

キクの葉片培養におけるカルスの生長と器官形成におよぼす糖の影響

深井 誠 一

大阪府農林技術センター
(〒 583 羽曳野市尺度442)

(1986年3月14日受付)

(1986年5月2日受理)

キクの葉片培養におけるカルスの生長と器官形成におよぼす糖の影響を検討した。カルスの生長は、4%マルトース単独または2%マルトースと2%のシュクロース、フラクトース、グルコース、ラフィノースのいずれかが培地に添加された区で優った。カルスの生長に対するシュクロースとマルトースの最適濃度はともに4%で、シュートの形成には4%シュクロースが有効であったが、マルトースはいずれの濃度でも有効ではなかった。2%シュクロースではBA 2.0または5.0mg/lとNAA 0.5または1.0mg/lの組み合わせで、4%シュクロースではBA 0.1~5.0mg/lとNAA 0.5または1.0mg/lのより広い組み合わせでシュートの形成が高まったが、8%シュクロースではいずれのホルモン濃度でもシュートの形成は抑制された。

1. 緒言

わが国の主要な生産花きであるキクは、栄養繁殖性のためウイルス罹病が問題となり、ウイルスフリー化を目的とした茎頂培養が検討されすでに実用化している。一方近年になり、プロトプラストの培養や細胞選抜による新しい育種の方法が注目を集め、キクに対する応用の検討も行われ始めた¹⁾。

これらの技術はカリクロンを前提としているが、大澤ら²⁾が指摘するように既往の茎頂培養の研究では、茎頂からいかにスムーズに幼植物体を導くかに重点が置かれている。このためキクにおいても、カルスの継代条件や高率に幼植物体を導く条件等の検討はかならずしも十分ではない。特に培地に添加する糖の影響についてはほとんど検討されていない。

そこで本報ではキクの葉片培養において、カルスの生長および器官形成におよぼす糖の種類と濃度の影響、植物ホルモン(BA, NAA)との相互作用について検討した。

2. 材料および方法

(1) 培養片の調製方法

培養母株にはキク品種“秀芳の力”を用い、最低8°Cのガラス室で栽培し、深夜4時間の光中断を行って常に栄養生長を維持した。栽培期間中(1984. 10~1985. 10)、新しい茎葉を出させるため度々ピンチを行った。培養には最上展開葉ならびに2, 3番目の若い葉を用い

いた。採取した葉は、水洗の後70%エタノールに15秒間、次亜塩素酸ナトリウム5倍液に10分間浸漬し、その後滅菌水ですすいで培養に供した。培養片は、主要な葉脈を含まない5×5mmの葉片とし、四方の切断面が培地にふれるようにわずかに沈めて置床した。

(2) 培養条件

培地は、ムランゲ・スクーグの無機塩類全量とホルモンおよび糖を除く有機物全量に、葉酸 0.5mg/l, ビオチン 0.05mg/l, BA 0.1mg/l, NAA 1.0mg/l 加えたものを基本とし、所定の糖類を加えた。糖類はすべて和光純薬工業の特級試薬を用いた。4%シュクロースを含む培地をフィルター滅菌またはオートクレーブ滅菌して比較したが、カルスの生長に差が見られなかったため、以下の試験ではすべて培地に糖類を加えた後pH 5.7に調整し、寒天 8g/l を加えてオートクレーブ(120°C, 15分)にかけた。

置床後は、25°C 恒温, 1,200~1,700 lux, 24時間照明下で培養した。なおカルスの生長は光条件によって大きく異なるので、同一試験は同一培養棚で行った。試験区は1区10本とし、置床後60または90日後にカルス形成の有無、色、新鮮重、シュートおよび根の形成の有無と形成数を調査した。

(3) 試験の方法

試験I. 糖の種類の影響

基本培地に、4%シュクロース、グルコース、フラクトース、マルトース、ラフィノース、アラビノース、キシロース、ラクトース、ガラクトース、ラムノースを各々加えた10種類の培地に葉片を置床し、60日後に調査を行った。

試験Ⅱ. 2種類の糖の共存の影響

2%シュクロースを加えた基本培地に、試験Ⅰで用いた各糖類をさらに2%ずつ加えた10種類の培地に葉片を置床し、60日後に調査を行った。さらに試験Ⅰでカルスの生長のよかったマルトース、グルコース、フラク

ース、ラフィノースを2種類ずつ各々2%加えた培地も同時に検討した。

試験Ⅲ. シュクロースおよびマルトースの濃度と浸透圧の影響

基本培地に 0, 2, 4, 8, 16%のシュクロースまたはマルトースを加えた培地および2%シュクロースと0, 1, 2%マンニトール、4%シュクロースと0, 2%マンニトール、8%シュクロースのみを加えた培地に葉片を置床し、60日後に調査を行った。

試験Ⅳ. BA, NAA との相互作用の影響

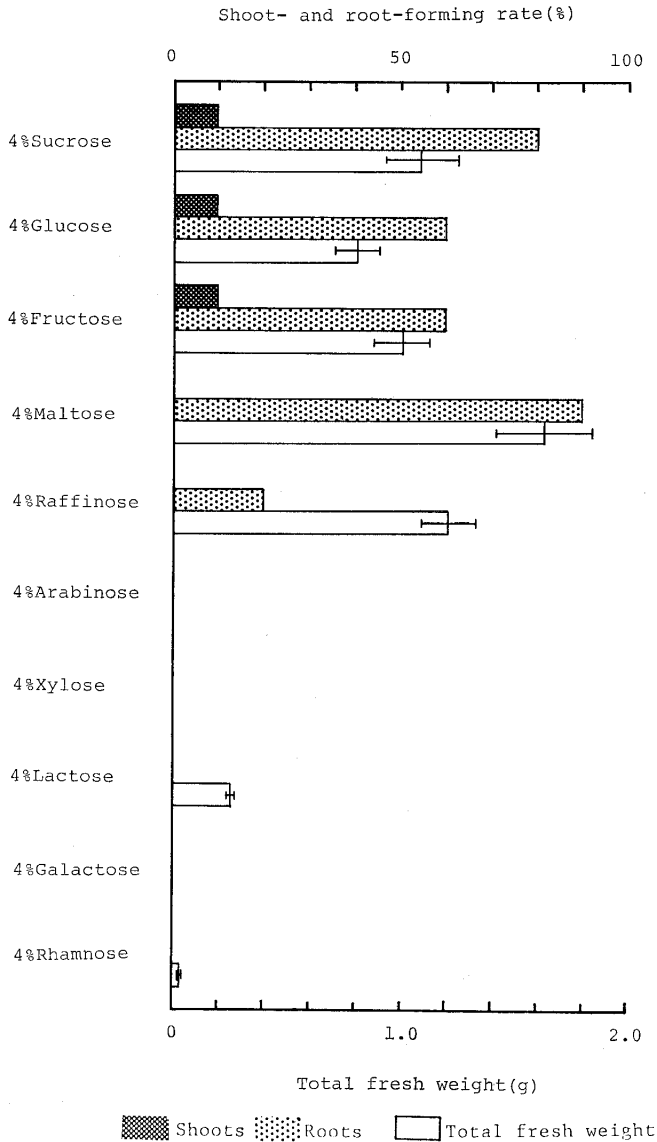


Fig. 1. Effects of sugar for callus and organ formation from leaf segments of chrysanthemum.

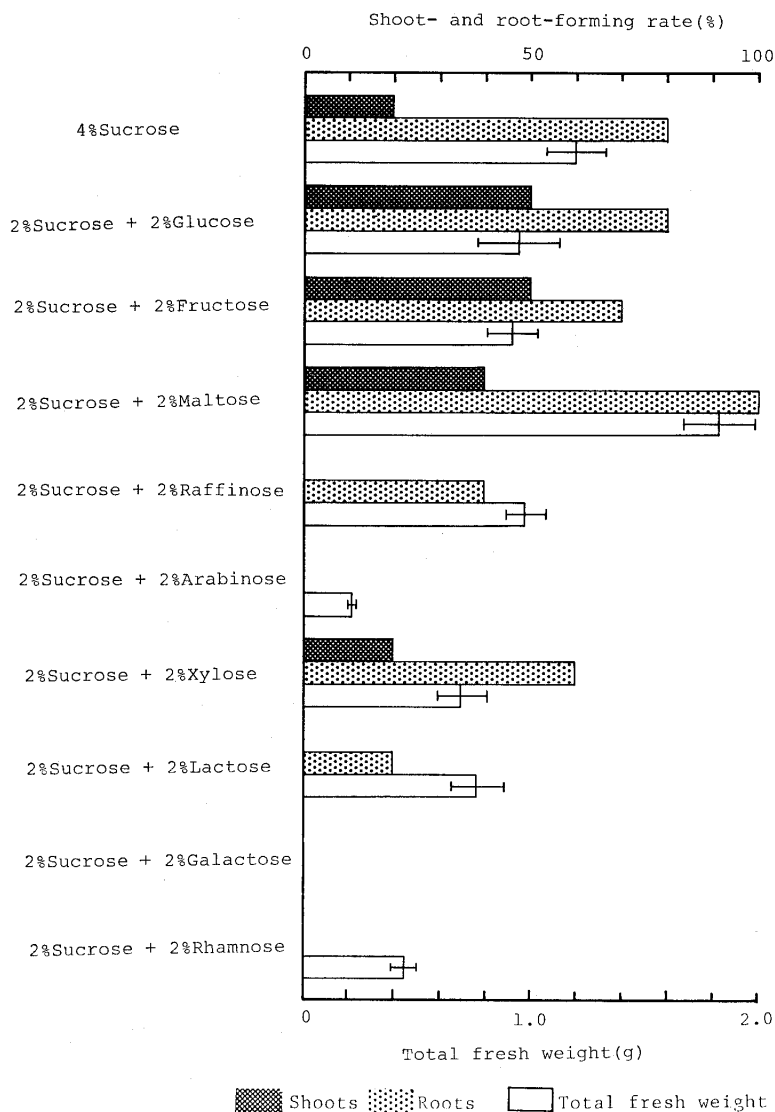


Fig. 2. Effects of combination of sucrose and other carbon sources on callus and organ formation from leaf segments of chrysanthemum.

BA (0.1, 1.0, 2.0, 5.0mg/l) と NAA (0.5, 1.0 mg/l) を組み合わせた 8 とおりの培地に, 2, 4, 8% のシュクロースを加え合計 24 とおりの培地に葉片を置出し, 90 日後に調査を行った.

3. 結果と考察

(1) 糖の種類の影響

供試した 10 種の糖類のうちシュクロース, グルコース, フラクトース, マルトース, ラフィノース区で葉片の全縁より旺盛な緑色の堅いカルスの形成が見られ, ラクトース, ラムノース区でわずかにカルス化した, アラビノース, キシロース, ガラクトース区ではまったく

カルス化せず褐変枯死した (Fig. 1). カルスの生体重量は, マルトース区が最も重くラフィノース, シュクロース, フラクトース, グルコース区の順で, カルスからの発根はラフィノース区以外でさかんであった. シュートの形成は, シュクロース, グルコース, フラクトース区で見られた.

培地に炭素源として加えて有効な糖は, シュクロース, グルコース等であるとされている^{3,4)}. しかし, カルスの生長が最もさかとなる糖の種類は植物の種によって異なり, イネの根由来のカルスではグルコースが⁵⁾, リンゴのカルスではソルビトールがよいとされ⁶⁾, キク

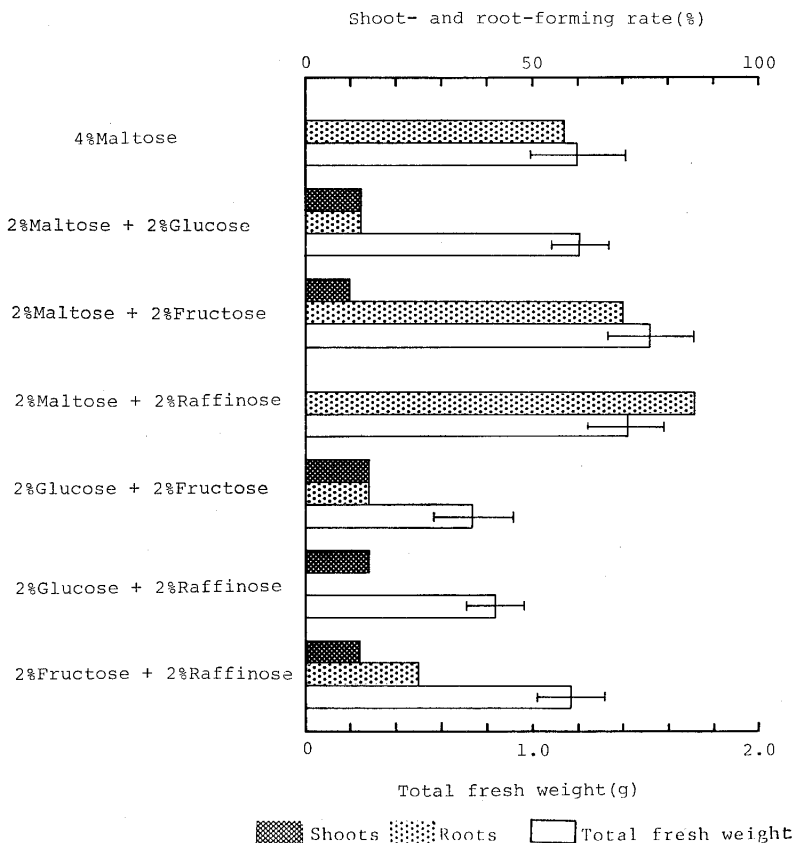


Fig. 3. Effects of combination of maltose, glucose, fructose and raffinose on callus and organ formation from leaf segments of chrysanthemum.

の葉片からのカルスの生長にはマルトースが他の糖類より優った。また同じキクでも茎頂培養では、2%シュエクロースのかわりに2%マルトースを用いるとまったくカルスの形成およびシュートの発達が見られず(未発表)、培養部位によっても利用できる糖の種類が異なることがうかがえた。

(2) 2種類の糖の共存の影響

2%シュエクロースと試験Iで供試した糖類を各々2%ずつ培地に共存させると、ガラクトースを除く8種の糖類で緑色または緑色・褐色モザイクの堅いカルスの形成が見られた(Fig. 2)。特に2%シュエクロース+2%マルトース区は4%シュエクロース単独よりカルスの生長が旺盛であった。また試験Iと比べて、2種類の糖を共存させた方がカルスからのシュートまたは根の形成がさかんとした。

2%のマルトース、グルコース、フラクトース、ラフィノースを各々2種類ずつ培地に共存させた場合、いずれの組み合わせでも旺盛な緑色または緑色・褐色モザイク

の堅いカルスの形成が見られた(Fig. 3)。特にマルトースを組み合せの一方に含むとカルスの生長がよく、グルコースとの組み合わせ以外でカルスからの発根もさかんであった。

(3) シュエクロースおよびマルトースの濃度と浸透圧の影響

0~16%のシュエクロースを含む培地でのカルスの生長は4%区が最もよく、8%、2%区の順で、16%区では明らかに抑制され、0%区ではほとんどカルス化しなかった(Fig. 4)。またシュエクロース濃度が高いほど根の形成率、数ともに増加した。シュートの形成は、2%、4%区で見られたが、0%、8%、16%区では見られなかった。

0~16%のマルトースを含む培地では、カルスの生長はシュエクロースと同様に4%区で最もよく発根も同様の傾向であったが、シュートの形成はどの濃度でもまったく見られなかった(Table 1)。

培地に添加する糖の種類が培養組織からのシュートの

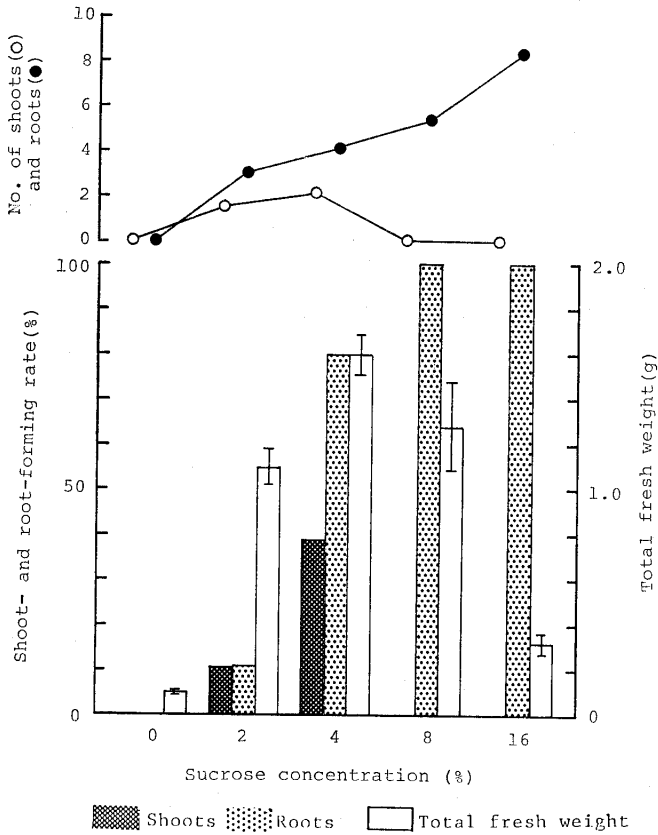


Fig. 4. Effects of sucrose concentration on callus and organ formation from leaf segments of chrysanthemum.

Table 1. Effects of maltose concentration on callus and organ formation from leaf segments of chrysanthemum.

Maltose (%)	Callus-forming rate (%)	Shoot-forming rate (%)	No. of shoots	Root-forming rate (%)	No. of roots	Total fresh weight (g)
0	0	0	0	0	0	—
2	100	0	0	22.2	4.0	0.94 ± 0.19
4	100	0	0	30.0	1.8	1.37 ± 0.21
8	100	0	0	62.5	1.0	0.84 ± 0.06
16	100	0	0	100	7.4	0.26 ± 0.04

Table 2. Effects of combination of sucrose and osmotica on callus and organ formation from leaf segments of chrysanthemum.

Sucrose (%)	Mannitol (%)	Callus-forming rate (%)	Shoot-forming rate (%)	No. of shoots	Root-forming rate (%)	No. of roots	Total fresh weight (g)
2	0	100	10.0	2.0	30.0	1.3	1.08 ± 0.08
2	1	100	0	0	20.0	1.0	0.99 ± 0.14
2	2	100	0	0	0	0	0.78 ± 0.15
2	3	100	20.0	1.0	20.0	1.5	0.68 ± 0.14
4	0	100	35.7	1.7	64.2	2.0	1.47 ± 0.10
4	2	100	10.0	1.0	70.0	2.6	0.99 ± 0.18
8	0	100	14.3	1.0	100	3.0	1.43 ± 0.11

形成に影響することは、リンゴの茎頂培養⁷⁾でも認められている。キクの葉片培養では、カルスの生長に対して最も有効であったマルトースが、シュートの形成にはまったく効果がなかったがその理由は明らかではない。

2～8%のシュークロースを加えた培地にマンニトールを加えて浸透圧を調整すると、カルスの生長は4%シュークロース区で最も大となったが、マンニトールを添加すると抑制された (Table 2)。カルスからの発根はシュークロース濃度が高いほどさかんであったが、マンニトールの影響は明らかではなかった。シュートの形成は、4%シュークロース区で他区より優ったが、マンニトールを加えると抑制された。

以上よりキクの葉片からのカルスの生長には、シュークロース、マルトースともに4%の濃度が最適であったが、シュートの形成には4%のシュークロースが有効でマルトースは有効ではなかった。またこれらの濃度の影響は浸透圧によるものではなかった。

培養組織からのシュートの形成は、同一培養条件下でも結果が大きく異なることが知られている⁸⁾。予備試験でキクの葉片を4%シュークロースを含む基本培地で培養し、まったくシュートを形成しない場合も見られた。

しかし同一ホルモン条件下でのくりかえしの結果、4%シュークロースでのシュート形成率は平均29.1% ($n=12$, 総置床数106本)、2%シュークロースでは11.9% ($n=13$, 総置床数121本)で、分散分析の結果5%有意で4%シュークロースの方が高かった。

(4) BA, NAA との相互作用の影響

BA, NAA とシュークロースのいずれの組み合わせでも旺盛な緑色または緑色・褐色モザイクのカルスの形成が見られ、全体としてホルモン濃度が高いほどカルスの生長は大となった。

2%シュークロース区では、BA 濃度が高いほどシュートの形成率は高くなり、BA 2.0または 5.0mg/l と NAA 0.5または 1.0mg/l の組み合わせで高いシュートの形成率が得られた。一方4%シュークロース区では、BA 0.1～5.0mg/l と NAA 0.5または 1.0mg/l のより広い組み合わせで高いシュートの形成率が得られた (Fig. 5)。しかし、8%シュークロース区ではホルモン濃度にかかわらずシュートの形成は抑制された。

根の形成は、2%シュークロース区では BA 0.1mg/l と NAA 0.5または 1.0mg/l の組み合わせでわずかに見られ、4%シュークロース区では BA 0.1または 1.0mg/l

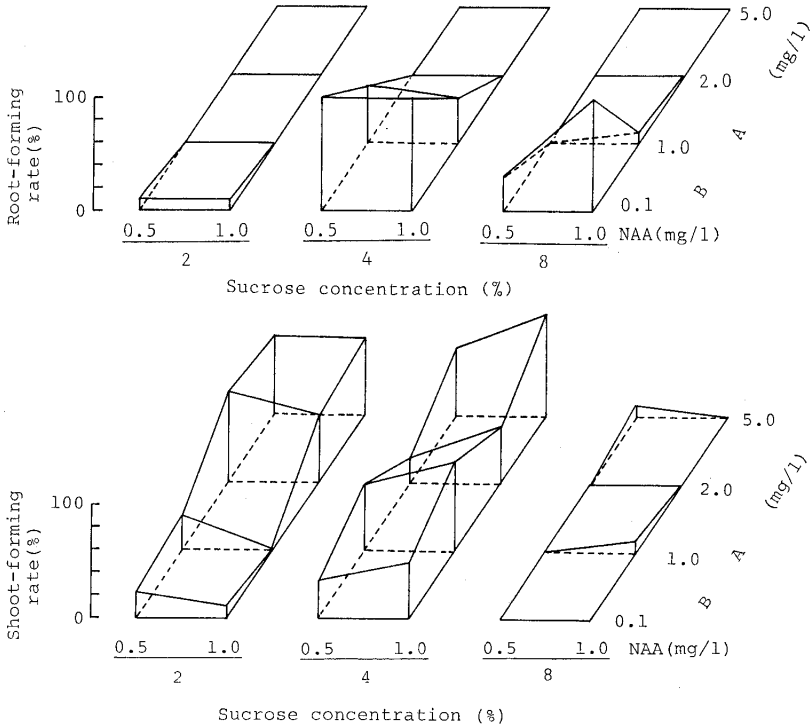


Fig. 5. Interaction between sucrose and plant growth-regulator on shoot and root formation from leaf segments of chrysanthemum.

と NAA 0.5 または 1.0mg/l の組み合わせでさかんとなり、8% シュークローズ区では BA 0.1mg/l と NAA 1.0mg/l の組み合わせ以外で劣った。

植物ホルモンと糖の相互作用については、キクの花柄組織を BA (1~10mg/l) と IAA (0.1~10mg/l) を含む MS 培地で培養し、4% シュークローズ添加では 1% シュークローズより広いホルモン濃度の組み合わせでシュートの形成が起こることが報告されている⁹⁾。またリンゴの茎頂培養において、培地のシュークローズ濃度が低いと BA の葉の分化促進効果が認められないとされている¹⁰⁾。

これらのことより、培地に好適濃度のシュークローズが添加されると、培養組織からのシュートの形成が起るホルモンの濃度範囲が広がるものと推察され、キクの場合 4% がシュークローズの好適濃度と考えられた。

文 献

- 1) 大塚寿夫, 末松信彦, 戸田幹夫, 1985. 園学要旨, 昭60春, p. 344-345.
- 2) 大澤勝次, 戸田幹彦, 西 貞夫, 1974. 野菜試験報, **A1** : 41-57.
- 3) Murashige, T., 1974. Ann. Rev. Plant Physiol. **25** : 135-166.
- 4) Gamborg, O.L., J.P. Shyluk. 1981. In "Plant Tissue Culture" (ed. by Thorpe, T.A.), p. 21-44, Academic Press, London.
- 5) Yatazawa, M., K. Furuhashi, M. Shimizu, 1967. Plant Cell Physiol., **8** : 363-373.
- 6) Chong, C., C.D. Taper, 1972. Can. J. Bot., **50** : 1399-1404.
- 7) Pua, E.-C., C. Chong, 1984. Can. J. Bot., **62** : 1545-1549.
- 8) Isogai, Y., K. Shudo, T. Okamoto, 1976. Plant Cell Physiol., **17** : 591-600.
- 9) Roest, S., G.S. Bokelmann, 1975. Sci. Hort., **3(4)** : 317-330.
- 10) 福井博一, 今河 茂, 田村 勉, 1981. 園学雑, **49(4)** : 549-556.

Summary

Effects of Sugar on Callus and Organ Formation from Leaf Segments of Chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* KITAMURA)

Seiichi FUKAI

Osaka Agricultural Research Center, Shakudo, Habikino, Osaka 583

The formation of callus and organ from leaf segments of chrysanthemum was studied in relation to various carbon sources in the medium. Leaf explants of chrysanthemum were cultured on MS medium supplemented with 0.1mg/l BA, 1.0mg/l NAA, 0.5mg/l folic acid, 0.05mg/l biotin and 0.8% agar. When 4% maltose alone or the combination of 2% maltose and 2% sucrose, fructose, glucose or raffinose was added to the medium, the callus formation was stimulated markedly. The shoot formation was observed in the medium containing 2 or 4% sucrose, but maltose (2, 4, 8 or 16%) was found to be ineffective. When the combination of BA (2.0 or 5.0mg/l) and NAA (0.5 or 1.0mg/l) with 2% sucrose, or BA (0.1-5.0mg/l) and NAA (0.5 or 1.0mg/l) with 4% sucrose was added, the active shoot formation was induced, but not with 8% sucrose.