

称号及び氏名 博士(農学) 島田 有紀子

学位授与の日付 平成19年3月31日

論文名 「球根ベゴニアにおける葉挿し繁殖に関する研究」

論文審査委員
主査 森 源治郎
副査 小田 雅行
副査 池田 英男

論文要旨

球根ベゴニアは、南米アンデス山脈の高地に自生する球根性ベゴニアの原種をもとに改良された園芸品種群の総称で、花が大輪で美しく、鉢花としての普及が期待されている。ベゴニア類には茎挿しや葉挿しなどによって増殖可能な種・品種もあるが、球根ベゴニアでは、それらによる繁殖が難しく、加えて地下に形成される塊茎が全く分球しないことから、増殖は種子繁殖に頼らざるをえない状況にある。しかし、種子から育った個体は、遺伝的にヘテロであるため、優良個体の保存および大量増殖が不可能であり、効率的な栄養繁殖法の確立が求められている。なお、組織培養による増殖については、これまで研究されてきているが、内生菌汚染のために実用化に至っていない。

本研究では、球根ベゴニアの小葉片から *ex vitro* で不定芽を形成させるための諸条件について検討し、効率的な増殖法の開発を行った。

第1章 球根性ベゴニアと他のベゴニア類との不定芽形成能の比較

球根ベゴニアの葉挿し繁殖が難しいのは交配親に依存するのではないかと考え、球根性ベゴニア 4 種について、葉身全体を挿し穂とし、水挿しによる不定芽形成能を木立性ベゴニア 15 種、根茎性ベゴニア 23 種と比較した。不定芽形成は根茎性ベゴニアで優れ、球根性ベゴニアおよび木立性ベゴニアでは極めて劣ることが確認された。なお、原産地、葉の大きさ、葉の厚さおよび葉脈の太さと不定芽形成との間に一定の関係はなく、葉脈の形状（掌状または羽状）および多細胞毛の程度との間には何らかの関連性があることが分かった。

第2章 球根ベゴニアの分割葉片挿しにおける不定芽形成の促進条件

1. 挿し床の培地、葉挿しの時期および温度と不定芽形成

球根ベゴニアの若い展開葉を採取し、葉底から放射状に4分割した葉片をパーライト、鹿沼土、バーミキュライト、ロックウール粒状綿およびロックウール成形物の5種類の培地に挿し、不定芽形成の様相を比較した。不定芽形成率は、パーライト、鹿沼土、バーミキュライトおよびロックウール粒状綿で20%以下であったのに対し、ロックウール成形物では50%であり、ロックウール成形物が他の培地よりも不定芽形成に適していることが示された。また、葉挿し時期を4月8日、5月20日、7月29日および10月13日と変えたところ、不定芽形成率は4月と10月では60%以上であったが、7月では13%で低く、不定芽形成は高温によって抑制されることが示唆された。次に、葉挿し時の温度を15、20、25および30℃と変えたところ、不定芽形成のための適温は15~20℃付近にあることが明らかになった。

2. 挿し穂の部位および大きさと不定芽形成

球根ベゴニア‘ティネラ’を供試し、葉柄5mmをつけて葉身全体を切り取った葉柄つき全葉、その全葉の葉身部を5×4cmあるいは2×1.5cmに切り詰めた葉柄つき小葉片、葉柄を切り離して葉身を2×1.5cmに切り詰めた小葉片、および葉底から2cm離れた位置で葉先に向かって切り出した2×1.5cm小葉片の5種類の挿し穂について不定芽形成を比較した。葉挿し培地には、ロックウール成形物と同じ材質で小型のロックファイバーミニポット（商品名）を用い、これをプラスチック容器に入れて底面から給水した。全葉挿しでは73%の挿し穂で不定芽形成が認められたが、他の挿し穂では発根は見られたものの、不定芽形成は全く認められず、挿し穂が小さいと採取部位にかかわらず、不定芽を形成しないことが分かった。

3. 小葉片挿しにおける不定芽形成の品種間差異

小葉片挿しで不定芽形成が見られないのは、球根ベゴニアの他品種にも共通した現象であるかどうかを調べるため、球根ベゴニア5品種について、葉柄つき2×1.5cmの小葉片における不定芽形成を比較した。一部の品種でカルスあるいは発根が見られたが、不定芽を形成した小葉片は全くなかったことから、球根ベゴニアでは品種に関係なく、小葉片挿しによる繁殖が極めて難しいことが分かった。

第3章 植物成長調節物質処理が小葉片挿しにおける不定芽形成に及ぼす影響

1. NAA および BA 処理と不定芽形成

小葉片挿しの場合、植物成長調節物質を処理することで不定芽形成を促すことができるのではないかと考え、NAA (0, 0.01, 0.1, 0.25, 0.5 ppm) または BA (0, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 ppm) 溶液を単独で添加したロックファイバーミニポットに2×1.5cmの小葉片を挿した。植物成長調節物質無添加区では20%前後の小葉片が褐変枯死し、生存葉片においても不定芽を形成するものは全く見られなかった。これに対してNAAを添加すると、0.1ppm以上の濃度ですべての小葉片が黄化して枯死した。一方、BAを添加すると、0.25ppm以上の濃度で小葉片の褐変が抑制され、80%の小葉片で不定芽を形成した。また、0.5ppm BAの存在下で0.1~0.5ppm NAAを添加した場合には、黄化することなく高い生存率を維持したが、カルス形成が促されて不定芽形成の開始が遅れた。

2. NAA 処理による黄化とクロロフィル含量およびエチレン生成との関係, ならびに BA 処理による褐変抑制とポリフェノール含量との関係

0.5 ppm NAA 添加, 0.5 ppm BA 添加あるいは無添加の小葉片について, 葉挿し中の総クロロフィル含量およびエチレン生成量を比較した. 葉挿し 10 日後の総クロロフィル含量は, 黄化が著しかった NAA 区において葉挿し開始時よりも 8.8 mg / 100 g FW 減少した. エチレン生成量は NAA および BA の添加に関係なく葉挿し中を通じて低い値を示した. また, 褐変の見られなかった BA 添加区と褐変の著しかった無添加区の小葉片における総ポリフェノール含量の経時変化を調べたところ, 両区とも葉挿し後の日数経過とともに増加したが, その程度は BA 区よりも無添加区で大きかった. これらの結果, 小葉片の黄化は培地への NAA 添加により引き起こされるが, このクロロフィルの分解はエチレン生成によって誘導されるものではないこと, また BA 添加は小葉片の切り出しに伴って起こるポリフェノール含量の増加を抑制し, 褐変を回避することが分かった.

第 4 章 母株栽培時と葉挿し時の日長, 小葉片の採取部位および置床方法が不定芽形成に及ぼす影響

1. 母株栽培時および葉挿し時の日長と不定芽形成

あらかじめ 18 時間日長下で栽培していた母株を, 10 月 11 日に最低夜温を 14°C, 日長を 18 時間 (長日) または自然日長 (短日) に維持したガラス室に移して栽培した. 43 日後の 11 月 23 日に各日長下で栽培していた母株から, 挿し穂として 2 × 1.5 cm の小葉片を切り出し, 0.5 ppm BA を添加したロックファイバーミニポットに挿した. 葉挿し後, それらを最低 14°C, 18 時間日長または自然日長に維持したガラス室で管理した. 長日下で栽培した母株からの小葉片では葉挿し時の日長に関係なく高い不定芽形成率を示したが, 短日下で栽培した母株からの小葉片では生存率そのものが低く, 不定芽を形成したのはわずか 13% にとどまった. また, 長日下で栽培した母株の場合, 葉挿し時の日長を長日にすると短日のものと比べて, 不定芽の発達が促された.

2. 小葉片の採取部位および置床方向と不定芽形成

葉底から葉先に向かって 0, 1, 1.5 および 2 cm 離れた位置で 2 × 1.5 cm の小葉片を切り出し, 0.5 ppm BA を添加したロックファイバーミニポットに挿した. 不定芽形成率は, 葉底を含む小葉片で 87% と高かったが, 葉底から離れるにつれて低下し, 2 cm 離れた位置の小葉片では 0% であった.

次に, 葉底から 2 cm 離れた位置で葉先に向かって切り出した 2 × 1.5 cm の小葉片を用い, 垂直挿し (基部側下), 水平挿し (背軸面下) および逆挿し (基部側上) の 3 通りの方法で葉挿しした. 挿し床には 0.5 ppm BA を添加したロックファイバーミニポットを用いた. 不定芽形成は, 垂直挿しでは全く見られなかったが, 水平挿しでは 60%, 逆挿しでは 80% で認められた. なお, 同小葉片を 0.5 ppm BA と 0.25 ppm NAA を添加したロックファイバーミニポットに逆挿しすると不定芽形成は抑制された. 一方, 小葉片基部の主脈の表裏に 100 ppm TIBA を含むラノリンペーストを塗布し, 0.5 ppm BA を添加したロックファイバーミニポットに垂直挿ししたところ, 73% の小葉片で不定芽形成が見られた. これらの結果から, 葉底から離れるにつれて不定芽形成率が低下するのは, 分裂組織が存在しないからではなく, 小葉片内のオーキシシンとサイトカイニンのバランスが不定芽形成に適してい

ないことによるものと考えられた。

3. 小葉片挿しに伴う変異個体の発生調査

本研究で取り扱った小葉片挿しにより再生した個体について、遺伝的変異の可能性を調べるのに先立って、不定芽の発生起源についての組織観察を行った。不定芽はカルスを経由せずに表皮細胞および亜表皮細胞が分裂を開始して器官分化したものであることが明らかになった。次に、小葉片挿しによって得られた 10 個体について 11 項目の形態的特徴を母株と比較したところ、すべての項目において類似していることが確かめられた。さらに、体細胞の染色体数を比較したところ、 $2n=28$ で一致するとともに核型の特徴も共通しており、染色体レベルでの変異はないものとみなされた。

4. 他のペゴニア類の小葉片挿しにおける不定芽形成

不定芽形成率の低かった他のペゴニア類、すなわち球根性ペゴニアおよび木立性ペゴニア計 13 種について、葉底を含む 2×1.5 cm の小葉片を、0.5 ppm BA を添加したロックフアイバーミニポットに垂直挿したところ、木立性ペゴニアの 2 種を除き、高い割合で不定芽形成が見られた。不定芽形成が見られなかった木立性ペゴニアの 2 種については、逆挿しを行うことによって不定芽形成率を 93% および 73% まで高めることができた。

まとめ

本研究では、葉挿し繁殖が不可能とされていた球根ペゴニアについて、不定芽形成を誘導する諸要因を検討した。挿し床培地にはロックウール、温度は $15 \sim 20^{\circ}\text{C}$ が適していることが分かった。続いて、 2×1.5 cm の小葉片に対しては、培地へ 0.5 ppm BA の添加が葉片切り口からの褐変を防止して生存率および不定芽形成率を高めること、NAA 溶液の添加は葉片を黄化させることを明らかにした。小葉片の採取部位は葉底に近いほど不定芽形成能が高いが、葉底から離れたところの小葉片では逆挿しまたは TIBA 処理を行うことによって不定芽形成を促せることを見出した。小葉片挿しによって得られた個体は変異がなく、この技術は繁殖困難な他の球根性ペゴニアおよび木立性ペゴニアにも適用できることを明らかにした。

審査結果の要旨

球根ペゴニアは、南米アンデス山脈の高地に自生する原種をもとに改良された園芸品種群の総称で、花が大輪で美しく、鉢花としての普及が期待されている。しかし、地下に形成される塊茎が全く分球しないうえ、従来の方法では葉挿し繁殖が極めて難しい。また、組織培養による増殖については、これまで研究されてきているが、内生菌汚染のために実用化には至っていない。このため、球根ペゴニアの増殖は種子繁殖に頼らざるをえない状況にあった。しかし、種子から育った個体は、遺伝的にヘテロであるため、優良個体の保存および大量増殖が不可能であり、効率的な栄養繁殖法の確立が求められていた。

本研究は、球根ペゴニアの小葉片から *ex vitro* で不定芽を形成させるための諸条件について検討し、効率的な増殖法の開発を行ったものである。

第 1 章では、球根ペゴニア交雑品種の葉挿し繁殖が難しいのは、交配親に由来するので

はないかと考え、球根ベゴニアの原種 4 種について不定芽形成能を比較し、球根ベゴニアのいずれの種も不定芽形成能が極めて低いことを確認した。

第 2 章では、まず球根ベゴニアの 1/4 分割葉片挿しにおける不定芽形成の促進条件について検討し、挿し床の培地はロックウール成形物がパーライト、鹿沼土、バーミキュライトおよびロックウール粒状綿よりも優れていること、自然環境下での好適葉挿し時期は 4 月および 10 月であること、適温は 15~20℃付近にあることを明らかにした。次に、上記の結果から得られた好適環境下で挿し穂の大きさと不定芽形成との関係について検討し、挿し穂が小さいと採取部位にかかわらず、不定芽を形成しないことを明らかにした。さらに球根ベゴニア 5 品種について、小葉片挿しにおける不定芽形成の品種間差異について検討し、小葉片挿しによる繁殖は、品種に関係なく、極めて難しいことを確認した。

第 3 章では、小葉片挿しで不定芽形成を可能にするために植物成長調節物質処理を試みた。

NAA 処理では 0.1 ppm より高濃度になると小葉片が黄化して枯死するのに対し、0.25~2.0 ppm BA を添加すると小葉片の褐変が抑制され、80%の小葉片で不定芽を形成すること、また 0.5 ppm BA の存在下で 0.1~0.5 ppm NAA を添加すると黄化は抑制されるが、カルス形成が促されて不定芽形成の開始が遅れることを明らかにした。続いて、NAA 処理による黄化と褐変の原因を検討した。NAA 添加によって引き起こされる小葉片の黄化は、エチレン生成によるものではないこと、また BA 添加によって小葉片の切り出しに伴って起こるポリフェノール含量の増加が抑制されて褐変が回避されることを示唆した。

第 4 章では、小葉片 (2 × 1.5 cm) 挿しにおける不定芽形成能を高めるのに関与する諸要因について検討した。挿し穂の小葉片を長日下で栽培した母株から採取すると、葉挿し時の日長に関係なく高い不定芽形成率を示すのに対し、短日下で栽培した母株からでは生存率そのものが低くなること、また長日下で栽培した母株の場合、葉挿し時の日長を長日にすると短日のものと比べて、不定芽の発達が促されることを明らかにした。次に小葉片を葉身部から切り出す際の部位は、葉底を含むと不定芽形成率が高くなるが、葉底から離れるとその率が低下し、2 cm 離れた位置の小葉片では全く不定芽を形成しないこと、葉底から 2 cm 離れた位置での小葉片は、水平挿しあるいは逆挿しにすると不定芽形成が促されることを明らかにした。また、逆挿しにしても BA (0.5 ppm) に NAA (0.25 ppm) を添加すると不定芽形成が抑制されること、小葉片基部の主脈の表裏に TIBA (100 ppm) を含むラノリンペーストを塗布して垂直挿しすると比較的高い割合で不定芽形成が見られることも明らかにした。これらの結果から葉底から離れるにつれて不定芽形成率が低下するのは、分裂組織が存在しないからではなく、小葉片内のオーキシシンとサイトカイニンのバランスが不定芽形成に適していないことによるものと推察した。さらに、小葉片挿しによって生ずる不定芽の発生起源についての組織観察を行ない、不定芽は、カルスを経由せずに表皮細胞および亜表皮細胞が分裂を開始して器官分化したものであることを明らかにした。最後に、再生個体を対象に 11 項目の形態的特徴、体細胞の染色体数 (2n=28) および核型の特徴について母株と比較し、すべてにおいて類似し、変異の可能性がないことを示した。なお、本研究で得られた技術は、繁殖困難な他の球根ベゴニアおよび木立ベゴニアにも適用できることも確認した。

本研究の成果は、これまで繁殖困難とされていた球根ベゴニアを *ex vitro* で 2 × 1.5 cm

という小葉片からの不定芽誘導を可能にし、実用的にも有効な増殖法として確立したものであり、植物繁殖学、花卉園芸学分野の発展に大きく貢献すると考えられる。よって、本論文の審査および最終試験の結果と併せて、博士（農学）の学位を授与することを適当と認める。