

リンドウ種苗生産のための組織培養システム

星 伸枝*1・竹澤 利和*2・阿部 潤*3・佐々木 力*4

摘 要

岩手県が育成したリンドウの多くは F1 品種であることから、自殖劣性の特性を有するリンドウの親株の維持・増殖に多大な労力を必要としている。そこで、圃場よりも省力的かつ効率的に維持・増殖が可能な組織培養を利用した種苗生産システムを構築するため、葉片培養、越冬芽ディスク培養、液体振とう培養の手法について検討した。葉片培養において MS 培地にナフタレン酢酸 0.5mg/l、チジアズロン 10.0mg/l およびショ糖 3%を添加した培地(GC2 培地)で培養することによりカルス形成とシュート形成が可能であるが、系統間差や個体差、外植片の条件などの詳細についても検討した。また、培養中に形成した越冬芽の節を1節含む 5mm 厚に切り出した組織(越冬芽ディスク)を GC2 培地で培養することによりカルス及びシュート形成がみられる越冬芽ディスク培養が可能となった。越冬芽を形成した幼植物をホルモンフリーの MS 液体培地に継代培養し、120rpm で液体振とう培養による増殖が可能となった。さらに、葉片培養由来のシュートを 15℃の低温培養により越冬芽を誘導し維持することが可能となった。以上の手法を組み合わせることにより、一部の系統を除き組織培養による増殖、系統維持、及び発根馴化までの一連の工程が実用可能と考えられた。さらにこれらの技術を総合化して、実際の種苗生産を想定した作業工程、系統別・培養手法別の難易性を整理した。以上のことから、組織培養を利用したリンドウの種苗生産は、優良種子の安定供給と効率的な育種の推進に貢献するとともに、リンドウ生産農家の経営安定と、計画的な産地形成につながるものと期待される。

キーワード:リンドウ, 種苗生産, 組織培養, 葉片培養, 越冬芽ディスク培養

第 I 章 緒言

リンドウは岩手県の最も重要な花き品目であり、主産県として全国に確固とした地位を確立している。すなわち、平成 19 年産の栽培面積は全国の 67.8%を占める 350ha、出荷本数は同 67.9%の 58,953 千本でいずれも1位となっており⁶⁾、岩手県は今後もリンドウを核とした花き複合産地形成を進める計画である。岩手県におけるリンドウの育種は、昭和 42 年に開始され、昭和 52 年に国内初のリンドウ品種となる「いわて」を品種登録した。以来現在までに栄養系 4 品種、種子繁殖系 11 品種を開発するとともに、栽培法や育種に関する技術を開発し、全国農業協同組合連合会岩手県本部や(社)岩手県農産物改良種苗センターと連携を図り、種苗の生産供給体制を確立して県育成品種の普及拡大に努めてきた。

しかし、リンドウ主産県として今後も着実な生産を維持・拡大するためには、優良種苗の安定供給が求められている。特に、リンドウは自殖劣勢が強いいため、本県が開発した種子繁殖系 F1 品種の両親系統を安定的に維持、増殖することが最大の課題となっていた。

岩手県では、1980 年代から種苗生産への応用化に向けてリンドウの組織培養法の大量増殖に取り組み⁷⁾、ササリンドウを片親に持つポラーノホワイトとポラーノブルーでは茎頂

培養由来の植物体のシュートを節挿し増殖し、培養苗として種苗提供する手法を開発した³⁾。しかし、岩手県育成 F1 品種の多くで交配親としているエゾリンドウはシュートの節挿しによる増殖が困難であったことから¹³⁾、その後葉片培養や茎頂培養をはじめとする各種培養手法の開発に着手し、1990 年代後半には「矢巾系」の維持・増殖法¹⁾、葉片培養による増殖法²⁾、などの技術を開発した。しかし、それらの手法においても系統や個体によっては、再分化の困難な場合も多く見られたことから、培地や培養条件などについてより詳細な検討が必要とされていた。

そこで、維持・増殖が可能な組織培養法を開発し、F1 親の種苗生産を可能とするため、第 II 章では葉片培養による増殖法、第 III 章では越冬芽を用いた増殖法、第 IV 章では液体浸とう培養、第 V 章では越冬芽を用いた維持法、最後に第 VI 章では効率的な発根、馴化方法について検討した。

第 II 章 葉片培養手法の検討

材料および方法

1 葉片培養における好適培地の検討

従来、培養増殖が困難とされていた系統を供試し、葉片

*1 元農産部応用生物工学研究室(現 技術部野菜花き研究室)

*2 元農産部応用生物工学研究室(現 県南広域振興局)

*3 元農産部応用生物工学研究室(現 岩手県生物工学研究所)

*4 元農産部旧応用生物工学研究室(現 技術部作物研究室)

培養培地として有望な GC2 培地(MS 基本培地にオーキシンとしてナフタレン酢酸(NAA)0.5mg/l, サイトカイニンとしてチジアズロン(TDZ)10mg/l, ショ糖 3%, ゲランガム 0.2%を添加したもの⁶⁾を中心に好適添加ホルモンの種類と濃度を検討した。

材料は、松尾系(系統名 Ma8-15), 吾妻系(同 AZA 00-03), IAW 系, 白中生系を, 対照系統として矢巾系(同 Y5.1.4 8-40)を, 参考系統として磐梯系(同 Ba 97023No.2)を供試した。

培地は、基本培地に MS 培地を用い、オーキシンとして NAA 0.1, 0.5, 1mg/l とサイトカイニンとして TDZ 1, 5, 10mg/l を組み合わせて培地に添加した。サイトカイニンについては、1区のみベンジルアデニン(BA)10 mg/l を添加した区も設定した。ショ糖とゲランガムはそれぞれ 3%および 0.2%とした。

材料の葉片は、茎頂培養由来の培養個体から主脈を含んで 5mm×8mm 角の長方形に切り出して調整し、切片を立てて培地に半分程度差し込んだ(図 1)。培養容器は平底試験管(φ 25mm×100mm, 以後、試験管と称する)を用い、培地を 10ml 分注後、ポリプロピレン製キャップで栓をし、オートクレーブにより 121°C, 120kPa で 15 分滅菌した。培地の滅菌条件は以下同様とし、記述を省略する。各区の培養本数は 15 本とした。

培養条件は、培養開始 3 日間は暗所とし、その後 23°C, 16 時間日長, 4,500lx で培養し、培養開始 2 カ月後に調査を行った。

2 葉片培養における培養容器ならびに置床方法がシュート形成に及ぼす影響

葉片培養における最適な培養容器と置床方法を検討した。供試材料は矢巾系と北海道系とし、茎頂培養から葉片の調整法までは前記 1 に準じた。

まず試験 1として、培養容器は試験管(培地量 10ml), シャーレ(φ 9cm×2cm, 培地量 20ml)を供試した(図 2)。

葉片の置床方法は、葉面の表面と培地面が接触するよう置床する方法(横)と葉片を培地に半分差し込む方法(縦)を検討した(図 1)。

試験 2 として、試験 1の容器にプラントボックス(6cm×6cm×10cm, 培地量 50ml)を加えて検討した(図 2)。

培地組成は GC2 を用い、ショ糖およびゲランガム添加濃度は前記 1 のとおりとした。

培養条件は、培養開始 3 日間は暗所とし、その後 23°C, 16 時間日長, 4,500lx で培養し、培養開始 2 カ月後に調査を行った。

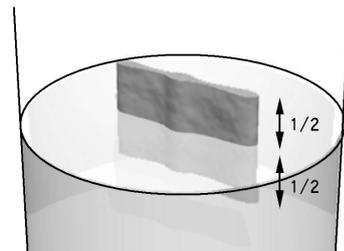


図 1 葉片の置床方法

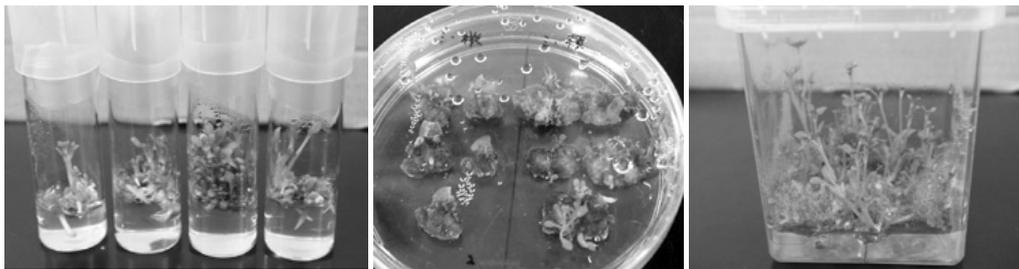


図 2 葉片培養における培養容器の検討

左から試験管, シャーレ, プラントボックス

3 系統間, 個体間での葉片培養における不定芽形成の反応の差異

(1)各系統間での個体間差

親系統として使用している個体は、種子由来のものであり、圃場栽培では同じ系統内でも個体間での形質のばらつきが大きい。そこで葉片培養における不定芽形成の個体間差を

検討した。

供試材料は北海道系(IHOEWNo.2, HO2.1.4, IHO), 矢巾系(Y, Y5.1.4(8-37No.1), Y5.1.4(8-40No.1)), 磐梯系(Ba1-3-9, Ba97-023No.1, Ba97-023No.2), 3系統9個体とし、茎頂培養から培地, 葉片の調整法までは前記 II-1 に準じた。

培養条件は培養開始7日間は23℃、暗所とし、その後23℃、16時間日長、3,500lxとし、その後不定芽伸長培地(MS基本培地、ショ糖3%、ゲランガム0.2%)に移植し、培養開始から6カ月後に調査した。

(2)不定芽形成における系統間差

葉片培養におけるリンドウ系統間差を検討した。

供試系統は北海道系(IHOEW No.2)、千沼ヶ原系(Sen2A)、磐梯系、吾妻系、松尾系、えぞ早生系、白中生系の7系統とし、対照区として矢巾系(Y5.3.1)を供試した。培地は、葉片培養の培地として有望なGC2培地を使用し、前記II-1の培養条件で培養した。各区の培養本数は13本とした。培養条件は培養開始7日間は23℃、暗所とし、その後23℃、16時間日長、3,500lxとし1.5カ月間培養した。その後MSホルモンフリー培地へ継代し、2か月後不定芽形成状況を調査した。

4 外殖片の条件が不定芽形成に及ぼす影響

(1)不定芽形成におよぼす葉位と植物形態の影響

供試材料の形態や葉位が不定芽形成におよぼす影響を調べた。リンドウの茎頂培養由来の培養植物にはシュートが伸長するものやロゼット状の形態となるものがある。本報告では、シュートが伸長するものを伸長型、ロゼット状になるものをロゼット型とした。伸長型は上部に茎が伸び、葉が節毎についた形態であるが、ロゼット型は基部に全ての葉がついており、伸長型とは異なり茎は上部に伸長せずそのまま越冬芽が形成される場合が多い形態である。このような植物形態や葉位の違いが不定芽形成へ及ぼす影響について調べた(図3)。

供試材料は北海道系(伸長型)と吾妻系(伸長型とロゼット型)とし、茎頂培養から葉片の調整法までは前記I-1に準じた。

葉位については、伸長型は上位節から1, 2, 3, …とし、ロゼット型は葉のついている基部の外側から内側に向かって1, 2, 3, …とした。

培養条件は、培養開始3日間は暗所とし、その後23℃、16時間日長、4,500lxとした。培養開始2か月後にカルス形成を調査した。

(2)葉片培養由来植物の外殖片としての利用

組織培養による増殖では、供試材料が時期を選ばず潤沢に供給できることが望ましい。そこで、葉片培養により増殖中の植物体の葉を再度材料として培養に供試した場合の影響について検討した。

供試材料は矢巾系と北海道系とし、茎頂培養から葉片の調整法までは前記II-1に準じた。供試材料は茎頂培養由来の無菌植物の葉片(試験区1)と葉片培養により増殖中の

無菌植物の葉片(試験区2)をそれぞれ用いた。培養条件は、培養開始3日間は暗所とし、その後23℃、16時間日長、4,500lxとした。培養開始2か月後にカルス及び不定芽形成を調査した。

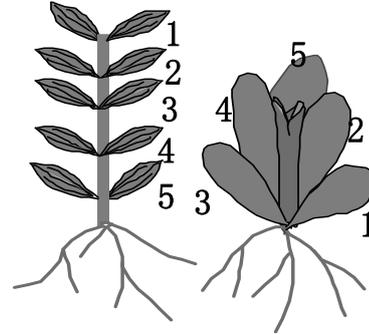


図3 培養中のりんどウ植物形態と葉位

左 伸長型, 右 ロゼット型 (葉位:伸長型は上位から, ロゼット型は基部の外側から)

結 果

1 葉片培養における好適培地の検討

対照区と比較した難培養系統の培養結果は以下のとおりであった(表1)。

松尾系はカルス形成と発根は観察されたが、シュート形成はほとんど見られなかった。

吾妻系はGC外区以外でシュート形成が見られたものの、カルス当りシュート数は1本以下となり、効率が低かった。

IAW系はGC1, GC6の区でカルス当りシュート形成数が最も高かった。

白中生系はGC8, 9, 10でシュート形成が見られたが、いずれも効率は低かった。

2 葉片培養における培養容器ならびに置床方法がシュート形成に及ぼす影響

置床方法については、カルスや葉片当り不定芽形成数に、明確な傾向は見られなかった(表2,3)。

培養容器については、試験1では、シャーレを用いた場合、いずれの系統においても葉の表面がわずかにもりあがる程度で、根の形成は少なかった。不定芽形成数は試験管を用いた場合、シャーレよりも多くみられた(表2)。

試験2では、容器別の葉片当りの不定芽形成率はプラントボックスの場合、矢巾系が18.2%、21.3%、北海道系が3.1%、3.5%と他容器よりも高かったが、多くのカルスでビトリフィケーションが見られた(表3)。

表1 葉片培養における植物ホルモンの添加効果

供試 系統	試験区	ホルモン添加濃度			培養 葉片数	培養結果					
		NAA (mg/l)	TDZ (mg/l)	BA (mg/l)		①	②	③	④	⑤	⑥
						カルス のみ	カルス +根	カルス +根 +シュート	総シュート 数 ^{z)}	カルスあたり シュート数 ④/(①+②+③)	枯死
松尾系	GC1	0.1	10.0	-	15	11	1	0	0	0.0	3
	GC2	0.5	10.0	-	15	0	15	0	1	0.0	0
	GC3	1.0	10.0	-	15	2	13	0	0	0.0	0
	GC5	0.5	1.0	-	15	0	15	0	0	0.0	0
	GC6	0.5	5.0	-	15	3	12	0	0	0.0	0
	GC8	0.1	5.0	-	15	13	2	0	0	0.0	0
	GC9	1.0	5.0	-	15	0	15	0	0	0.0	0
	GC10	0.1	1.0	-	15	6	3	0	0	0.0	6
	GC11	1.0	1.0	-	15	0	15	0	0	0.0	0
	GC外	0.5	-	10.0	15	3	7	0	0	0.0	5
吾妻系	GC1	0.1	10.0	-	15	2	7	6	13	0.9	0
	GC2	0.5	10.0	-	15	0	13	2	3	0.2	0
	GC3	1.0	10.0	-	15	0	15	0	1	0.1	0
	GC5	0.5	1.0	-	15	0	14	1	9	0.6	0
	GC6	0.5	5.0	-	15	1	13	1	7	0.5	0
	GC8	0.1	5.0	-	15	0	12	3	8	0.5	0
	GC9	1.0	5.0	-	15	0	15	0	6	0.4	0
	GC10	0.1	1.0	-	15	0	15	0	2	0.1	0
	GC11	1.0	1.0	-	15	0	15	0	1	0.1	0
	GC外	0.5	-	10.0	15	2	12	0	0	0.0	1
IAW系	GC1	0.1	10.0	-	15	6	1	8	28	1.9	0
	GC2	0.5	10.0	-	15	0	2	13	20	1.3	0
	GC3	1.0	10.0	-	15	10	4	1	13	0.9	0
	GC5	0.5	1.0	-	15	7	4	3	12	0.8	1
	GC6	0.5	5.0	-	15	6	7	2	29	1.9	0
	GC8	0.1	5.0	-	15	4	1	0	11	0.7	10
	GC9	1.0	5.0	-	15	5	10	0	0	0.0	0
	GC10	0.1	1.0	-	15	7	1	0	10	0.7	7
	GC11	1.0	1.0	-	15	12	3	0	0	0.0	0
	GC外	0.5	-	10.0	15	0	7	0	0	0.0	8
白中生系	GC1	0.1	10.0	-	15	15	0	0	0	0.0	0
	GC2	0.5	10.0	-	15	12	3	0	0	0.0	0
	GC3	1.0	10.0	-	15	0	15	0	0	0.0	0
	GC5	0.5	1.0	-	15	6	9	0	0	0.0	0
	GC6	0.5	5.0	-	15	7	5	0	0	0.0	3
	GC8	0.1	5.0	-	15	9	0	0	3	0.2	6
	GC9	1.0	5.0	-	15	15	0	0	7	0.5	0
	GC10	0.1	1.0	-	15	15	0	0	2	0.1	0
	GC11	1.0	1.0	-	15	9	5	0	0	0.0	1
	GC外	0.5	-	10.0	15	0	0	0	0	0.0	15
(参考区) 磐梯系	GC1	0.1	10.0	-	15	5	1	5	30	2.0	4
	GC2	0.5	10.0	-	15	4	7	4	30	2.0	0
	GC3	1.0	10.0	-	15	5	7	1	46	3.1	0
	GC5	0.5	1.0	-	15	2	13	0	5	0.3	0
	GC6	0.5	5.0	-	15	1	12	1	21	1.4	1
	GC8	0.1	5.0	-	15	3	3	2	2	0.1	6
	GC9	1.0	5.0	-	15	1	12	2	59	3.9	0
	GC10	0.1	1.0	-	15	2	4	0	7	0.5	9
	GC11	1.0	1.0	-	15	0	15	0	1	0.1	0
	GC外	0.5	-	10.0	15	0	0	0	0	0.0	15
(対照区) 矢巾系	GC1	0.1	10.0	-	15	8	0	2	50	3.3	5
	GC2	0.5	10.0	-	15	0	10	5	70	4.7	0
	GC3	1.0	10.0	-	15	1	13	1	38	2.5	0
	GC5	0.5	1.0	-	15	3	12	0	5	0.3	0
	GC6	0.5	5.0	-	15	5	10	0	36	2.4	0
	GC8	0.1	5.0	-	15	9	5	1	6	0.4	0
	GC9	1.0	5.0	-	15	0	9	6	68	4.5	0
	GC10	0.1	1.0	-	15	8	5	0	3	0.2	2
	GC11	1.0	1.0	-	15	0	14	1	59	3.9	0
	GC外	0.5	-	10.0	15	2	4	0	0	0.0	9

z) 組織から直接シュートが形成された場合を含む。

表2 試験1における培養容器ならびに置床法がシュート形成に及ぼす影響

供試系統	培養容器 ^{z,y,x}	葉片置床方法 ^{w,v}	置床葉片数 (個)	培養期間				
				8週目				12週目
				カルスのみ形成 (個)	カルス+根 (個)	カルス+根+シュート (個)	枯死 (個)	不定芽数/葉片 (%)
矢巾系	試験管	縦	15	2	5	8	0	27.7
	試験管	横	15	2	2	11	0	52.1
	シャーレ	縦	40	35	4	1	0	0.6
	シャーレ	横	40	37	1	2	0	1.1
北海道系	試験管	縦	15	0	8	7	0	10.1
	試験管	横	15	0	13	2	0	7.6
	シャーレ	縦	30	18	12	0	0	2.3
	シャーレ	横	30	12	18	0	0	0.7

z) 試験管 φ2.5cm×10cm(培地量10ml)
y) シャーレ φ9cm×2cm(培地量20ml)
x) プラントボックス 6cm×6cm×10cm(培地量50ml)
w) 縦 葉面を垂直にして培地へ半分差し込む
v) 横 葉面全面が培地に接するよう置床する

表3 試験2における培養容器ならびに置床法がシュート形成に及ぼす影響

供試系統	培養容器 ^{z,y,x}	葉片置床方法 ^{w,v}	置床葉片数 (個)	培養期間				
				8週目				12週目
				カルスのみ形成 (個)	カルス+根 (個)	カルス+根+シュート (個)	枯死 (個)	不定芽数/葉片 (%)
矢巾系	試験管	縦	20	0	6	14	0	12.3
	試験管	横	20	0	3	17	0	13.7
	シャーレ	縦	20	10	0	10	0	12.3
	シャーレ	横	20	7	0	11	0	12.9
	プラントボックス	縦	40	2	0	38	0	18.2
	プラントボックス	横	40	4	0	36	0	21.3
北海道系	試験管	縦	20	0	18	2	0	1.1
	試験管	横	20	0	18	2	0	2.2
	シャーレ	縦	20	8	10	1	1	0.6
	シャーレ	横	20	7	10	0	3	0.8
	プラントボックス	縦	40	2	23	10	0	3.1
	プラントボックス	横	35	4	20	11	0	3.5

z) 試験管 φ2.5cm×10cm(培地量10ml)
y) シャーレ φ9cm×2cm(培地量20ml)
x) プラントボックス 6cm×6cm×10cm(培地量50ml)
w) 縦 葉面を垂直にして培地へ半分差し込む
v) 横 葉面全面が培地に接するよう置床する

3 系統間、個体間での葉片培養における不定芽形成の反応の差異

(1)各系統間での個体間差

供試3系統9個体において個体差を比較すると、どの個体もカルスと不定根の形成はみられるものの、不定芽形成において難易がみられた(表4)。特に磐梯系においては個体間差が大きかった。

(2)不定芽形成における系統間差

北海道系、千沼ヶ原系、磐梯系については、カルスと不定芽形成がみられた。不定芽形成数も1葉片あたり10本以上みられるものが多かった。また、得られた不定芽に形態的な異状(奇形など)は見られなかった。吾妻系、松尾系、えぞ早

生系についてはカルス形成のみが確認され、白中生系においてはカルス形成も確認されなかった(表5)。

4 外殖片の条件が不定芽形成に及ぼす影響

(1)供試葉位と植物形態が不定芽形成に及ぼす影響

北海道系と吾妻系の伸長型は、葉位にかかわらずカルス形成がみられた(表6,7)。また吾妻系は、不定芽形成はほとんどみられず、北海道系でみられた不定芽形成は、葉位間による明確な違いはなかった。吾妻系のロゼット型についても、葉位にかかわらずカルス形成、不定芽形成が確認された(表7)。

(2)葉片培養由来植物の外殖片としての利用

供試した北海道系, 矢巾系ともに葉片培養により増殖させたシュートの葉片を供試材料として使用しても不定芽形成がみられた(表 8). 形成された不定芽は, 茎頂培養由来の葉片

を材料として形成させた不定芽と比較しても形態的な変異は見られず, 発根培地に置床した場合の発根率や形態などに大きな違いはみられなかった.

表 4 各系統個体におけるカルス及び不定芽形成状況

系統名 (個体名)	供試数	カルスのみ	カルス+根	(単位:本)	
				カルス+不定根 +不定芽(多い) ²⁾	カルス+不定根 +不定芽
北海道系					
(IHOEW No.2)	20	0	10	4	6
(HO2.1.4)	20	1	14	0	5
(IHO)	20	0	15	1	4
矢巾系					
(Y)	20	0	4	5	11
(Y5.1.4(8-37) No.1)	20	0	4	0	16
(Y5.1.4(8-40) No.1)	20	0	12	0	8
磐梯系					
(Ba1-3-9)	20	0	0	20	0
(Ba97-023 No.1)	20	2	16	0	2
(Ba97-023 No.2)	20	0	12	0	7

2) 不定芽(多い):10本以上あるもの

表 5 葉片培養における系統間差

系統名	供試数(本)	系統間における不定芽形成状況(%)				不定芽形成数(本/葉片)(%)		
		枯死	カルスのみ	カルス+不定根	カルス+不定根+不定芽	0本	1-10本	10本以上
北海道系	13	0	0	15	85	0	42	58
千沼ヶ原系	13	8	0	15	77	8	8	84
磐梯系	13	0	4	52	44	4	52	44
吾妻系	13	0	100	0	0	100	0	0
松尾系	13	62	31	8	0	100	0	0
えぞ早生系	13	23	38	38	0	100	0	0
白中生系 (対照区)	13	100	0	0	0	100	0	0
矢巾系	13	0	0	87	13	40	53	7

表 6 北海道系における葉位別カルス及び不定芽形成状況(伸長型)

(単位:本)				
葉位	供試数	カルスのみ	カルス+根	カルス+不定芽
1	14	2	6	6
2	16	0	10	6
3	17	1	9	7
4	16	0	6	10
5	14	2	8	4

表 7 吾妻系における葉位別カルス及び不定芽形成状況

(単位:本)					
	葉位	供試数	カルスのみ	カルス+根	カルス+不定芽
伸長型	1	9	3	6	0
	2	16	8	6	2
	3	19	12	5	2
	4	15	9	1	3
	5	20	20	0	0
ロゼット型	1	6	0	0	6
	2	9	0	2	7
	3	9	1	0	8
	4	11	0	3	8
	5	11	1	0	10

表 8 供試材料の違いが不定芽形成と発根に及ぼす影響

		(単位:本)					
供試材料	供試数	カルスのみ	カルス+不定根	カルス+不定根 +不定芽(多い) ²⁾	カルス+不定根 +不定芽	発根	
北海道系	試験区1	19	0	10	4	5	17
	試験区2	20	0	0	18	2	19
矢巾系	試験区1	27	0	4	5	18	25
	試験区2	20	0	2	8	10	18

2) 不定芽(多い):不定芽が10本以上形成されたもの

考 察

組織培養は個体を迅速・大量に増殖することに適しており、茎頂培養によるウイルスフリー化技術と併せて、多くの品目が商業ベースで利用されている。岩手県において組織培養の実用化技術の開発はリンドウを中心に取り組んできた⁷⁾。一方、組織培養においては、再分化の難易に品種間差異があり、実用化の課題となっている⁷⁾。リンドウでは、系統間差異のみならず、系統内の個体間差異も克服すべき課題となっている³⁾。そこで本報告では、葉片培養を中心に効率的な再分化法について検討を加えた結果、以下の知見を得た。

まず、葉片培養においては、サイトカイニンの種類を検討した結果 TDZ を使用している。ほかのサイトカイニンとして BA などを使用したものの良い結果は得られなかった(表 1)。矢巾系で効果のみられた培地 GC2 を使用し¹⁾、他系統も供試した結果、北海道系、千沼ヶ原系、磐梯系でも変異のみられない不定芽形成が確認された(表 5)。葉片培養において、供試した培地 GC2 はサイトカイニンとして TDZ を使用し、カルス形成とシュート形成に他系統においても比較的効果が見られたことから、今後葉片培養からカルス化する培地として適当と考えられた。しかし、上記以外の系統には低効率な結果もみられた。さらに効果の高い濃度や他サイトカイニンも検討するため、難培養系統を供試して葉片培養における植物ホルモンの添加効果を検討した。その結果、IAW においてはシュート形成が認められ、カルス当りシュート形成数には改善の余地があるものの、葉片培養の適用について可能性が示された(表 1)。

しかし、その他の難培養系統で松尾系、吾妻系、白中生系はシュート形成が思わしくなく、培地の検討をさらに進めるか、葉片以外の組織を用いた培養手法の検討が必要と思われた。

次に、培養容器がカルス並びにシュート形成に及ぼす影響を調査した。試験管、シャーレおよびプラントボックスを比較した結果、プラントボックスが最も不定芽形成が良好だったものの(表 3, 図 1)、ビトリフィケーションも多く見られた。シ

ャーレの試験では試験 1 と 2 でシャーレ1枚あたりの置床数を減らすことで不定芽形成が見られ、シャーレ内の水滴量がかなり少なかったことから、培養容器内のエアレーションの変化は、カルス形成や不定芽形成に大きく影響するものと思われる(表 2, 3)。ビトリフィケーションは、容器内湿度と培養物の水分状態が関わっていることから、その後の試験では1容器内の外植体数を減らすことで改善がみられた。また、試験管、プラントボックスとも上下部に膨らんだカルス形態となるが、表面に小さな粒や突起物がみられる程度の小さいカルス形成しかみられなかった。本報告における試験結果からは、健全なシュートを形成させるためにも、培地当りの培養個体数が適正に保たれる試験管が培養容器として最も適切と判断した。

葉片の置床方法については、判然とした結果は得られなかった(表 2, 3)。置床方法で葉片を培地に差し込むか培地面に接触させるかは、培養作業実施者の判断で選択して良いものと思われる。

リンドウの親系統の選抜は種子由来の実生で行われるため、各系統で個体番号を多くもち、圃場において同一系統内でも個体間で生育差も見られることから、葉片培養におけるカルス化や不定芽増殖数など個体差の影響を確認した(表 4)。磐梯系においては個体間差で顕著な差がみられ、不定芽形成が可能な北海道系、矢巾系においても個体番号により、カルスあたりの不定芽形成数に差がみられた。こうした結果は、葉片培による増殖が困難な系統であっても選抜途中の個体によっては葉片培養による増殖の可能性を示すものと思われる。葉片培養による大量増殖では、供試材料として使用可能なものが随時供給できることが有効である。材料とする茎頂培養由来植物には、しばしば形態の異なる植物体が見られることがある。本報告ではシュートが上位に伸長していく伸長型と、基部に全ての葉がついており上位に伸長がみられないロゼット型としているが(図 3)、このような形態の異なるものも材料として使用可能か検討した。こうした材料植物の形態の違いは、茎頂培養の際に用いた越冬芽の生育ステージ(低温要求量など)などが影響すると思われるが、詳細についてはわかっていない。この形態の違いや葉位が

葉片培養に及ぼす影響を検討したところ、伸長型及びロゼット型両者においてカルス形成やカルスの状態、不定芽形成に対しての影響は特に見られず、変異も確認されなかった(表 7). 葉の採取葉位についても大きな差はみられず(表 6, 7), いずれの葉位も材料として使用するのに支障ないと思われる。

また、葉片培養由来のシュートから採取した葉片を増殖用供試材料として使用しても不定芽形成がみられ、形態的な変異なども認められなかった。発根への影響も特になく(表 8), 葉片培養の供試材料として使用可能と判断される。

葉片培養による増殖において、材料とする茎頂培養由来植物の葉位や植物形態に関係なく、さらに葉片培養による増殖個体が培養材料として利用可能であるなど、幅広く材料が供給可能であり、今後大量増殖を行うための有効な手段と考えられる。

第三章 越冬芽を用いた増殖手法の検討

材料および方法

1 越冬芽を用いた増殖方法

越冬芽は形態的には腋芽の集合体⁹⁾であることから、この組織を用いたシュート増殖が可能か検討を行った。

(1)越冬芽の萌芽の状態と調整方法が不定芽誘導に及ぼす影響

供試材料は、千沼ヶ原系の葉片培養由来の個体に形成された越冬芽と展葉した越冬芽(図 4)を用いた。



図 4 展葉していない越冬芽(左)と展葉した越冬芽

材料の調整方法は、以下のとおりである。

- a 展葉した越冬芽を1節含み、2-3mm 厚にカットした組織
- b 展葉した越冬芽を1節含み、5mm 厚にカットした組織

c 展葉していない越冬芽を 5mm 厚にカットした組織
なお、展葉した越冬芽から調整した上記 a, b の組織は、以降「越冬芽ディスク」と称する(図 5①)。

培地は GC2 を用い、ショ糖およびゲランガム添加濃度、使用試験管、培地量は前記 II-1 のとおりとした。

培養条件は、培養開始 3 日間は 23°C、暗所で培養し、その後 23°C、16 時間日長、3,500lx とし、3 カ月後に不定芽形成状況を調査した。

(2)越冬芽ディスク培養の不定芽誘導における系統間差異

松尾系、矢巾系、吾妻系を供試し、千沼ヶ原系を対照区とした。培地組成および培養条件は、II-1 に準じ、3 カ月後に不定芽形成状況を調査した。

(3)越冬芽の径が不定芽誘導に及ぼす影響

材料は、矢巾系(Y5.1.4No.2)の不定芽を 15°C、16hr 日長で越冬芽形成させ、少し展葉を開始した状態のものを使用した。越冬芽ディスクの径は 2mm 以下のものと 5mm 前後のもの(図 5②)を用いた。培地組成および培養条件は、II-1 に準じ、2 カ月後に不定芽形成状況を調査した。

結 果

1 越冬芽を利用した増殖方法

(1)越冬芽の萌芽状態と調整方法が不定芽誘導に及ぼす影響

展葉した越冬芽を用いた場合は、越冬芽ディスクの厚さが 2~5mm の範囲ではカルス形成並びに不定芽誘導が可能であり、ディスクの厚さによる不定芽形成に大差はなかった(表 9). 展葉していない越冬芽を用いた場合は、カルス形成せずにそのままシュートとして伸長した場合があった。

(2)越冬芽ディスク培養における不定芽誘導の系統間差異

千沼ヶ原系以外の系統も供試し、同様な条件で培養した結果、すべての系統でカルスが形成された(表 10). また、葉片培養で不定芽の形成が困難であった松尾系、吾妻系を含むすべての系統で不定芽の誘導が可能であった(表 10).

(3) 越冬芽の径が不定芽誘導に及ぼす影響

越冬芽の径が不定芽形成に及ぼす影響については、径の細いものでも、十分不定芽誘導が可能であった(表 11).

考 察

葉片培養では再分化個体が得られない場合があったため、腋芽の集合体である越冬芽に着目し、増殖方法を検討した。

千沼ヶ原系において越冬芽の節を含む5mm厚程度にカットした越冬芽ディスク(図5)を材料としたカルスからの不定芽誘導を試みたところ、良好な結果が得られた(表9)。この手法を他系統に適用した結果、いずれの系統も高頻度で不定芽誘導が可能であり、カルスの形状や形成期間、不定芽が形成するまでの期間は葉片培養とほとんど変わらなかった

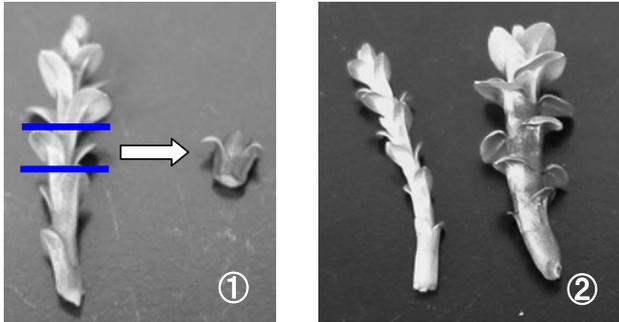


図5 ①展葉した越冬芽(左)と調製後の越冬芽ディスク
②径2mm以下(左)と径5mm前後の展葉した越冬芽

た(表10)。また、培養に供する越冬芽の径はカルスや不定芽形成に大きな影響を与えなかった(表11)。低温培養では細い径の越冬芽が多数形成される場合もあることから(図6)、材料確保の面においても、越冬芽の形態に影響されない本方法は増殖手法の多様化につながると考えられる。

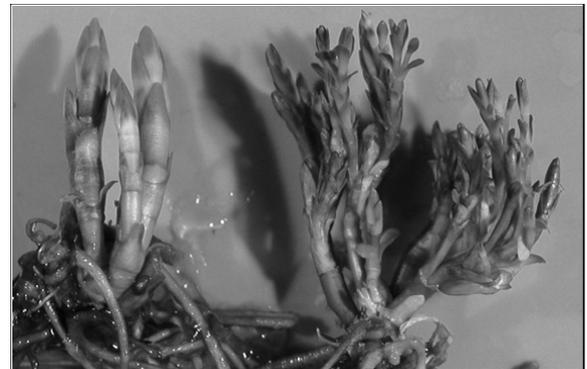


図6 越冬芽の形態

表9 千沼ヶ原系における越冬芽を利用した不定芽誘導

試験区	材料の調製方法	供試数	カルス+不定芽形成			シュートのみ形成	変化無し	増殖不定芽数(本/カルス)
			1本	2-5本	5本≤			
a	展葉した越冬芽を1節含み2-3mm厚にカットした組織	5	0	5	0	0	0	9.4
b	展葉した越冬芽を1節含み5mm厚にカットした組織	8	2	6	0	0	0	14.5
c	展葉していない越冬芽を5mm厚にカットした組織	5	0	0	0	3	2	-

表10 越冬芽ディスク培養の不定芽形成状況

供試系統	試験区	供試数	カルスのみ	カルス+根	カルス+不定芽			枯死	総増殖不定芽数(本)
					1本	2~5本	5本≤		
松尾系	a	10	0	9	0	1	0	0	16
	b	10	0	4	0	6	0	0	19
吾妻系	a	10	9	0	1	0	0	0	1
	b	10	3	3	1	2	1	0	17
矢巾系	a	10	2	6	1	3	0	0	12
	b	10	0	0	2	5	3	0	51
千沼ヶ原系(対照)	a	10	0	6	4	0	0	0	15
	b	10	0	2	1	5	2	0	30

注) 試験区 a: 萌芽した越冬芽を1節含み、2-3mm厚にカットした組織
b: 萌芽した越冬芽を1節含み、5mm厚にカットした組織

表11 越冬芽の径がカルスの状態及び不定芽形成に及ぼす影響

越冬芽径	供試个体数(本)	カルスの状態(%)			カルス当たり平均不定芽数(本)
		カルスのみ	カルス+根	カルス+根+不定芽	
2mm以下	10	0	10	90	17.1
5mm前後	10	10	10	80	13.7

第IV章 振とう培養手法の検討

材料および方法

材料は北海道系、千沼ヶ原系、矢巾系に加え葉片培養が困難な吾妻系、松尾系を供試した。初めに、茎頂培養由来の幼植物体をシヨ糖 3%およびゲランガム 0.2%を添加したMS培地に移植し、15°C、16時間日長、3000luxで4か月培養し、越冬芽を形成した幼植物体を液体培地へ継代培養した。基本培地はMS培地とし、ホルモンフリーのものBAを0.01mg/l加えたものを供試し、シヨ糖はいずれも3%とした。松尾系についてはホルモンフリー培地でのみ検討した。培養容器は300mlの広口フラスコを用い、培地を100ml分注した。培養条件は23°C、16時間日長とし、120rpmに設定した振とう培養機で培養し、2か月後増殖状況を調査した。

結果

供試したいずれの系統でも液体振とう培養によるシュート増殖が可能であり、葉片培養では増殖が困難な吾妻系や松尾系であっても越冬芽を材料にした液体振とう培養により増殖が可能であることを確認した。またBAの添加効果は認められず、ホルモンフリーでも十分なシュート増殖が可能であった(表12)。

表12 液体振とう培養における培地別分枝数

系統名	培地 ²⁾	培養 フラスコ数	フラスコ当り 分枝数 (本)
北海道系	HF	4	22.5
北海道系	BA0.01	3	24.3
千沼ヶ原系	HF	5	15.8
千沼ヶ原系	BA0.01	5	9.8
矢巾系	HF	3	32.7
矢巾系	BA0.01	4	28.3
吾妻系	HF	7	14.3
吾妻系	BA0.01	7	11.2
松尾系	HF	3	41.3

2) HFはホルモンフリー、BA0.01はBA0.01mg/l添加

考察

越冬芽を供試材料に用いた液体振とう培養を実施した結果、葉片培養では増殖が困難な吾妻系、松尾系の両系統とも増殖させることが可能となった(表12)。リンドウの液体振とう培養では、ポラーノホワイトを供試材料に腋芽をつけたシュートを節毎にカットしたものを用いて増殖する手法¹⁰⁾が確立されており、この手法に準じて矢巾系などのエゾリンドウで検

討したが、増殖効率は低かった。しかし今回材料として用いた越冬芽は、元来短縮した各節にわき芽を有しているため、振とう培養によりこのわき芽が伸長してくることから、増殖量も多く、越冬芽形成が可能な系統であればこの手法は適用可能と思われる。液体振とう培養は、顕微鏡を用いた細かな培養技術などを必要としないため、培養初心者でも可能な技術である。しかしこの方法は振とう培養機の使用が前提となること、一度越冬芽を形成させてから増殖することなどから、葉片培養や越冬芽ディスク培養と比較してコストが嵩むことや培養期間が長い点が短所として挙げられるため、期間やコストなど増殖環境を考慮した上で他の増殖法などと組み合わせ使用するのが有効と思われる。

第V章 越冬芽形成と長期維持の検討

材料および方法

1 15°C培養での越冬芽形成における系統間差

エゾリンドウ系は培養中に花芽形成がおこり越冬芽が形成されずそのまま枯死する個体が多い。しかし矢巾系では不定芽を15°Cで低温培養すると越冬芽を形成し、維持が可能となっていることから¹⁾、他の系統においてこの手法が適用できるか検討した。供試系統は北海道系、吾妻系、千沼ヶ原系、松尾系、磐梯系、白中生系、IAW系とし、対照区として矢巾系を用いた。

供試材料は、茎頂培養により23°C、16時間日長、4500luxで育成した幼植物体で花芽形成が見られず発根しており、生育が良好なものを供試した。培地はMS培地にシヨ糖3%、ゲランガム0.2%を加えたもので、15°C、16時間日長、3500luxで4か月培養し、越冬芽形成の有無を調査した。

2 15°C培養における越冬芽の保存状況の確認

不定芽を15°Cで長期間保存するため、保存条件の検討を行った。

供試材料は矢巾系及び北海道系の茎頂培養由来の不定芽で、23°C、3か月間、MS培地の無機塩類を1/2とし、シヨ糖3%、ゲランガム0.2%を添加した培地(以後1/2MS培地)に置床し発根させたものを使用した。

試験区の培地はMS培地および1/2MS培地を用い、シヨ糖濃度は3%、6%、9%添加区を設けた。ゲランガムはいずれも0.2%とし、培養容器は試験管を用いた。培養条件は、15°C、16時間日長、3,000lxとし、試験開始4か月後越冬芽の形成数などを調査した。

結 果

1 15℃培養での越冬芽形成における系統間差

15℃培養での越冬芽形成は、供試した全ての系統で確認された(表 13)。23℃培養では、矢巾系を除く系統においては越冬芽の形成は認められなかった。

2 15℃培養における越冬芽の保存状況の確認

矢巾系、北海道系ともに15℃での越冬芽形成が確認された。しかし、培養期間が長くなると矢巾系は、越冬芽の状態から萌芽するものが多かった(表 14, 図 7)。培養物の外観は、ショ糖が多いほど越冬芽や根の色は濃い紫色になる傾向に

あった。

北海道系は、花芽形成による枯死率が非常に高く、越冬芽の形成に至ったものはわずかであった(表 14)。

考 察

継代培養の省略による労力軽減を図るため、越冬芽形成後15℃での培養により2か月間維持可能との報告⁸⁾に基づき、組織培養中に形成された越冬芽を、長期に維持する手法を検討した。その結果、低温培養において矢巾系の他、7系統でも同様に越冬芽形成が確認されたため、15℃での保存が親系統維持の有効な手法と判断できる(表 13)。

表 13 15℃培養における各系統の越冬芽形成状況

系統名	培養温度 (℃)	供試数 (本)	越冬芽形成数 (個/本)	越冬芽形成率 (%)	花芽形成率 (%)
北海道系	23℃	20	0.1	5	50
	15℃	30	4	93	0
吾妻系	23℃	10	0	0	40
	15℃	110	4.6	89	0
千沼ヶ原系	23℃	25	0.1	8	0
	15℃	88	4.6	91	0
松尾系	23℃	10	0	0	10
	15℃	28	3.6	87	0
磐梯系	23℃	12	0	0	0
	15℃	27	2.1	63	0
白中生系	23℃	25	0	0	44
	15℃	25	1.5	56	0
IAW系	23℃	27	0	0	59
	15℃	25	1.2	72	0
(対照区)					
矢巾系	23℃	17	0.2	12	20
	15℃	57	4.2	89	0

表 14 葉片培養由来不定芽の15℃保存における培養状況

系統名	試験区	基本 培地	ショ糖 (%)	供試不定芽 数 (本)	枯死 数	枯死率 (%)	葉片当り保存状況			
							越冬芽形成数		萌芽した越冬芽数	
							1~9 (本)	10≦ (本)	1~9 (本)	10≦ (本)
矢巾系	1	1/2MS	3	29	4	13.8	1	0	19	3
	2	1/2MS	6	41	4	9.8	0	0	28	7
	3	1/2MS	9	37	5	13.5	10	3	16	3
	4	MS	3	53	7	13.2	0	0	39	7
	5	MS	6	70	12	17.1	0	0	12	36
北海道系	1	1/2MS	3	21	16	76.2	1	0	-	-
	2	1/2MS	6	6	6	100	0	0	-	-
	3	1/2MS	9	19	18	94.7	1	0	-	-
	4	MS	3	28	20	71.4	8	0	-	-
	5	MS	6	37	33	89.2	4	0	-	-

注 1) 1/2MSはMS培地の無機塩量を1/2とした培地。
2) ゲランガムはいずれも0.2%とした。



図7 矢巾系の 15°C保存における培養物の状況

左 試験区①(展葉したもの) ; 右 試験区②

また、不定芽から越冬芽へ誘導するため、不定芽を 15°C で保存したところ、4 か月後の調査では、矢巾系での越冬芽形成率は萌芽したのもも含めて 68.6~86.8%と高率であった(表 14, 図 7)。これらはその後徐々に萌芽はしたものの、展葉にまでは至らなかった。基本培地は、表 14 の結果から、経済性も考慮し MS 培地ではなく発根培地でも使用する 1/2MS で十分と思われたが、ショ糖濃度については保存する期間の長短により、長期の場合は 9%にするなど調整の必要があると思われた。

一方、北海道系については枯死率が 71.4~100%と非常に高かった。北海道系の枯死率の高い一因として培養中の開花が挙げられた。北海道系は早生系統であるためか、通常 23°C で培養していても晩成系統の矢巾系に比べて開花が早く、開花後培養中に枯死してしまうことも多い。北海道系について、今回供試した不定芽は、葉片培養後の不定芽を発根させて使用しているため、長期間の培養となっており、試験開始時点ですでに生殖成長が始まっていたものと考えられる。そのため開花しやすい系統の維持については、長期培養を回避して発根後すぐにショ糖濃度の高い培地に継代する、現在の培養温度 23°C を少し下げて低温で培養する、もしくは茎頂培養開始時点から温度を 10°C などの低温にするなど培養温度についても検討し、培養開始時期を順化時期から逆算して設定する工夫により維持が可能と思われる。

第VI章 効率的な発根・順化技術の検討

材料および方法

1 効率的発根方法の検討

北海道系、矢巾系、磐梯系およびえぞ早生系の葉片培養由来のシュートを用いて発根方法を検討した。

培地組成は、1/2MS 培地のみと(試験区 a)、対照区として、MS 培地に NAA を 0.01mg/l 添加した区(試験区 b)を設定した。ショ糖およびゲランガムはいずれの区もそれぞれ 3%および 0.2%とした。

2 順化条件の検討

培養により増殖したシュートの順化条件の検討を行った。

発根培地(1/2MS 培地、ショ糖 3%、ゲランガム 0.2%)に 23°C、16 時間日長、4500lux で 1 カ月間置床し、発根させたシュートはゲランガムをよく洗い流した後順化处理を行った。

移植床には 72 穴セルトレイにリンドウ培土を詰めて十分に吸水させたものを使用した。その後の管理方法として 2 つの試験区を設定した。試験区 a は、移植後育苗温室(15~25°C)で管理した。順化開始後 3 日間はポリエチレン袋で被覆し乾燥を防ぎ、1日 3 回ミスト灌水を行った。被覆をはずした後も育苗温室で同様に管理し、1.5~2 か月後にリンドウ培土を用いて 2.5 号鉢に鉢上げをした。

試験区 b は、試験区 a と同様、シュートを調整後セルトレイに移植し、その後直射日光のあたらない屋内で底面灌水を行い、順化開始 1 週間はビニール袋などで被覆し温室状態にした。その後 2~3 日間ビニールの開閉操作をした後除去し、順化開始 10 日から 2 週間後に育苗温室(15~25°C)へ移した。移動後は 1 週間遮光(シルバータフベル 40%遮光)

した。1.5～2 か月後に、リンドウ培土:十和田砂を1:1に調整した用土を用いて2.5号ポットに鉢上げをした。

考 察

発根手法については、1/2MS 培地の場合のみは、MS 培地+NAA 添加の培地に比較しコストも係らず、従来処方と遜色ない発根率を確保でき、しかも順化に適した細根が良く発生したことから、発根培地には本手法を適用と考えられた(表 15, 図 8)。

順化については、試験区 a で順化条件が厳しかったと考えられる部分を改善し、試験区 b では乾燥に弱いリンドウのシュートに対し湿度を保てるよう底面灌水に変更し、ビニールで密閉して高湿度を保つと共に遮光することにより、順化効率が 88.9%まで上がった試験区 b が適すると考えられた(表 16)。

結 果

1 効率的発根方法の検討

発根率には大きな差は見られなかったが(表 15)、試験区 2 において外観上は、順化に適した細根が多数見られた(図 8)。

2 順化条件の検討

試験区 a については、44.5%、試験区 b については、89.9%の順化効率であった(表 16)。

表 15 各系統の各種発根培地における発根状況

供試系統	試験区1		試験区2	
	供試数 (本)	発根率 (%)	供試数 (本)	発根率 (%)
北海道系	89	94.4	69	97.1
矢巾系	95	95.8	130	96.7
磐梯系	68	82.3	78	88.2
えぞ早生系	37	81.1	30	83.3

注) 試験区1:MS培地, ショ糖3%, NAA0.01mg/l, ゲランガム0.2%
試験区2:1/2MS培地, ショ糖3%, ゲランガム0.2%
発根率は発根した個体数/供試数×100

表 16 各試験区における順化状況

	供試数 (本)	順化数 (本)	順化率 (%)
試験区1	222	99	44.5
試験区2	236	212	89.9

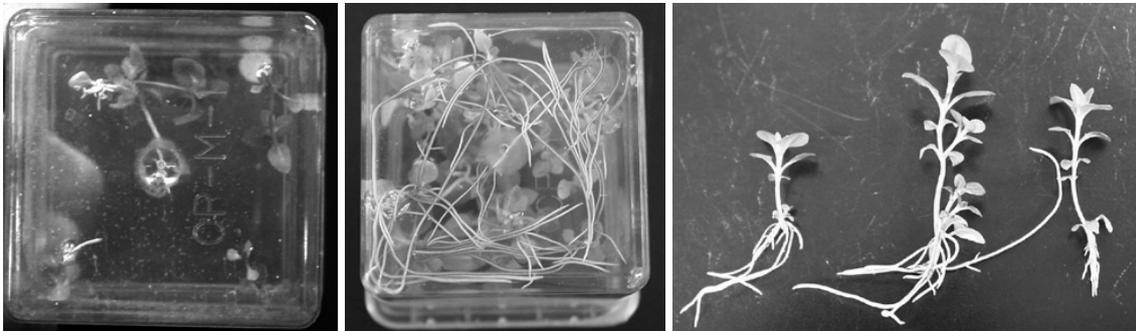


図 8 矢巾系における発根状況(培養開始 1 か月後)

左:試験区 1 ; 中:試験区 2 ; 右:左から試験区 2, 2, 1

第七章 総合考察

1 各増殖手法を用いた培養増殖ならびに維持法

ササリンドウの栄養繁殖系においては、節挿し方法により増殖が可能であったが、エゾリンドウでは節挿しによる増殖が困難であった¹³⁾。しかし II～IV 章に示したとおり、葉片培養、越冬芽ディスク培養、液体振とう培養のいずれかの培養法を用いることにより供試したほとんどの系統で増殖が可能であった。低温培養による越冬芽形成と維持は、越冬芽ディ

スク法や液体浸とう培養法を用いた増殖法の材料としてだけでなく増殖スケジュールの効率性や増殖作業労力の平準化に有効な技術と考えられる。一般に培養増殖の材料として利用されている葉片や腋芽だけでなく、越冬芽を用いることが可能となったことは、増殖系統や、供試材料の選択肢が増え、今後新たな系統を検討する際や大量増殖する場合にも有益な知見と思われる。しかし、現在これらの手法で増殖できない系統もみられるため、今後温度や光などの環境要因や内生ホルモンなども含め、さらなる検討が必要と思われる。

2 培養難易の系統間差異の整理

表 17 に、今回供試した 15 系統(長野系, ENG 系についてはデータの詳細なし)について培養手法毎の適用性を整理した. 表には示していないが, 個体毎の維持・増殖の可否も把握しており⁴⁾, 今後の培養において個体毎に最適な手法の選択に資するものと期待される.

今回供試したほとんどの系統では、本報告で検討したいずれかの手法で培養・増殖することが可能となったが、長野系 ENG のように全く適用できないものもあった(表 17). こうした系統については、次項 3 で述べるとおり培地組成の再検討や、サンプル採取時期など、本報告で検討しなかった条件を詳細に試験する必要がある.

表 17 系統毎の培養適用性

系統名		培養適用性 ²⁾				
		節挿し	葉片	越冬芽形成	越冬芽ディスク	液体振とう
吾妻系	a	やや難	やや易	難	やや難	やや易
	b	やや難	やや易	難	やや難	やや易
	c	やや難	やや難	難	難	やや易
	d	難	難	難	難	中
えぞ早生系	a	中	中	やや易	中	やや易
北海道系	a	難	やや難	中	難	やや難
	b	難	難	やや難	難	やや難
松尾系	a	やや難	極難	やや易	やや難	やや易
矢巾系	a	中	中	やや難	中	やや易
	b	やや易	やや易	やや難	中	やや易
千沼ヶ原系	a	やや易	やや易	やや難	やや難	やや易
磐梯系	a	易	易	中	中	やや易
白中生系	a	難	難	難	難	やや易
IAW系	a	難	中	—	—	—
長野系	a	—	—	—	—	—

2) 各種培養適用性の難易は、相対的な達観評価である.

3 組織培養を利用した種苗生産システムと課題

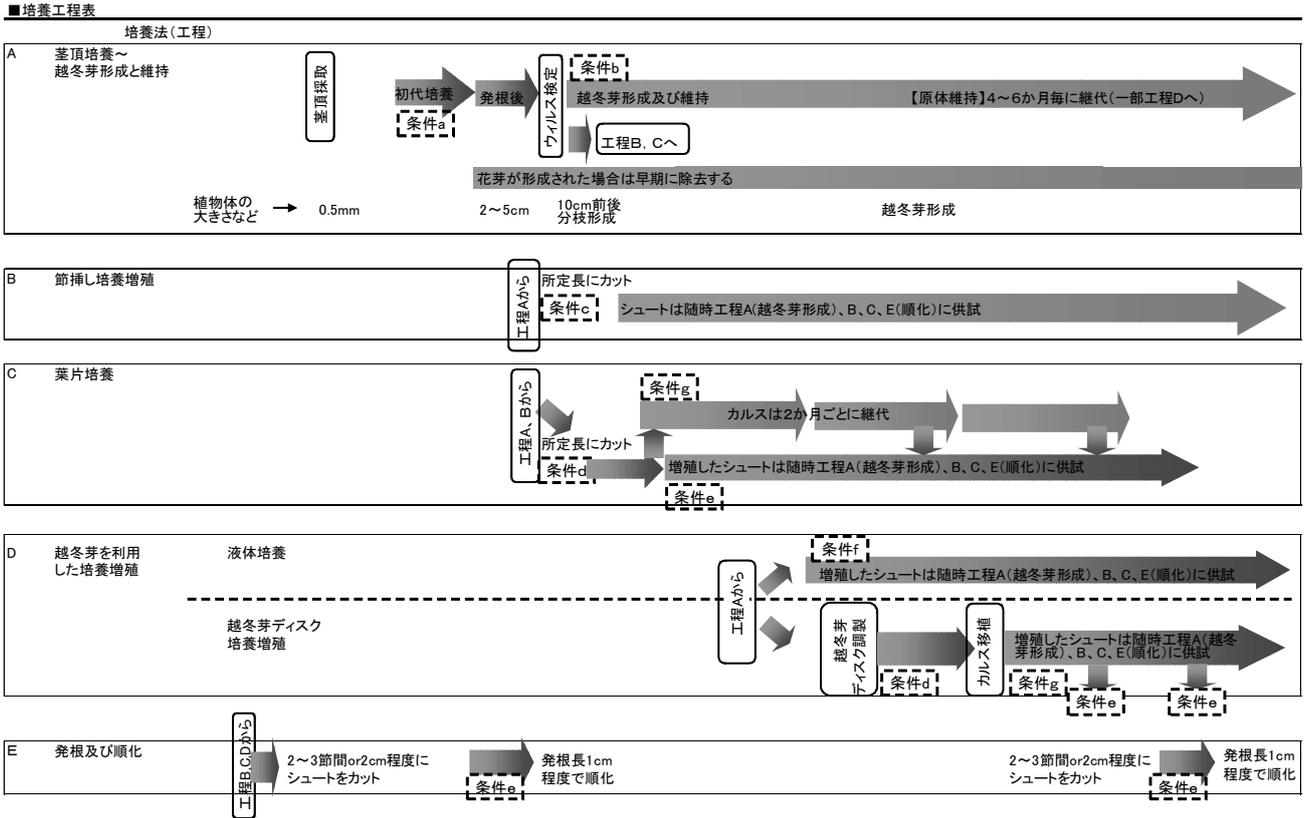
培養工程について図 9 にとりまとめた. 今後新規親系統を培養に供する場合, 作業の流れの把握や, 培養手法の選択について参考になるものと思われる. 手法としては, 詳細は記載していないが, 親系統の増殖に際しては, 必ずウイルスフリー化のチェックを行い, 葉片培養法, 越冬芽ディスク法, 液体振とう培養法, さらに低温培養による維持法を適宜組み合わせることで, 年間を通した親系統の維持並びに増殖スケジュールを立案できると思われる.

今後の培養手法の課題としては, 系統間でも増殖に個体差がみられる場合もあることから, 培養を不安定にする要因を抑え, より効率的な高増殖条件を解明することである. 特に, 枯死の主因となっている早期開花を抑制するため, 培地の炭素/窒素比, ホルモン濃度の組合せと添加濃度, 低温下(15℃, 10℃など)での培養, 茎頂採取時期の影響などが今後解明すべき課題といえる. また, 培養中に形成される越冬芽は, 増殖のための培養素材として有用であることから, 効率的な形成方法について条件の確立が求められる. 越冬

芽形成については, 圃場において日長や温度の直接的な関係よりも植物体内の栄養条件やホルモン供給の変化が大きく関わるとの報告があることから⁹⁾, 培養中における培養物の生理的变化と越冬芽形成の関係についてさらに検討することが, 効率的な越冬芽形成法や長期間における維持の解明につながるものと期待される.

組織培養による原体維持については, 圃場での維持よりも労力は軽減できるものの, 今後も新たな交配親の育成などにより遺伝資源の増大が見込まれることから, 一層の省力化・低コスト化・省スペース化を図ることが必要である. 培養系が確立されている系統・個体については, 近年多くの品目で実用化が進み, リンドウでも基礎技術が確立されている超低温保存法¹¹⁾の適用性について明らかにすることが望まれる.

また, 今後新規親系統が供試された場合に, 最適培養条件を速やかに選択できる手法, 例えば近年著しく技術が進展している遺伝子情報解析からのアプローチも検討の価値があるものと思われる.



■ 培養条件等

条件	培養条件		培地					pH	摘要
	温度 (°C)	日長 (hr)	基本培地 ¹⁾	ショ糖 (%)	ゲランガム (%)	NAA (mg/l)	TDZ (mg/l)		
a	23	16	1/1	3	0.2	0.01	-	5.7	長期保存の場合はショ糖6%
b	15	16	1/1	3	0.2	-	-	5.7	
c	15～23	16	1/2	3	0.2	-	-	5.7	
d	23	15	1/1	3	0.2	0.5	10	5.7	100～120rpm回転振盪
e	23	16	1/2	3	0.2	-	-	5.7	
f	15～23	16	1/1	3	-	-	-	5.7	
g	23	16	1/1	3	0.2	-	-	5.7	

注 1) MS培地を使用。1/1=通常処方, 1/2=無機塩量1/2。

図9 リンドウ培養行程の概略図

謝 辞

本研究は、旧応用生物工学研究室主任専門研究員多田徹氏(平成12年没)が開発した葉片培養培地を基礎として改良を重ねたものである。その業績に敬意を表するとともに心よりご冥福をお祈りする。また、本研究の遂行にあたり、旧応用生物工学研究室実験助手の神崎英子、斉藤文恵、藤原美枝子諸氏には多大なる御協力を頂いた。ここに記して篤く御礼申し上げる。

引用文献

1) 岩手県農業研究センター試験研究成果書, 1999, “組織培養によるリンドウ採種用親系統「矢巾系」の維持・増殖

法”, 研-13.

2) 同上, 2000, “リンドウ採種用親系統の葉片培養による増殖法”, 研-15
 3) 同上, 2001, “葉片培養によるリンドウ採種用親系統(北海道系, えぞ早生系, 矢巾系, 磐梯系)の増殖法及び順化技術”. 指-36
 4) 同上, 2006, “岩手県オリジナルリンドウ F1 品種採種用親系統の組織培養による維持・増殖システム”. 指-38
 5) 同上, 2007, “岩手県オリジナルリンドウ F1 品種採種用親系統の組織培養による維持・増殖システム”, 指-37
 6) 岩手県農林水産部農産園芸課, 2009, “花きに関する資料”
 7) 花き試験研究成績概要集, 1988, “リンドウの大量増殖(2)茎頂近傍組織の培養による大量増殖”, 岩手県-4.

- 8) 佐藤光子, 1991, 園芸要旨平成3年東北支部, 53-54
- 9) 佐藤祐則, 小野恵二, 勝木謙蔵, 岡崎幸吉, 1988, “リンドウの越冬芽の発生・発育とさし芽法”山形園試報, 24-39
- 10) (財)岩手生物工学研究センター 平成6年度研究成果集, 6-7
- 11) 田中大介, 2006, リンドウ培養茎頂, “植物超低温保存法マニュアル”, 新野孝男・平井泰・松本敏一・田中大介編, 農業生物資源研究所, 茨城県つくば市, 81-84.
- 12) 平成7年度普及症例事項および指導上の参考事項, 14-15
- 13) 野菜花き部花き関係試験成績書, 1996, 4-5

Tissue culture techniques for *Gentiana* spp. for seed production.

Nobue HOSHI, Toshikazu TAKESAWA, Jun ABE and Tsutomu SASAKI

Summary

The Gentian varieties cultivated by Iwate Prefecture are almost all F1 hybrids, so it requires a great deal of labor to maintain and multiply the parent stock and its selfed recessive traits. To that end, we tried to produce seeds using tissue culture methods, which can be more efficient and less laborious for parent stock maintenance and multiplication when compared to field cultivation. We tested leaf culture, overwintering bud disk culture, and liquid shaking culture techniques. Callus and shoot formation is possible through leaf cultures when explants are cultivated with a GC2 culture medium (a mixture of 0.5mg/l naphthalene acetic acid, 10.0mg/l thidiazuron, and 3% sucrose) added to a MS medium. We also examined family/genealogical line differences, individual differences, and the condition of the explant. Additionally, we took the overwintering buds formed through the cultivation process and cut a 5mm thick slice that included a bud node (called an overwintering bud disk). Callus and shoot formation occurred when cultivating the slice in the GC2 medium. We subcultured the seedlings that formed that overwintering buds in a hormone-free MS liquid medium, and a shaking culture performed at 120rpm encouraged growth. Furthermore, cultivating the shoots produced by the leaf culture at a 15° C temperature promotes the growth and preservation of overwintering buds. By combining all of the above techniques, tissue culturing is seen to be practicable throughout the whole process flow, promoting growth, preservation of family lines, and root acclimation (except for a few family lines). Then we integrated all of these techniques together and devised a work schedule of actual seed production using these techniques, and determined the difficulty levels of the various family lines and tissue culture techniques. From the above research, we can expect that Gentian seed production using tissue culture techniques will contribute to a reliable supply of superior seeds and the promotion of efficient plant breeding, along with stable management for Gentian farmers and the development of Gentian production centers.

Key words : *Gentiana* spp., seed production, tissue culture, leaf culture, winter bud culture .