

キク葉片培養における光源の光質が不定芽誘導に及ぼす影響

玉利光男・藤川和博・白山竜次

要 約

キク葉片培養からの不定芽誘導に適する光質を調査した。キク品種‘きゅらシューサー’、‘神馬’2号、‘新神’、‘サザンチェルシー’、‘サザンペガサス’、‘サザンサマーピンク’および‘モゼマゼンタ’の、葉片からの不定芽誘導処理に使用する光源として、遠赤色LED、赤色LED、青色LED、紫外線LED、昼光色蛍光灯および暗黒条件で検討した。その結果、従来の昼光色蛍光灯下による葉片培養で不定芽誘導数が少ない品種であっても、赤色LED等に光源を変えることで不定芽誘導数が向上することが明らかとなった。

キーワード：LED、蛍光灯、紫外線、神馬、赤色光

緒 言

キクは、全国の切り花生産量の40%を占める花きの主要品目である⁹⁾。鹿児島県は全国有数の花き生産県であり、消費者ニーズに対応した花きブランド産地の育成を推進している⁵⁾。中でもキクは栽培面積、出荷本数とも最も多い品目であり、全国3位の生産面積を誇る⁵⁾。鹿児島県農業開発総合センターでは、2003年度より本県オリジナルスプレーギク品種の育種を始め、現在スプレーギクで63品種、輪ギクで6品種、小ギクで98品種が育成されている（未登録品種含む）。これらの品種は主に交配育種で育成されたが、花色等特性のワンポイント改良には突然変異育種が活用されている。

上野ら¹⁵⁾は、無菌培養葉片を不定芽誘導培地に置床し、葉片表面の各細胞から初期分裂が始まる前のタイミングでイオンビームを照射した。この手法は、変異を誘発した個々の独立する細胞に由来した不定芽が得られることから、花色等可視的な変異体に限らず低温開花性等、生理・生態的な変異の選抜が可能になる^{8), 13), 14)}。この手法により、今給黎ら⁴⁾は、秋輪ギク‘神馬’にイオンビームを照射し、再生させた植物体から‘神馬’の諸形質を変えることなく、無側枝性を持つ‘新神’（農林水産省品種登録第14118号）および‘今神’（農林水産省品種登録第14119号）を得ることに成功した。

一方、変異誘発やゲノム編集等培養系を活用した品種改良では、植物体再生率や再生数の安定化がその成否を大きく左右する。しかし、不定芽誘導については品種間差が大きいことから、従来、外植体として利用する部位や培地に添加する植物ホルモン等の種類や濃度、処理期

間などを中心に検討されてきた^{3), 6), 11), 15)}。通常、キクを含む植物培養における光源には蛍光灯を使うのが一般的である^{11), 12)}。これに対して、タバコ等のカルス培養における蛍光灯からの青色～近紫外光の影響²⁾、イチヨウの花粉培養における近紫外光、緑黄光の影響⁷⁾など、培養時の光質の影響についても報告がある。

そこで本研究では、キクの葉片培養において、波長の異なるLED光、蛍光灯光および暗黒条件で不定芽を誘導し、不定芽誘導における光質の影響を明らかにすることにより、植物体再生効率の向上を検討した。

試験材料および方法

1 秋スプレーギク‘きゅらシューサー’葉片培養におけるLED光光質が不定芽誘導に及ぼす影響（試験1）

供試材料として本県育成スプレーギク‘きゅらシューサー’を使用した。2018年4月20日に‘きゅらシューサー’無菌植物培養葉片（2mm×4mm）を、9cm径ポリスチレン製シャーレ（深型滅菌シャーレ、アテクト）に、不定芽誘導培地（MS培地；IBA：5mgL⁻¹、BA：1mgL⁻¹、スクロース30g⁻¹、ゲランガム3g⁻¹、pH5.8）を約25mL分注し、葉裏が上になるように10枚ずつ置床した。培養条件は5種類の光源（表1）を用い、16時間日長および暗黒条件で、設定温度26℃の培養室で管理した。光源は、遠赤色（FR）LED、赤色LED（AG-R450、エルム）、青色LED、紫外線LED（各試作品、エルム）および三波長型昼光色蛍光灯（EFD15ED/12EV-E26、YAMAZEN）を使用した。各光源下35cmに6枚のシャーレを2×3枚の長方形に密接して並べた。葉片の置床40日後に葉片からの不定芽誘導数を実体顕微鏡下で数え、その後、不定芽伸長培地（MS培地；NAA：

0.01mgL⁻¹, BAP : 0.05mgL⁻¹, スクロース 30gL⁻¹, ゲランガム 3gL⁻¹, pH5.8) 48mL を分注したガラス製 450mL 培養瓶に, 5 切片ずつ計 60 切片をシャーレから移し替えた. 培養瓶は昼白色蛍光灯下 16 時間日長, 設定温度 26 °C の培養室で培養し, 培養 20 日後の伸長不定芽数, 異常 (水浸状) 数, 枯死した不定芽数を調査した.

本研究では, 不定芽誘導における培地の影響を排除し, 光質による要因のみとするため, 培地の植物ホルモン組成は共通でなく, 各供試品種毎にそれぞれ適すると明らかとなっている組成を選択した.

表 1 各光源の平均放射照度

光源	FR-LED	赤色 LED	青色 LED	紫外線 LED	昼白色蛍光灯
ピーク波長 (nm)	730	625	475	370	-
放射照度 (W・m ⁻²)	2.5	1.8	1.5	-	1.7
UV-A放射照度 (mW・m ⁻²)	3.1	0.0	0.0	531.7	21.2
UV-B放射照度 (mW・m ⁻²)	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0

注 1) 計測 : DeltaOHM HD2102.2 プローブ : LP471RAD (400-1050nm), LP471UVA (315-400nm), LP471UVB (280-315nm), 各区シャーレの中心にプローブをおいて計測した値の平均値, 光源からプローブ上面までの距離は約 31cm

2) シャーレ上蓋の透過率は通常光で約 98 %, UV-A で約 80 %, UV-B で約 50 %

2 キク葉片培養における UV-B が不定芽誘導に及ぼす影響 (試験 2)

試験 1 の結果から, 波長の短い紫外線が培養葉片の不定芽誘導に抑制的に働いている可能性が示唆された. そこで, UV-B 領域の光を減衰するガラス製のシャーレと UV-B 光を透過しやすいポリスチレン製シャーレを使い, 不定芽誘導に対する影響を調査した.

供試材料は, 輪ギク '神馬' 2 号, 県育成輪ギク '新神', 県育成スプレーギク 'サザンチェルシー', 'サザンペガサス' および 'モゼマゼンタ' の 5 品種を用いた. 2018 年 7 月 13 日に上記 5 品種の無菌植物から培養葉片 (2mm × 4mm) を, 9cm 径シャーレに不定芽誘導培地 (スクロース 30gL⁻¹, ゲランガム 3gL⁻¹, pH5.8) を約 25mL 分注し, 葉裏が上になるように 10 枚ずつ置床した. 培地に添加した植物ホルモンは表 2 のとおりである. 培養条件は, 2 種類の光源下 (表 3) 35cm (昼白色蛍光灯は 33cm) に 16 時間日長および暗黒条件で, 設定温度 26 °C の培養室で 40 日間培養し, 不定芽誘導数を実体顕微鏡下で数えた. 光源は, 昼白色蛍光灯 (FLR40S-EX-N/

M36-A, 日立) および昼白色 LED (LDA4N-G-K/40W, 東芝) を使用した. シャーレ材質は, ポリスチレン製 (深型滅菌シャーレ, アテクト) と UV-B を透過しないガラス製 (並ガラス, IWAKI,) を使用し, 各区シャーレ 2 枚ずつ供試した. 培養中に一部のガラス製シャーレにコンタミネーションが発生したため, 調査から除外した.

表 2 各品種の不定芽誘導培地の植物ホルモン添加量

添加植物ホルモン	神馬 2号	新神	サザンチェルシー	サザンペガサス	モゼマゼンタ	サザンサマーピンク
IBA(mgL ⁻¹)	5.0	5.0	5.0	1.0	5.0	1.0
BA (mgL ⁻¹)	1.0	1.0	0.1	2.0	0.1	1.0

表 3 各光源の平均放射照度およびシャーレ蓋透過率

放射照度 (W・m ⁻²)	昼白色蛍光灯	昼白色 LED	透過率	
			ポリスチレン	ガラス
放射照度 (W・m ⁻²)	12.0	1.5	97%	96%
UV-A放射照度 (mW・m ⁻²)	54.9	0.5	77%	82%
UV-B放射照度 (mW・m ⁻²)	5.9	0.0	42%	0%

注 1) 計測 : 計測機器は表 1 と同様 光源からプローブ上面までの距離は約 31cm (昼白色蛍光灯は 29cm), 透過率は昼白色蛍光灯で計測

3 キク 5 品種の葉片培養における LED 光光質が不定芽の誘導に及ぼす影響 (試験 3)

試験 2 の結果より, 品種によって不定芽誘導に適する光質が異なる可能性が示唆されたため, 不定芽誘導に対する品種と光質の関係を検討した. 供試材料は, 輪ギク '神馬' 2 号, 県育成輪ギク '新神', 県育成スプレーギク 'モゼマゼンタ', 'サザンペガサス' および 'サザンサマーピンク' の 5 品種を使用した. 2019 年 6 月 5 日に各品種の無菌植物培養葉片 (2mm × 4mm) を, 9cm 径ポリスチレン製シャーレに不定芽誘導培地 (MS 培地 ; スクロース 30gL⁻¹, ゲランガム 3gL⁻¹, PH5.8, 添加した植物ホルモンは表 2 のとおり) を約 25mL 分注し, 葉裏が上になるように 10 枚ずつ置床した. 培養条件は 5 種類の光源下 (表 4) 35cm (昼白色蛍光灯は 33cm) に 16 時間日長および暗黒条件で, 設定温度 26 °C の培養室で管理した. 光源は, 赤色 LED (AG-R450, エルム), FR-LED, 青色 LED, 紫外線 LED (各試作品, エルム) および昼白色蛍光灯 (FL40SSD/37-B, 日立) を使用した. 各区シャーレを 3 枚ずつ供試した. 置床後 41 日後に不定芽誘導数を実体顕微鏡下で数えた.

表 4 各光源の平均放射照度

光源	FR-LED	赤色 LED	青色 LED	紫外線	昼光色蛍光灯
ピーク波長 (nm)	730	625	475	370	-
放射照度 (W・m ⁻²)	2.4	6.0	1.5	-	7.3
UV-A放射照度 (mW・m ⁻²)	2.6	0.6	0.7	384.5	63.6
UV-B放射照度 (mW・m ⁻²)	0.0	0.0	0.0	0.0	6.5

注 1) 計測：計測機器は表 1 と同様 光源からプローブ上面までの距離は約 31cm (昼光色蛍光灯は 29cm)
 2) シャーレ上蓋の透過率は通常光で約 98 %, UV-A で約 80 %, UV-B で約 50 %

結 果

1 秋スプレーギク ‘きゅらシューサー’ 葉片培養における LED 光光質が不定芽誘導に及ぼす影響 (試験 1)

各試験区における各光源の放射照度 (400-1050nm) は 1.5 ~ 2.5W・m⁻² の範囲にあり, 紫外線 LED を除いて概ね同程度であった. UV-B の放射照度 (280-315nm) は, 昼光色蛍光灯のみ 1.0mW・m⁻² 計測された (表 1).

葉片置床後, 各光源下で 40 日間不定誘導処理後に実体顕微鏡下で数えた不定芽誘導数と, 引き続き 20 日間の不定芽伸長処理後に数えた不定芽数では, 暗黒の不定芽誘導数が最も多かったが, 暗黒では小さな芽が多く葉片および不定芽ともに葉色が薄かった (表 5, 図 1). 葉色は, その後の昼白色蛍光灯下での不定芽伸長処理で他区と同等程度まで濃くなった. 単色光においては, FR-LED と赤色 LED の不定芽誘導数および不定芽数が同程度であり, 青色 LED, 紫外線 LED と光源の波長が短くなる順に不定芽誘導数および不定芽数が少なくなる傾向が見られた (表 5). 昼光色蛍光灯の, 不定芽誘導数および不定芽数は, 紫外線 LED と同程度で少なかった (表 5). 各光源下の不定芽誘導数と不定芽伸長処理後の不定芽数を調査した結果, 伸長処理後の不定芽数の合計の方が多くなったが, 各光源下の不定芽誘導数と不定芽伸長処理後の不定芽数は概ね同様の傾向にあるため, 試験 2 以降は不定芽誘導数のみを調査した.

表 5 ‘きゅらシューサー’ における葉片 1 枚あたりの不定芽伸長数 (n=10)

光源	不定芽誘導数/葉片	不定芽数 (誘導後 20 日後)				計
		伸長不定芽数	水浸状	未伸長	枯	
FR-LED	5.9 c	3.1 c	2.6	2.8	0.1	8.5
赤色LED	5.6 bc	2.5 bc	3.2	1.6	0.1	7.4
青色LED	3.6 bc	2.0 ab	2.3	0.5	0.2	5.0
紫外線LED	1.5 ab	1.3 ab	0.8	0.3	0.0	2.3
昼光色蛍光灯	0.2 a	0.2 a	0.4	0.1	0.0	0.6
暗黒	10.8 d	3.9 d	0.7	6.6	0.1	11.3

注 1) 不定芽誘導数：各光源下 40 日間培養後
 2) 不定芽数：不定芽誘導後昼白色蛍光灯下 20 日間培養後
 3) ポリスチレン製シャーレ 6 枚の平均値 異なる英字間に 5 % で有意差有り (Tukey-Kramer 法)

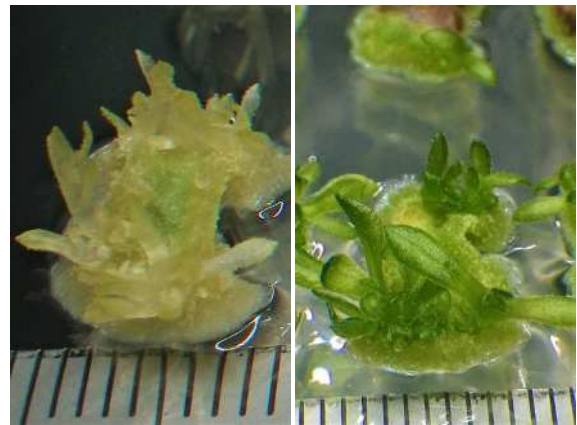


図 1 ‘きゅらシューサー’ 葉片の不定芽誘導状況
 注 1) 左：暗黒区 右：赤色 LED 区 目盛りは 1mm

2 キク葉片培養における UV-B が不定芽誘導に及ぼす影響 (試験 2)

‘神馬’ 2 号では, 昼白色 LED の不定芽誘導数が, 昼白色蛍光灯よりも多く, ‘新神’ では, 逆に昼白色蛍光灯の不定芽誘導数が多くなった (表 6). ‘サザンペガサス’ は暗黒区の不定芽誘導数が多く, スプレーギクの ‘サザンチェルシー’, ‘サザンペガサス’ および ‘モゼマゼンタ’ の 3 品種は, 昼白色蛍光灯下では, ほぼ不定芽誘導されなかった (表 6). UV-B を減衰するガラス製シャーレによる, ポリスチレン製シャーレに対する不定芽誘導数の増加は見られなかった (表 6).

表6 各品種の光源・シャーレ材質の違いによる葉片1枚あたり不定芽誘導数 (n=10)

品種名	シャーレ材質	不定芽誘導数/葉片		
		昼白色蛍光灯	昼白色LED	暗黒
神馬2号	ガラス	2.7	5.0 ^x	
	ポリスチレン	3.6	8.1	3.5
新神	ガラス	4.1	2.9	
	ポリスチレン	6.2	3.4	2.9
サザン	ガラス	0.0 ^x	— ^y	
チェルシー	ポリスチレン	0.0	0.2	0.5
サザン	ガラス	0.1	0.5 ^x	
ペガサス	ポリスチレン	0.0	1.7	6.6
モゼ	ガラス	0.0	1.7	
マゼンタ	ポリスチレン	0.0	1.9	1.2

注1) ^x: コンタミネーションによりシャーレ1枚で調査^y: 2枚ともコンタミネーション

3 キク5品種の葉片培養におけるLED光光質が不定芽の誘導に及ぼす影響(試験3)

‘神馬’2号では、昼白色蛍光灯で不定芽の誘導がなかった(表7)．‘新神’では、赤色LED、青色LED、紫外線LEDに比べて昼白色蛍光灯の不定芽誘導数が少なかった(表7)．‘サザンペガサス’では、赤色LEDがFR-LED、青色LED、紫外線LED、昼白色蛍光灯に比べて不定芽誘導数が多かった(表7)．‘サザンサマーピンク’では赤色LEDの不定芽誘導数が多く、昼白色蛍光灯では誘導されなかった(表7)．‘モゼマゼンタ’は、ほとんど不定芽誘導されなかった(表7)．

昼白色蛍光灯では、全品種で葉片の葉色が濃い一方、一部又は全体的に褐変したり、赤紫色色素が発色した葉片が多く、不定芽が誘導されなかった葉片も多かった(図2)．暗黒は全品種で葉片、不定芽の葉色が薄く、不定芽も小さなものが多かった(図2)．赤色LED区は、‘モゼマゼンタ’を除いて、外見上健全な不定芽誘導数が多い傾向が見られた(図2)．

表7 キク各品種の葉片1枚あたり不定芽誘導数 (n=10)

光源	神馬2号	新神	モゼマゼンタ	サザンペガサス	サザンサマーピンク
FR-LED	8.5 b	4.0 ab	0.0 a	0.9 a	0.6 a
赤色LED	7.9 b	8.1 b	0.0 a	2.1 b	1.5 b
青色LED	5.0 b	7.1 b	0.0 a	0.1 a	0.1 a
紫外線LED	4.9 b	6.5 b	0.1 a	0.1 a	0.0 a
昼白色蛍光灯	0.0 a	0.8 a	0.0 a	0.0 a	0.0 a
暗黒	6.3 b	4.2 ab	0.0 a	1.0 ab	0.1 a

注1) 不定芽誘導数: 各光源下40日間培養後

注2) ポリスチレン製シャーレ3枚の平均値 異なる英字間に5%で有意差有り (Tukey-Kramer法)

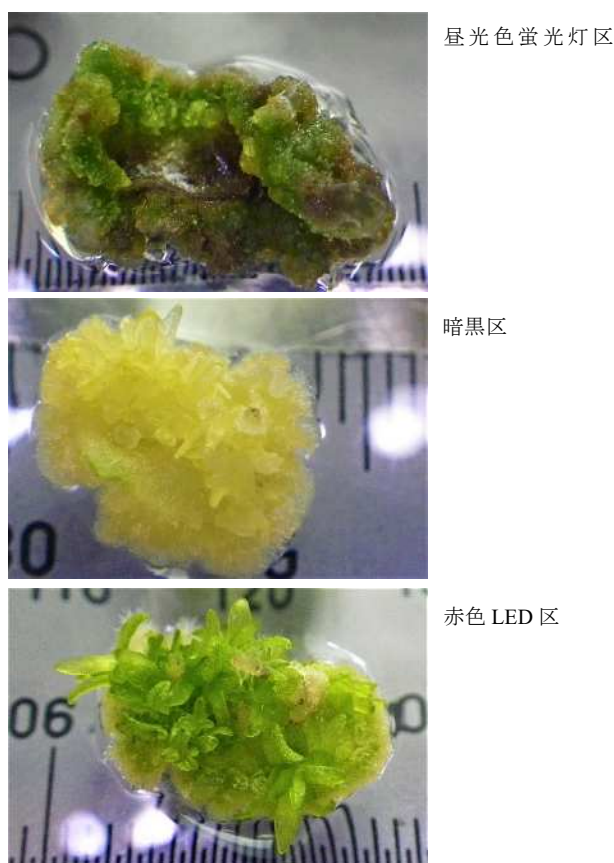


図2 ‘神馬’2号葉片の不定芽誘導状況

注1) 目盛りは1mm

考 察

変異誘発の効率化を目指し、葉片培養における植物体再生率向上を目的として、培養中の光環境の不定芽形成への影響を検討した．試験1の結果から‘きゅらシューサー’の葉片培養においては、暗黒で不定芽誘導数が最も多く、単色光においてはFR-LED、赤色LEDが多い傾向を示し、昼白色蛍光灯区の不定芽誘導数は少なかった．また、単色光においては、波長の短い光で不定芽誘導数が少ない傾向が見られたことから、波長が短い紫外光そのものがキク培養葉片からの不定芽誘導に抑制的に働く可能性が示唆された．そこで、試験2ではUV-Bを透過しないガラス製シャーレや紫外光領域の放射照度が低い昼白色LEDを加えて比較したものの不定芽誘導数への影響は判然とせず、少なくともUV-Bが不定芽誘導に抑制的に働く事実は認められなかった．一方、試験3で用いた5品種・系統では‘モゼマゼンタ’を除き、試験と1同様に従来の昼白色蛍光灯と比較して赤色LED光による不定芽誘導数の増加が見られた．このことは、従来の手法で不定芽誘導が困難と考えられた品種においても、光質の選択により不定芽誘導数の改善が期待でき

ることを示している。

本試験においては、それぞれ品種毎に不定芽誘導培地（植物ホルモンの配分）を固定した上で、各光源および暗黒条件と比較した。また、従来不定芽誘導培地に添加するオーキシンの一つ IAA は、450nm 以下の波長で急速に光分解することが報告されている¹⁰⁾ことから、光分解しにくい IBA を使用し、光分解の影響を低減した。その一方で、光照射区において培地添加成分に加え植物体内で内生オーキシンが産生され、過剰に作用した可能性も推測された。このことが、光照射区の中でも昼光色蛍光灯区の不定芽誘導数が抑制され、暗黒区で不定芽数が誘導されやすくなった要因とも考えられた。さらに、植物体再生系を利用した変異誘発等による品種改良では、改良する形質・目標により対象とする品種が限定される。これまでは、植物体再生率や再生数が安定している‘神馬’系の品種を中心に不定芽再生系を利用してきた。不定芽誘導が困難な品種については、変異がキメラ状になることを想定した上で挿し穂、または培養物の腋芽に変異誘発処理を行い、変異個体を選抜している。本試験では従来の昼光色蛍光灯で不定芽誘導が低率であった品種において、赤色 LED 区で不定芽数の増加が認められた。対象品種の不定芽誘導数が安定化することは、変異体のキメラ解消と変異の固定化に要する時間と労力の短縮となる。赤色 LED がキク電照栽培用光源として販売され、比較的容易に入手できることから、今後は当光源を活用し、対象品種の不定芽誘導を最適化することにより、品種改良の効率化・高度化に結びつけていくこととしたい。

引用文献

- 1) 渥美茂明 1987.植物組織培養アトラス 鎌田博監修 R&D プランニング 東京.24-26
- 2) Fridborg, G. and Eriksson, T. 1975. Partial reversal by cytokinin and (2-chloroethyl) -trimethylammonium chloride of near-ultraviolet inhibited growth and morphogenesis in callus cultures. *Physiol Plant* 34:162-166
- 3) 深井誠一・陳忠英・大江正温 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, 大阪農技セ研報 24:55-58
- 4) 今給黎征郎・永吉実孝・郡山啓介・上野敬一郎 2006.無側枝性輪ギク「新神」の育成, 鹿児島県農試研報 34:15-20
- 5) 鹿児島県農政部農政課(編) 2020.かごしまの農業.32
- 6) Kaul, V. , R. M. Miller , J. F .Hutchinson and D. Richards 1990. Shoot regeneration from stem and leaf explants of *Dendranthema grandiflora* Tzvelev (syn. *Chrysanthemum morifolium* Ramat.). *Plant Cell,Tissue and Organ Culture*. 21:21-30
- 7) Klein, R. M. and Edsall, P. C. 1967. Interference by near ultraviolet and green light with growth of animal and plant cell cultures. *Photochem Photobiol* 6:841-850
- 8) 永吉実孝 2003.鹿児島県における放射線育種, 放射線と産業 98:10-16
- 9) 農林水産省大臣官房統計部(編)2018.平成 30 年産花き生産出荷統計 .8
- 10) Stasinopoulos, T. C. and Hangarter, R. P. 1990. Preventing photochemistry in culture media by long-pass light filters alters growth of cultured tissues. *Plant Physiol*. 93: 1365-1369
- 11) 高津康正・友常秀彦・霞正一・佐久間文雄 1998.国内産キク品種における茎葉再分化能の差異と効率的な形質転換系の確立, 園学雑 67:958-964
- 12) 高山真策 2010.植物大量培養における光環境と植物生産, 植物環境工学 22:88-94
- 13) 上野敬一郎・永吉実孝・長谷純宏・鹿園直哉・田中淳 2001.秋輪ギク「神馬」の培養系を利用した系統育成システムの構築, 育学研 3(別 2):62
- 14) 上野敬一郎・永吉実孝・今給黎征郎・郡山啓介・南公宗・田中淳・長谷純宏・松本敏一 2013.イオンビームの再照射によって秋輪ギク‘神馬’の複数形質を改良した新品种‘新神 2’の育成, 園学研 12:245-254
- 15) 上野敬一郎 2014.バイオテクノロジーを用いた地域植物資源の育種学的活用に関する研究, 鹿児島県農総セ研報 8:81-100

Effects of Light Quality on Adventitious Shoots Induction in Chrysanthemum Leaf Disc Culture

Mitsuo Tamari, Kazuhiro Fujikawa and Ryuji Hakuzan

Summary

We investigated the light quality suitable for inducing adventitious shoots from chrysanthemum leaf disc culture. Chrysanthemum varieties used were 'Kyura Shuser', 'Jimba' No.2, 'Aladdin', 'Southern Chelsea', 'Southern Pegasus', 'Southern SummerPink' and 'Moze Magenta'. The light sources used were far-red LED, red LED, blue LED, ultraviolet LED, daylight fluorescent lamp, and dark conditions. As a result, even in varieties with a small number of adventitious buds, the number of adventitious buds was improved by changing the light source during leaf disc culture from daylight fluorescent lamps to red LEDs.

Keywords :Fluorescent light, Jimba, LED, Red light, Ultraviolet rays