

シネラリア (*Senecio x hybridus* (Willd.) Rogel) の花弁培養による増殖

北浦健生, 高柳りか*, 真子正史, 三浦泰昌**

Propagaiton of Cineraria (*Senecio x hybridus* (Willd.)
Rogel) by petal culture in vitro

Takeo KITAURA, Rika TAKAYANAGI*, Masafumi MANAGO
and Yasumasa MIURA**

Present address: *Kanagawa Agricultural Academy,

**Tokyo University of Agriculture

摘 要

キク科の鉢花であるシネラリア (*Senecio x hybridus* (Willd.) Rogel) の組織培養による形質の均一性向上を目的に、培養条件が植物体再生と生育に及ぼす影響並びに、分化個体の花器形質について調査した。その結果次の知見を得た。

1. 開花直後の舌状花弁を外植体に用い、BA及びIAA各1 mg/lを添加したMS培地で培養した結果、多数の不定芽が叢生する多芽体が形成された。
2. 得られた多芽体はMS培地での継代培養により、苗条をさらに分化することが観察され、大量増殖が可能であった。
3. 継代培養により増殖した植物体をNAA 1 mg/lを添加したMS培地に移植したところ、発根が促進された。
4. 発根した再生個体を順化し、花器形質について種子由来の植物体と比較したところ、組織培養個体では花器形質の均一性の向上が認められ、シネラリアの形質の均一性向上に対する組織培養の有効性が確認された。
5. 再生個体の中には、花器に奇形を有する個体または腋芽の分化数が著しく多い個体も観察されたため、培養過程での変異を遺伝的及び生理的観点から検討する必要があると考えられた。

キーワード：シネラリア，組織培養，花弁培養

Summary

Tissue culture of Cineraria was studied for plant regeneration and characters of the regenerated plants through the method in Cineraria (*Senecio x hybridus* (Willd.) Rogel) were investigated. Adventitious bud and multiple shoot were differentiated from petals on MS medium supplemented with 1 mg/l IAA, 1 mg/l BA and 30 g/l sucrose. The shoots from adventitious buds formed many axillary shoots on MS medium supplemented with 30 g/l sucrose. For rooting, the shoots were transplanted to MS medium supplemented with 1 mg/l NAA and 30 g/l sucrose. Regenerated plantlets developed whole plants, but abnormal ligulate flowers were observed and number of axillary shoot increased on regenerated plants.

Key words: Tissue culture, Cineraria (*Senecio x hybridus* (Willd.) Rogel)

緒言

シネラリア (*Senecio x hybridus* (Willd.) Rogel) はキク科の永年生作物であるが、通常は一年生の鉢花として栽培されている。季節的には卒業式シーズンを中心とする早春に需要が高まるため、鉢物栽培における輪作体系の中では重要な位置を占め、さらに近年では切り花としての利用の可能性も検討されつつあり、今後需要の増加が見込まれている作目の一つである。豊富な花色を有し、大輪から小輪にわたる多様な草姿を示す品種が多数育成されているが、品種内で花器形質等に分離が認められるため、形質の均一性の向上が求められている。この形質分離は、通常栽培で行われている種子繁殖の結果、遺伝的変異が顕在化したことが一因として挙げられる。そのため、シネラリアの花器形質の均一性を向上させるためには、長期的には自殖または同類交配による採種母本の同型接合化に取り組むと同時に、短期的には組織培養を中心とした栄養繁殖技術を確認することが重要と考えられる。

キク科植物における組織培養についてはキク¹⁻³⁾⁷⁾¹²⁾、ガーベラ⁶⁾で種々の培養系が報告されているが、これまでにシネラリアの組織培養に関する報告はない。

そこで本研究では、シネラリアの組織培養技術の確立を目的として、植物体再生、生育に及ぼす培養条件の影響及び分化個体の花器形質を調査し、培養技術が適応できるかの可能性を検討した。その結果、花卉培養による再生が可能であるとともに、形質の均一性も向上することが明らかになったので、取りまとめて報告する。

材料及び方法

1 初代培養

供試品種として、シネラリア品種‘東京ダルマ’及び‘ミス横浜’を用いた。開花開始時の舌状花を外植体として、採取後70%エタノールで1分間及び次亜塩素酸ナトリウム溶液(有効塩素1%)で3分間表面殺菌を行い、滅菌水で洗浄し、培地に置床した。培地はMS培地¹⁰⁾を基本とし、外植体からの不定芽形成に及ぼす培地中の糖の種類の影響をみるために3%スクロース及び3%マルトースの2種類の糖を用いた。また、同時に生長調節物質の影響をみるために、BA(6-Benzylaminopurin)を1,10mg/lの2段階及びIAA(3-Indoleacetic acid)を0,1,1mg/lの2段階の濃度を設定し、無添

加区と組み合わせた18種類とした。いずれの培地もしょ糖30g/lを添加し、pH5.8に調整し、0.8%寒天で固化させた。25℃, 5000lux, 12時間照明下で70日間培養し、外植体の生存数及び不定芽形成数を調査した。

2 継代培養

初期培養の結果得られた多芽体の増殖条件を検討するため、‘東京ダルマ’の不定芽由来の多芽体を用い、MS培地の濃度及びIAA添加濃度が多芽体の増殖に及ぼす影響を調べた。第2表に示したように、2種類の培地濃度(MS培地およびMS培地濃度を1/2に希釈した1/2MS培地)と3種類のIAA添加濃度(0, 0.005および0.01mg/l)を組み合わせた6種類の培地を調製した。いずれの培地もしょ糖30g/lを添加し、pH5.8に調整し、0.8%寒天で固化させた。多芽体の大きさを揃えて各培地に置床し、25℃, 5000lux, 12時間日長下で3週間培養し、生育量を調査した。

3 発根条件

多芽体からの発根条件を明らかにするために、継代培養により増殖した4葉以上を有する多芽体を用い、NAA(1-Naphthaleneacetic acid)濃度が発根に及ぼす影響について調査した。培地はMS培地を基本として、NAAを0.1ppm及び1ppm添加した3種類を調製した。いずれの培地にも、しょ糖30mg/lを添加し、pH5.8に調整し、0.2%ゲルライトで固化させた。

20℃, 5000lux, 12時間照明下で2か月間培養し、発根状態を調査した。

4 形質調査

発根が観察された多芽体由来の植物個体を順化し、花弁形質を調査した。順化方法は、培養容器に用いているアルミ箔栓をゆるめて数日間おいた後、バーミキュライトを用土とした3.5号のビニルポットに移植し、植物体及び鉢をビニル袋で覆い、数日後から徐々にビニールに穴を開け、袋内への外気の流入を促した。順化後、温室内で育成し、舌状花弁の長軸方向における有色部と白色部の長さを調査した。

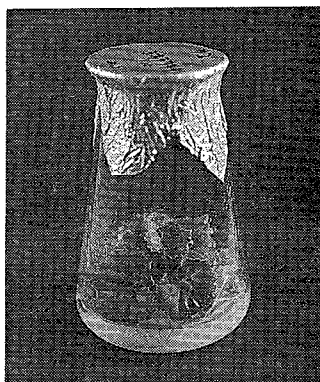
一方、対照となる市販種子における花卉形質の変異幅を明らかにするため、‘東京ダルマ’及び‘ミス横浜’(サカタのタネ)を栽培し、花卉形質を調査した。

さらに、舌状花弁に占める白色部の比率の遺伝性を確認するため、開花終了後に切り戻し、再び開花した8個体について、白色部の占める比率を調査した。

結果及び考察

1 初代培養

外植体の生存及び外植体からの不定芽形成に及ぼす培地中の糖の種類と生長調節物質の種類と濃度の影響について調査した結果を第1表に示した。糖の種類についてみると、‘東京ダルマ’ではマルトース添加培地において外植体の生存数が若干多いが、‘ミス横浜’では生存数の違いはみられなかった。生長調節物質の影響についてみると、BA添加区で生存数はやや増加した。一方IAA添加区では、添加濃度の違いによる生存数の差異は認められなかった。外植体からの不定芽の形成はスクロース添加培地でのみ観察され、‘東京ダルマ’ではBA及びIAA各1mg/l添加培地およびBA10mg/l及びIAA各0.1mg/l添加培地において、また‘ミス横浜’ではBA及びIAA各1mg/l添加培地で不定芽形成が観察された。不定芽は叢状に分化して多芽体を形成し、生長した(第1図)。



第1図 多芽体から生長したシネラルリア個体

以上の結果から、BA及びIAA各1mg/lを添加したMS培地がシネラルリアの培養に適しているものと考えられた。

2 継代培養

多芽体の増殖に及ぼすMS培地の濃度及びIAA濃度の影響を4段階で評価して、その結果を第2表に示した。

第2表 培地及びIAA濃度がシネラルリアの多芽体の生育に及ぼす影響

培地濃度	IAA濃度 (mg/l)		
	0	0.005	0.01
MS	2.6 ²	2.5	1.6
1/2MS	1.6	2.2	2.0

²: 生育量は、置床した多芽体が2倍程度の大きさに生育した個体を4として、5~6反復の平均値として示した。

指標は置床した多芽体が2倍程度の大きさに生長した場合に段階4として表した。いずれの培地においても多芽体は生長したが、培地により生育量に違いがみられた。培地濃度では、MS培地の生育量が1/2MS培地(MS培地の1/2濃度)に比べ高い値を示した。一方、IAA濃度では、無添加または0.005mg/l添加区において生育量が多かった。継代培養開始時には組織が水浸状を呈した(ガラス化)多芽体が見られたが、置床後の生長とともに組織色は水浸状の黄緑から緑色に変化し、外見上健全な生育を続けた。また、多芽体由来の植物体の一部分には、常に苗条を分化している部分が存在し、継続的に増殖及び生長を続けた(第2図)。

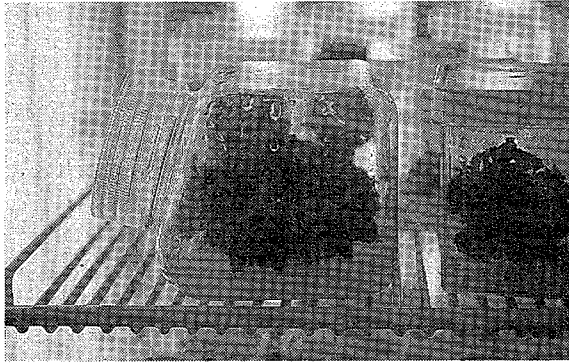
以上の結果から、シネラルリアの継代培養にはMS培地

第1表 糖の種類及び生長調節物質がシネラルリアの組織培養における外植体の生存及び不定芽形成に及ぼす影響

培地 No.	糖の種類	生長調節物質		東京ダルマ		ミス横浜	
		BA	IAA	生存数 / 供試数	生存数 / 供試数		
1	スクロース	0 mg/l	0 mg/l	0 / 3	1 / 3		
2	"	0	0.1	0 / 3	1 / 3		
3	"	0	1	0 / 3	0 / 3		
4	"	1	0	0 / 3	1 / 3		
5	"	1	0.1	0 / 3	1 / 3		
6	"	1	1	1(1) ² / 3	1(1) / 3		
7	"	10	0	1 / 3	0 / 3		
8	"	10	0.1	1(1) / 3	2 / 3		
9	"	10	1	0 / 3	2 / 3		
10	マルトース	0	0	0 / 3	1 / 3		
11	"	0	0.1	1 / 3	0 / 3		
12	"	0	1	0 / 3	1 / 3		
13	"	1	0	2 / 3	0 / 3		
14	"	1	0.1	0 / 3	2 / 3		
15	"	1	1	2 / 3	2 / 3		
16	"	10	0	2 / 3	2 / 3		
17	"	10	0.1	1 / 3	0 / 3		
18	"	10	1	1 / 3	0 / 3		

²: ()の値は不定芽形成数を示す。

が適しているものと考えられ、培養中に新たに分化した苗条はさらに次回の継代培養に供することにより、大量増殖が可能なが示唆された。



第2図 継代培養における植物体の増殖

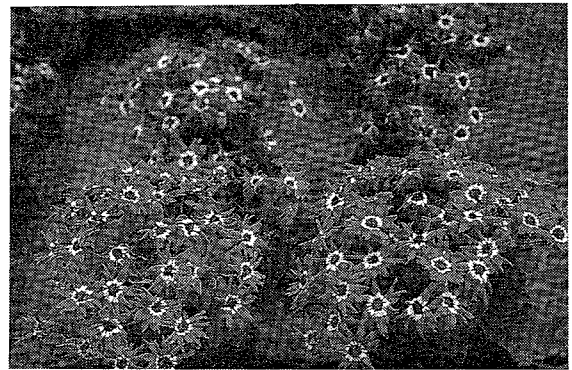
3 発根条件

継代培養後の苗条からの発根に及ぼすNAA濃度の影響を発根度（4段階）及び根長（3段階）で評価し、その結果を第3表に示した。発根度をみると、NAA 1 mg/l添加区が高い値を示し、0.1 mg/l添加区では効果が認められなかった。一方根長では、NAA添加濃度が高まるにつれて値が高まる傾向がみられた。

以上の結果からNAA 1 mg/lの添加によりシネラリアの発根が促進されることが明らかになったが、約25%の個体では発根がみられないため、効果の均一性については、さらに検討する必要があるものと考えられた。

4 形質調査

再生個体の開花状況を第3図に示した。また再生個体及び市販種子由来個体における舌状花弁の白色部の比率を比較した結果を第4表に示した。市販種子由来の個体では、供試した2品種ともに舌状花弁における白色部分が全く存在しない個体から、舌状花弁の半分以上に達す



第3図 培養由来植物体の開花状況



第4図 培養由来植物体にみられる奇形花
左：正常花開花個体
右：奇形花開花個体

る個体まであり、大きな品種内変異が存在した。一方、同一外植体から再生した植物体では花器形質の均一性が高く、白色部比率の変異幅は狭く、標準偏差は低い値を示した。

種子由来個体における切り戻し前後の舌状花弁の白色部を比較した結果、比率は切り戻し前後の花序で近似した値を示し、相関係数が大きく、高い有意性を示した ($r=0.97^{**}$ $df=6$)。

一方、組織培養由来個体の中には舌状花数が減少して、

第3表 NAA濃度がシネラリアの発根に及ぼす影響

NAA濃度	供試数	発根度 ^z					平均値	根長 ^y			平均値
		0	1	2	3	1		2	3		
0 mg/l	30	7	11	10	2	1.2	9	9	5	1.8	
0.1	22	8	6	7	1	1.1	4	5	5	2.1	
1.0	28	7	4	8	9	1.7	2	9	10	2.4	

z：発根度は発根数を0:0本、1:1~2本、2:2~10本、3:10本以上の4段階に区分して調査した。

y：根長は1:発根確認、2:最大根長2cm未満、3:最大根長2cm以上の3段階に分類して示した。

第4表 シネラリア市販種子と組織培養由来個体の舌状花弁における白色部比率の比較

植物体由来	品 種	平 均	S D	CV (%)	最 小 値	最 大 値
市販種子	東京ダルマ	0.20	0.16	80	0	0.55
	ミス横浜	0.28	0.18	64	0	0.75
組織培養	東京ダルマ	0.21	0.05	24	0.15	0.27

芯の管状花部分が円形を示さない奇形花個体(第4図)および、腋芽を多数分化する個体が観察された。

以上の結果から、組織培養によりシネリリアの花器形質の均一性の向上が可能になったことが明らかになった。切り戻しの前後で花器形質は変化しなかったことと併せて考えると、花卉色形質は遺伝形質であり、シネリリアの市販品種内には大きな遺伝変異の存在が推察された。この遺伝変異を利用した優良個体の選抜または交雑育種が考えられるが、組織培養はその際に育成中の優良系統の増殖技術として有効と考えられる。組織培養による均一な優良個体の増殖は、栽培面では生育の均一性による栽培管理の省力化につながり、消費場面では、集団的な装飾等の利用性が増大することが期待される。さらに、組織培養は遺伝子組み換え技術による新品種の育成^{4~9)}の基礎技術として今後シネリリアの育種において重要性が増すものと考えられる。

ただし、本研究で観察された再生個体における変異の発生は組織培養の実用化に際して大きな問題であり、原因の究明および発生の防止が重要である。本研究では花器および腋芽数について変異が観察されたが、キクの培養由来の再生個体でも本研究結果と同様に花器形質に変異の発生することが報告され¹¹⁾、染色体変異との関連が議論されている^{8~9) 13)}。本研究において、初代培養時から多芽体の一部分に常に苗条を形成しているものが観察されたことから、順化後の腋芽の増加は培養条件の影響が順化後まで及んだことも考えられる。そのため、変異については、培養中に生じた突然変異または培地条件という生育前歴の影響の可能性が考えられ、変異発生の原因究明では継代培養開始時点を中心に生理及び遺伝の両面から検討する必要があるものと考えられる。

引用文献

- 1) 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, 大阪農林技セ研報23, 25~31
- 2) 深井誠一, 大江正温, 陳 忠英(1987): キクの葉片培養におけるシュート形成に関する品種間差異, 大阪農林技セ研報24, 55~58
- 3) 深井誠一, 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, 大阪農林技セ研報25, 25~30
- 4) R. B. Horsch, J.E.Fry, N.L.Hoffmann, D.Eichholtz, S. G. Rogers and R.T. Fraley(1985): A simple and General Method for Transferring Genes into Plants, Science 227, 1229~1231
- 5) L. Marton, G. J. Wulluems, L. Molendijk and R. A.Schilperoort(1979) : In vitro transformation of cul-tured cells from Nicotiana tabacum by Agrobacterium tumefaciens, Nature 277, 129~131
- 6) 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
- 7) 宮崎貞巳, 田代洋丞(1977): キクの組織培養(第2報) 茎切片培養生株の染色体数変異, 佐賀大農彙報42, 27~42
- 8) 宮崎貞巳, 田代洋丞(1978): キクの組織培養(第3報) 種々の部分の培養によって生じた株の染色体数および花色変異について, 佐賀大農彙報44, 13~31
- 9) Toshio Murashige and Folke Skoog(1962): A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assay with Tobacco Tissue Cultures, Physiologia Plantarum 15, 473~497
- 10) 黄 敏展 朱 建金庸(1985): 茎頂培養によるガーベラの経済的大量増殖法, 園学雑54, 94~100
- 11) 大石一史, 桜井雍蔵(1988): キクの花弁組織から再分化した個体の変異について, 愛知農試研報20, 278~284
- 12) 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
- 13) 大塚寿夫, 末松信彦, 戸田幹彦(1987): キクのプロトプラスト由来再分化植物にみられる形態変異, 静岡農試研報32, 53~59