヤマリンドウ早生交雑系

第 1 表 展葉期と休眠期に採取した茎頂を培養した個体の生育

培養期間 (日)	系統	花らい形成率(%)		草丈(mm) ^z			発根率(%)		
		展葉期	休眠期	展葉期	休眠期		展葉期	休眠期	
105	エゾオヤマリンドウ早生交雑系	25	0	21.5	a	22.5	a	55	46
	エゾリンドウ中生交雑系	5	6	24.0	a	22.2	a	70	53
	エゾリンドウ晩生交雑系	5	4	37.3	ab	47.2	a	85	70
	ササリンドウハイジ選抜系	0	0	54.0	b	40.0	a	55	0
165	エゾオヤマリンドウ早生交雑系	50	46	31.3	a	36.3	ab	70	85
	エゾリンドウ中生交雑系	75	12	44.0	ab	32.6	a	90	71
	エゾリンドウ晩生交雑系	75	63	56.3	b	64.1	b	90	81
	ササリンドウハイジ選抜系	60	0	78.3 ^y	c	52.0 ^y	ab	95	100

^a 外植体の下端から最も長いシュートの先端までの長さ

Tukey の多重検定により、展葉期、および休眠期のそれぞれにおける同一培養期間内で異なるアルファベット間には 5% 水準で有意差有り

^y 展葉期と休眠期の間に 5% 水準で有意差有り

では25%で、エゾリンドウ中生交雑系では5%で、晩生交雑系では5%であったが、ササ系リンドウハイジ選抜系では0%であった。165日間培養すると、花らい形成率はすべての系統で50~75%に上昇した。一方、休眠期の茎頂を105日間培養すると、エゾ系リンドウでは全系統とも0~6%であったが、165日間培養すると12~63%に上昇した。しかし、ササ系リンドウでは165日間培養しても0%であった。花らい形成率を展葉期の茎頂培養個体と休眠期の茎頂培養個体で比べると、培養期間にかかわらず同等か、展葉期の茎頂培養個体の方が高かった。特にササ系リンドウでは顕著に高かった。

草丈は、展葉期の茎頂培養個体では、自然条件下における開花期の遅い系統ほど長くなり、エゾオヤマリンドウの早生交雑系とササ系の差は、培養期間105日間では32.5 mm, 165日間では47 mmとなり、草丈の系統間差は165日間でより顕著になった。一方、休眠期の茎頂培養個体については、105日間の培養では、系統間に有意な差は認められなかったが、165日間培養では、4系統のうちエゾ系リンドウの中生と晩生で有意差が認められた。展葉期の茎頂培養個体と休眠期の茎頂培養個体の草丈を比べると、ササ系では明らかに展葉期の方が長かったが、他の系統では明確な差はなかった。

発根率は、展葉期の茎頂培養個体では、105日間培養するとエゾオヤマリンドウ早生交雑系、ササ系リンドウが55%, エゾリンドウ中生交雑系70%, 晩生交雑系85%となった。165日間培養すると全系統で70~95%に上昇した。一方、休眠期の茎頂培養個体は、105日間培養するとエゾ系リンドウでは46~70%であったのに対し、ササ系

リンドウでは0%であった。165日間培養すると全系統で71~100%に上昇した。展葉期の茎頂培養個体と休眠期の茎頂培養個体を比べると、105日間培養では、展葉期の方が高かった。特にササ系では顕著な差があった。しかし、165日になると各系統間とも大きな差はなくなった。

実験2. 花らいの有無と植物成長調整剤が節培養個体の生育に及ぼす影響

花らいを形成した個体としなかった個体を節位ごとに分けて所定の培地で培養し、12週間後の生育を調査した(第2表)。

植物成長調整剤添加区(以下、添加区)では初めに茎下部が肥大し、節部付近がカルス化した。供試したすべての節位においてカルスが形成された。形成されたカルスからのシュート形成数は、花らい有区で2.0~8.6本で、頂部節が最も多かった。花らい無区では10.2~16.5本であった。また、花らいの有無で比べると、花らい無区の方が多かった。一方、無添加区では、花らい有無区ともに節部のカルス化はみられず、腋芽からシュートが1~2本伸長した。草丈は、添加区では、花らい有区で40~57 mm, 花らい無区で40~54 mmとなり、節位間に有意差は認められなかった。一方、無添加区では、花らい有区で29~120 mmと下位節ほど顕著に長くなった。逆に、花らい無区では上位節ほど長くなり、草丈の伸長は花らいの有無で異なる傾向を示した。

発根は、添加区で明らかに劣り、花らい有無区とも1本以下だった。一方、無添加区の花らい有区では0.8~20本で下位節ほど多くなり、花らい無区では逆に上位節ほど多くなった。

第2表 植物成長調整剤処理開始12週間における節培養個体の生育

植物成長調整剤 ² の添加	花らい	節位 ³	草丈 ⁴ (mm)	シュート数 ⁵ (本)	カルス形成率 (%)	発根数 ⁶ (本)
有	有	1	40.0 ab	8.6 abcd	100	0.0 a
有	有	2	50.4 abc	2.0 abc	100	0.2 ab
有	有	3	48.3 abc	2.0 abc	100	1.0 ab
有	有	4	56.5 abcd	2.0 abc	100	0.0 ab
有	無	1	48.5 abc	16.5 d	100	0.9 ab
有	無	2	53.9 abc	15.6 d	100	0.4 ab
有	無	3	46.3 ab	11.6 cd	100	0.6 ab
有	無	4	39.7 ab	10.2 bcd	100	0.0 a
無	有	1	29.4 a	1.6 ab	0	0.8 ab
無	有	2	39.4 ab	1.0 ab	0	3.6 ab
無	有	3	83.3 bcd	1.0 ab	0	7.3 abc
無	有	4	120.0 d	1.0 ab	0	20.0 d
無	無	1	90.7 cd	2.8 abc	0	13.8 cd
無	無	2	76.0 bcd	1.3 ab	0	8.3 bc
無	無	3	68.9 bcd	1.0 a	0	7.8 bc
無	無	4	38.0 ab	1.1 ab	0	4.9 ab

² ホルクロルフェニユロン 1mg・liter⁻¹とNAA 0.1mg・liter⁻¹を添加した

³ 頂部を第1節として上位節から数えた

⁴ 外植体の下端から最も長いシュートの先端までの長さ

⁵ 外植体1個体当たりの平均シュート数

⁶ 外植体1個体当たりの平均発根数

Tukeyの多重検定により、異なるアルファベット間には5%水準で有意差有り

第3表 植物成長調整剤を添加して培養した個体の移植4週後の発根状況

花らい	供試数 (本)	発根率 (%)
無	48	90
有	44	80

添加区で培養した個体の移植後の発根率を第3表に示した。添加区においてカルスから形成されたシュートを1/2MS培地に移植したところ、移植4週間後の調査で80%以上の高い発根率を示した。

考 察

実験1では供試した4系統は、培養期間が105日間では花らい形成率は低く抑えられた。特に休眠期の越冬芽の茎頂を用いると、すべての系統で花らいがほとんど形成されなかった。培養期間が165日間に延びると、越冬芽由来の個体でも、系統によっては50%以上が花らいをもつようになったが、今回用いた4系統中3系統での花らい形成率は50%以下であり、ササ系では全く花らいがみられなかった。越冬芽由来の培養個体の生育は、ササ系の105日における発根を除いて、問題のないレベルであった。また、そのササ系も、165日にはすべての個体が発根していた。したがって、増殖のための培養個体における花らい形成を回避するには、越冬芽を用いることが好ましいと考えられる。

これまで、培養個体の開花についての報告は、エゾ系が中心であった。一方ササ系では、自然条件下での開花が極めて遅いことや、培養の経験上から、試験管内での花らい形成は生じにくいといわれてきた。しかし、今回、長期間培養を続けることで半数以上の個体に花らいが形成されたことから、ササ系においても、培養系での維持・増殖を行う際、花らい形成に留意する必要があると考えられる。

各系統の自然条件下での開花期は、エゾオヤマリンドウ早生交雑系で7月上旬、エゾリンドウ中生交雑系で8月上旬、エゾリンドウ晩生交雑系で8月中旬、ササリンドウハイジ選抜系で10月上旬である。本研究では、培養開始後105日での花らい形成率は母植物の開花期の早晩生を反映しているようにみえたが、165日ではそのような傾向はみられなかった。従って、母植物の開花期の早晩生は培養個体における花らい形成の早さとは無関係であると考えられる。なお、エゾリンドウの花芽分化開始時期は、岩手県の内陸平坦地では5月下旬頃であり(吉池, 1992)、福島県の気温を考慮しても、茎頂を採取した4月下旬には花芽分化は始まっていないと考えられる。したがって、本研究における培養個体は、いずれも培養条件下で花芽が分化したと考えられる。

実験2では展葉期の茎頂培養個体を節培養に用い、花ら

い形成個体の増殖の可能性等を探った。その結果、植物成長調整剤(以下、植調剤)を与えない場合、上位2節の培養において、花らいの有無が大きな影響を及ぼした。すなわち、花らい有個体由来の節培養個体の草丈と発根数は、花らい無個体に大きく劣っていた。したがって、これまで知られているように、花らい有個体の増殖には困難が伴うようであるが、下位節由来の個体の成長をみると、花らい有個体の方がむしろ優れていた。花らい有個体でも下位節を用いることで増殖は可能であるが、下位節は上位節に比べるとシュート形成数が少なく、節ごとにほぼ1本に限られる。

次に、植調剤を添加した場合には、花らいの有無にかかわらず置床したすべての節でカルスが形成され、そこから多数のシュートが発生した。発生シュート数は花らい無個体で多かったが、花らい有個体からのシュート数も、頂部節で8.6本に達した。草丈も花らいの有無や節位による有意差は無く、得られたシュートは十分に増殖個体として利用し得ることが明らかになった。形成されたシュートは植調剤を抜いた培地に移植すると容易に発根したため、NAAとホルクロルフェニユロンの処理は、花らいを形成した個体の増殖に有効であると考えられた。

また、一度花らいを形成した個体を材料として、植調剤を添加しない通常の節培養によって節から発生するシュートは、花らいを形成しやすい傾向にある。しかし、植調剤を添加すると形成されるシュート数は、花らい有区は花らい無区よりも少なくなるものの、それぞれから形成されたシュートの生育に大差はみられず、順化後の生育も両区ともに良好であった。この理由としては、植調剤を添加して誘導されたシュートは、一度脱分化した組織から誘導されているため、シュートのエイジングが等しくなること等が推察された。

発生シュート数は、花らいの有無や植調剤の添加の有無にかかわらず上位節ほど多い傾向がみられた。また、植調剤の添加区では、花らい無区でのシュート形成数が、花らい有区より明らかに多かった。

ヒメサユリでは、葉片(Niimi・Onozawa, 1979)、花被片、花糸および花柱の各器官は基部側からの切片が高い子球形成率を示す(新美・渡辺, 1982)。一方、外植片当たりの子球数は葉片では基部側ほど多く(鈴木ら, 1991)、茎では頂部付近ほど多くなる(新美・渡辺, 1982; 鈴木ら, 1991)。生育ステージで比較すると、茎葉では萌芽3週後の子球形成率が最大となり(佐藤・武田, 1990)、開花後には子球形成はみられない(Niimi・Onozawa, 1979; 鈴木ら, 1991)。このように、外植体の器官形成能が植物体の生育ステージや外植体上での位置によって異なることが報告されており、本実験の結果もこれを支持するものである。

リンドウの培養技術は、F₁品種の母本の維持・増殖と栄養系品種の増殖に利用される。特にF₁育種における交

配母本では自殖劣勢化が進み、越冬芽の採取が困難になる場合がある。本研究で示されたように、系統によって試験管内での花らい形成のしやすさに差異がみられるものの、長期の維持・増殖では花らい形成とそれに伴う枯死が避けられない可能性がある。その際、ホルクロルフェニユロンと NAA の利用で維持・増殖が可能になると考えられる。なお、植調剤添加区で形成されたシュートはカルス経由のため、培養変異の有無について確認の必要があり別途検討する予定である。

摘 要

開花時期の異なるエゾ系リンドウ 3 系統とササ系リンドウ 1 系統を供試し、展葉期と休眠期の茎頂培養個体の花らい形成について検討した。次いで、節培養に及ぼす花らいの有無、節位、あるいは NAA とホルクロルフェニユロン添加の影響を調査し、花らい形成個体の増殖の可能性を検討した。

展葉期および休眠期由来の培養個体において、培養期間が 105 日間では花らい形成率は低く、特に越冬芽を用いると全系統で 6% 以下となった。培養期間が 165 日間に延びると、展葉期由来の個体の花芽形成率はいずれの系統でも 50% 以上となったが、休眠期由来の個体では、エゾ系リンドウの 3 系統中 2 系統で 50% 以下であり、ササ系リンドウでは全く花らいがみられなかった。節培養において植物成長調整剤を与えない場合、花らい有個体上位節での草丈と発根数は、花らい無個体に比べて大きく劣った。しかし、下位節由来の個体の成長は、花らい有個体由来の方がむしろ優れていたもので、花らいを形成しても、下位節を用いることで増殖は可能であると考えられた。NAA とホルクロルフェニユロンの添加によって、置床したすべての節でカルスが形成され、そこから多数のシュートが発生した。発生シュート数は花らい無個体由来で多かったが、花らい有個体由来からのシュート数も、頂部節で 8.6 本に達した。草丈も花らいの有無や節位による有意差は無く、得られたシュートは十分に増殖個体として利用し得ることが示された。

引用文献

Hosokawa, K., M. Nakano, Y. Oikawa and S. Yamamura.

1996. Adventitious shoot regeneration from leaf, stem and root explants of commercial cultivars of *Gentiana*. Plant Cell Rep. 15: 578-581.
- Hosokawa, K., Y. Oikawa and S. Yamamura. 1998. Mass propagation of ornamental gentian in liquid medium. Plant Cell Rep. 17: 747-751.
- Momčilović, I., D. Grubišić and M. Nešković. 1997. Micropropagation of four *Gentiana* species (*G. lutea*, *G. cruciata*, *G. purpurea* and *G. acaulis*). Plant Cell Tiss. Org. Cult. 49: 141-144.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497.
- Niimi, Y. and T. Onozawa. 1979. *In vitro* bulblet formation from leaf segments of lilies, especially *Lilium rubellum* Baker. Scientia Hort. 11: 379-389.
- 新美芳二・渡辺宏和. 1982. 組織培養によるヒメサユリ (*Lilium rubellum* Baker) の繁殖, 特に茎節片の子球形成について. 園学雑. 51: 344-349.
- 佐久間光子. 1993. 組織培養によるリンドウの大量増殖. p. 258-259. 園芸学会東北支部編集. 東北の園芸資源. その特徴と新技術. 園芸学会東北支部. 秋田.
- 佐久間光子. 1997. 草花類の培養苗生産. リンドウ. p. 513-515. 農業技術体系. 花卉編 5. 育種・苗生産・バイオ活用. 農山漁村文化協会. 東京.
- 佐藤光子・武田敏昭. 1990. 組織培養によるヒメサユリの子球増殖とその利用技術の確立に関する研究. 1. 器官, 特に葉片培養法による子球形成. 福島農試研報. 29: 79-85.
- 鈴木蒼子・鈴木政行・菅家文左衛門. 1991. 組織培養におけるヒメサユリの部位別子球形成. 福島農短大研報. 2: 1-5.
- Yamada, Y., Y. Shoyama, I. Nishioka, H. Kohda, A. Namera and T. Okamoto. 1991. Clonal micropropagation of *Gentiana scabra* Bunge var. *buergeri* Maxim. and examination of the homogeneity concerning the gentiopicroside content. Chem. Pharm. Bull. 39: 204-206.
- 吉池貞蔵. 1992. 生理・生態的特性. p. 68-72. 吉池貞蔵編著. 花専科・育種と栽培. リンドウ. 誠文堂新光社. 東京.