

組織培養によるヒメサユリ (*Lilium rubellum* Baker) の繁殖, 特に茎切片の子球形成について¹

新美 芳二・渡辺 宏和²

新潟大学農学部 950-21 新潟市五十嵐二の町

In vitro Propagation of *Lilium rubellum* Baker ; Especially on Bulblet Formation of Stem Segments

Yoshiji NIIMI and Hirokazu WATANABE

Faculty of Agriculture, Laboratory of Horticulture,
Niigata University, Niigata 950-21

Summary

In *Lilium rubellum* Baker, segments excised from stems and floral parts were found to form bulblets on the modified Murashige and Skoog medium supplemented with 1 mg/l naphthalenacetic acid and 0.1 mg/l 6-benzylaminopurine (9). It was especially true for stem- and tepal-segments, which were comparable to scale segments in their ability of bulblet formation.

The bulblet formation, however, was found to vary with the age of parent plants at excision. Thus, tepal- and stem-segments formed many bulblets when excised from the plants 4 to 2 weeks before flowering but did scarcely when excised at flowering. Filament segments formed bulblets when excised from the plants 2 weeks before and at flowering, whereas style segments did only when excised at flowering. None of stem segments formed any bulblets when excised at flowering.

The bulblet formation also varied with the position of segments on each plant parts. The proximal segments of floral parts formed more bulblets than the distal ones, whereas the reverse was true in the stem segments.

Stem segments were divided into the nodal- and internodal-ones. Nodal segments formed more bulblets than internodal ones. Further, both segments, especially the nodal ones, formed bulblets in higher percentage when excised from the distal 5 cm of the young stem 10 to 15 days after sprouting.

It could be concluded from the results that the segments excised from tepals and stems 4 to 2 weeks before flowering were as useful as scale segments to effectively produce bulblets in the *in vitro* propagation of *L. rubellum* Baker.

緒 言

ヒメサユリの増殖は、従来から一般的に用いられている鱗片繁殖法では多くの子球が得られず(3), また実生繁殖法では開花球を得るまでに4, 5年を要する(4). 更に本種は木子や珠芽をほとんど形成しないことから, 新しい増殖体系の開発が望まれている. そこで, 著者らは組織培養による効率的な子球の増殖法について検討を開始した(8, 9).

組織培養によるユリの繁殖については既に幾つかの方法が報告されているが, その主なものとして, (i) 鱗片当たりの子球数を増加させるため, 鱗片を子球形成に支障のない程度の大きさの切片に調製し, それらの切片にできる限り多くの子球を分化させ, 更にこれらの無菌的に得た子球の鱗片を再び培養して効率化をはかる(3, 14), (ii) 鱗片から誘導したカルスを分離・増殖し, そのカルスから子球の再分化をはかる(12), (iii) 鱗片以外の植物体部分を培養して子球増殖を行う(6, 9), などがある. しかしヒメサユリの鱗片培養による増殖は従来

¹ 1982年3月23日受理

² 現在 タキイ種苗 KK

用いられている鱗片挿しと比べ, 特にすぐれているとは言い難い(8). また現在のところヒメサユリは主に山掘りにより入手しなければならないことから, 1植物体からできる限り多くの子球を得ること, それには鱗片の他にそれと同等あるいはそれ以上の増殖能力を持つ植物体部分を見つけて出して増殖に供することが重要な課題といえる.

本研究は既に報告した鱗片(8) や葉(9) と同程度あるいはそれ以上の数の子球を形成する植物体部分が他にあるかどうか, また母植物体の採集時期や植物体部分の異なる位置から得た切片の間で子球形成率に差があるかどうかを検討したものである.

材料及び方法

材料の育成: 1978年10月, 新潟県の自生地で採集した開花球を本学農学部実験圃場の砂壤土に定植し, 約10cmの覆土を行った. 翌年4月下旬, 萌芽開始とともに白寒冷紗(遮光率約30%)で保護した.

開花約4週間前, 同2週間前及び開花当日に蕾をつけた植物体全体を3ないし5個体ずつ採集した. なお圃場の他の個体は萌芽後30日から35日の間に開花した.

材料の滅菌: 圃場より採集した植物体を水道水でよく洗ったのち, 各部分に分けた. 地上部は蕾または花と茎に分け, 茎は更に葉を取り除いたのち約5cmの長さに切り, 10%高度さらし粉ろ過液で5分間滅菌したのち, 無菌水で2回以上洗浄した. 外植体としての茎切片は, 開花4週間前では茎頂部から約10cm, 他の時期では同15cmの範囲から採集した.

蕾は70%エチルアルコールを含んだ脱脂綿で表面を

ふいたのち, 茎に準じて滅菌し, 柱頭, 花柱, 子房, 花糸及び花被片に分けた. 開花した花の場合は, 滅菌操作前に蕾と同様に各部分に分け, 茎に準じて滅菌した.

鱗茎は外傷がついている鱗片を取り除いたのち, 0.1%昇汞水に30分間浸漬して水洗した. 分離した鱗片を柔らかいブラシを用いて石けん液中で洗浄し, 水洗したのち, 更に10%に希釈したオスパン液に10分間浸漬した. これらの鱗片を再び水洗したのち, 10%高度さらし粉のろ過液で20分間滅菌して, 最後に無菌水で2回以上洗浄した.

材料の調製及び置床: 蕾や花の各部分のうち, 花被片及び花糸はそれらの基部側約1mmを切り捨て, 花糸は更に葯を取り除いたあとそれぞれ約5から9mmの切片に調製し, 花被片切片は背軸面が培地に接するように, 他の切片は横向きに置床した. ただし柱頭切片はその一部が培地内に入るように横向きに置床した.

茎は頂部から順次5mmの長さに調製し, 節を含む切片(以後節切片と呼ぶ)と節間切片を区別して, 横向きに置床した.

対照区として用意した鱗片はその周縁を数mm切り落したのち, 約5mmの長さに調製し, 背軸面が培地に接するように置床した.

培養には50ml三角フラスコを用い, 一瓶当たり3切片を置床した.

培地: Murashige and Skoogの無機塩培地(7)にグリシンなど有機物及び1mg/lの α -ナフタレン酢酸, 0.1mg/lの6-ベンジールアミノプリンを添加し, 0.1N NaOH または 0.1N HCl でpH 5.6~5.7に調整し

Table 1. Bulblet formation² of segments of stems and floral parts varying with parent plant age.

Plant part	Parent plant age at excision (weeks before flowering)	No. of segments excised	% segments with bulblet formation	Mean no. of bulblets per segment with bulblet formation	Mean weight of bulblets (mg)	No. of segments contaminated
Floral parts	Stigma	2	5	0	0	0
		0	2	0	0	0
	Style	2	5	0	0	0
		0	9	22	3.0	77
	Filament	2	30	20	1.0	453
		0	24	21	1.5	86
Ovary	2	3	0	0	0	
	0	4	0	0	0	
Tepal	4	16	31	1.2	171	
	2	80	35	1.1	145	
	0	96	7	1.4	15	
Stem	4	91	14	2.1	55	
	2	116	9	3.5	88	
	0	110	0	0	0	
Bulb scale (control)	4	40	40	3.1	17	
	2	40	30	4.0	11	
	0	40	40	2.2	15	

² Determined after 110 days culture.

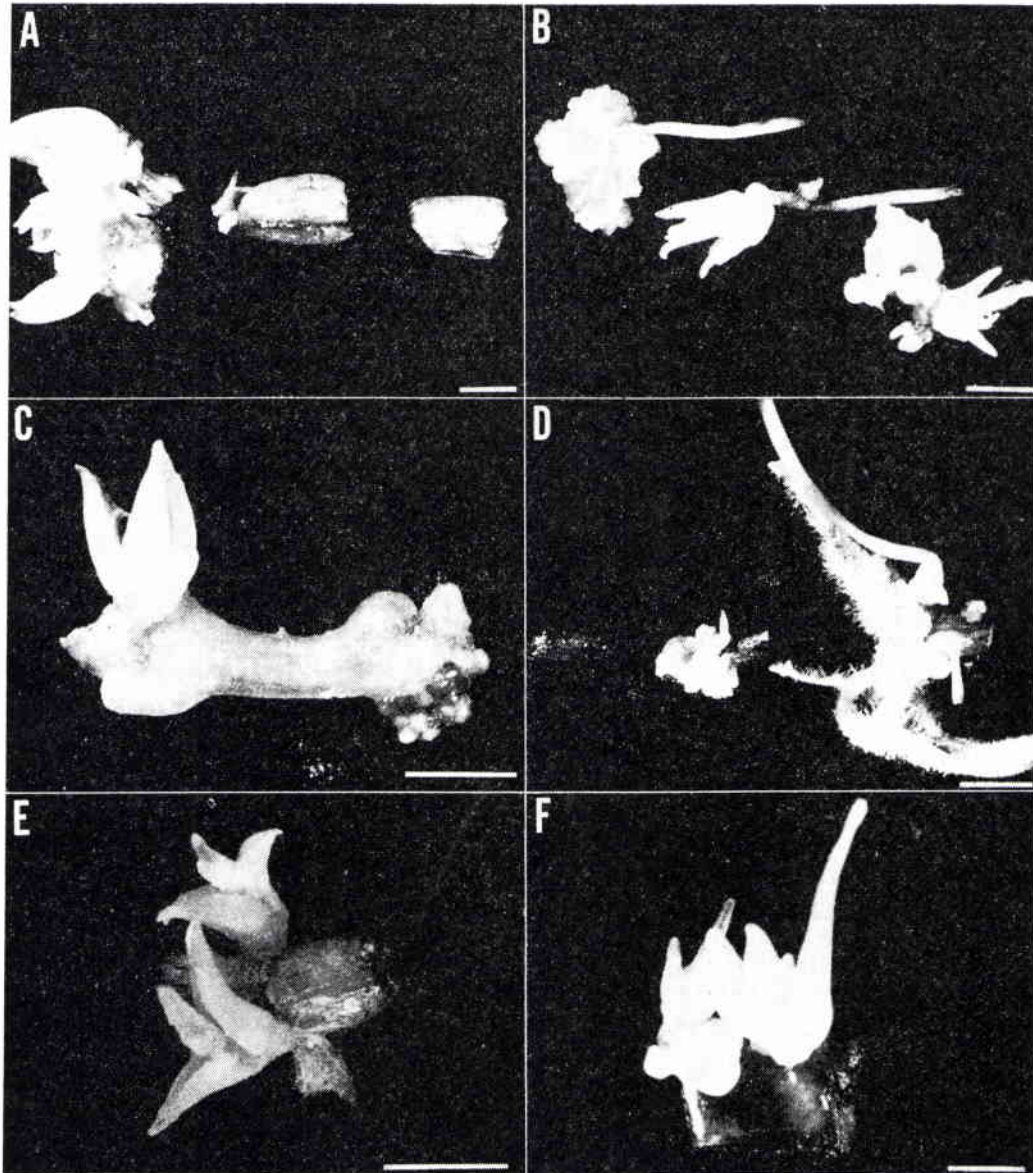


Fig. 1. Bulblets, roots, or callus developed on the cut end of each segment. (A); bulblets developed well on the segments excised from the proximal portion of the tepal. (B); filament segments developed bulblets or callus. (C); a style segment developed a bulblet or callus at both cut ends. (D); bulblets, roots, or callus developed well on the segments excised from the distal portion of the stem. (E); an internodal section developed two bulblets. (F); a bulb scale section developed two bulblets. Photographs were taken after 110 days culture. Markers represent 5 mm.

たのち、50 g/l のショ糖と 7 g/l の寒天粉末を加えて溶解したものを基本培地とした(9)。

溶解した培地を 50 ml 三角フラスコに約 20 ml ずつ分注してアルミホイルでふたをしたのち、120°C、1.2 kg/cm² の条件で 10 分間オートクレーブで殺菌した。

培養条件：各フラスコに置床した切片は 23±1°C の暗所で 90 日間培養し、その後同一温度条件の白色蛍光灯の連続照明(約 2,000 lux)下で更に 20 日間培養した。

実験結果の調査：培養 110 日後、子球を形成した

切片数を調査した。形成された子球はナイフとピンセットで分離して、その数を調べ、更に付着している寒天を取り除いて水洗した後、表面の水をろ紙で十分吸い取り、根をつけたまま重さを測定した。

結 果

実験 I. 植物体の採取時期と各植物体部分上での切片の位置が子球形成に及ぼす影響

植物体の各部分の萌芽から開花までの時期別の子球形

Table 2. Bulblet formation² of 5-mm long nodal- and internodal-segments excised from the top 7.5 or 10 cm long (see Fig. 2)

Parent plant age at excision (days after sprouting)	No. of stems	No. of stem segments		% segments with bulblet formation	Mean no. of bulblets per segment with bulblet formation	No. of segments contaminated
		Nodal	Internodal			
10	3	21	24	86	2.8	0
				29	2.0	0
15	3	26	34	92	1.8	0
				15	1.2	0
20	3	27	30	81	1.8	0
				6	1.5	3
25	3	20	40	60	2.1	0
				23	2.1	0

² Determined after 90 days culture.

成について第1表に示した。柱頭及び子房の切片は採取時期に関係なく、全く子球を分化しなかったが、対照の鱗片及び花柱、花糸、花被片、及び茎の切片はいずれも子球を形成した(第1図, 第1表)。

花糸及び鱗片の子球形成能力は採取時期に関係なくほぼ等しく、花柱は開花期でのみ子球を形成した。一方、花被片や茎は開花4週間前及び同2週間前に採集した場合は鱗片とほぼ同数の子球を形成したが、開花期の採取では子球形成能力は非常に低いか、あるいは全くなかった(第1表)。

同一の植物体部分から得た切片でもその部分上での位置によって子球形成能力が異なった。すなわち茎を除いて、おおむね基部の側から採取した切片が子球をよく形成した(第1-A図)。茎では頂部付近から得た節切片及び節間切片が子球をよく形成し(第1-D図), 更に節切片は節間切片より高い子球形成能力を示した。また各植物体部分から得たほとんどの切片はその形態的基部側に子球を形成し、明らかに極性を示したが(第1図), 花柱切片のあるものは切口の両側に子球, 根またはカルスを形成した(第1-C図)。

実験II. 茎の採取時期と切片の茎上での位置が子球形成に及ぼす影響

茎切片は花被片や鱗片切片と同様に比較的多くの子球を形成したが、汚染率が高く、汚染率を低めることができれば更に多くの子球が得られると思われた(第1表)。またこれまでユリにおいて詳しく報告されていない節間切片からの子球形成が観察されたので、実験Iで用いた方法を一部変更して茎切片での子球形成について更に詳しく検討した。すなわち1981年4月中旬に萌芽した植物体の茎を、萌芽後10日、15日、20日及び25日に圃場より採取した(圃場の他の個体は萌芽後28日から30日で開花)。茎は摘葉後減菌されたが、その際汚染を減

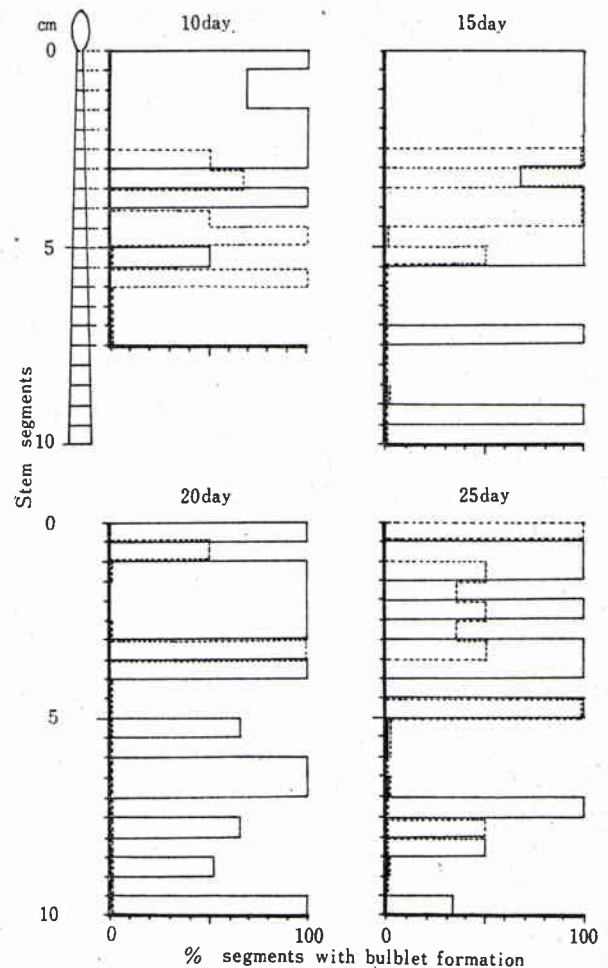


Fig. 2. Bulblet formation (%) of segments excised from different portions of the stem with flower buds harvested 10, 15, 20, and 25 days after sprouting. The formation of bulblets was determined 90 days after excision. Solid- (□) and dotted-lines (□) represent the percentages of nodal- and internodal-segments with bulblet formation.

らすため、各葉の基部を 2~3 mm ずつ残した。そして滅菌後、茎に残っている葉の基部をピンセットで全部取り除き、萌芽後 10 日の茎では茎頂より 7.5 cm、他の時期の茎では同 10 cm の範囲から 5 mm の長さの節切片または節間切片を調製し、基本培地を入れた試験管 (180×18 mm) に 1 切片ずつ横向きに置床した。培養 90 日後に子球形成切片数及び総子球数を調査した (第 2 表)。

その結果、本実験では汚染された切片はほとんどみられなかった。

節切片は萌芽後 25 日に採取したものを除いて、80% 以上の非常に高い子球形成率を示した。一方節間切片の子球形成は節切片に比べて劣り、最も高い形成率を示した萌芽後 10 日の切片で 29% であった。

第 2 図に切片の茎上の位置と子球形成率との関係を示した。萌芽後 25 日採取の茎では、節切片中頂部 5 cm より下の位置から調製したものの一部は子球を形成しなかったが、他の時期に採取した茎の節切片のほとんどはその位置に関係なく子球を形成した。

萌芽後 10 日及び 15 日採取の茎では、茎頂から 2.5 cm の範囲では節間切片が得られなかったが、頂部 2.5 cm 以下 5 cm の間から調製した節間切片は高い子球形成率を示した。しかしそれより基部の部分から調製した節間切片はほとんど子球を形成しなかった。萌芽後 20 日に採取した茎の節間切片の子球形成率は茎上での位置に関係なく著しく低く、また萌芽後 25 日に採取した茎では頂部 3.5 cm の範囲から調製した節間切片は子球を形成したが、それ以外の切片は一部のものを除いて子球を全く形成しなかった (第 2 図)。

考 察

組織培養によるユリの繁殖については鱗片のほかに葉(9)、花被片(14)や雄ずい(6)から子球が再生することが既に報告されているが、本研究の結果新たに茎や花柱の切片でも子球が形成されることがわかった。球根植物の節間切片からの植物体分化については Wright and Alderson(16) がチューリップの花茎のそれからのシュート形成について報告している。ユリの節間切片からの子球形成については、その可能性が澤ら(11)のテッポウユリの茎挿しによって示されたが、著者らが知る限りでは今までのところ他に詳しい報告はない。本研究では節間切片からの子球分化過程について組織学的に調査しなかったため、その詳細は不明である。他の単子葉植物の鱗片(15)や茎(5)及びトレンニアの茎(1)では表皮や表皮直下の柔細胞群が分裂を行って植物体を分化することから、ヒメサユリの節間切片からの子球分化もこれらの細

胞群に由来しているものと思われるが、その過程については現在調査中である。

切片外植体の子球形成能力が植物体の採取時期や各部分上での位置によって大きく左右されることはテッポウユリ(2)やカノユリ(10)の鱗片培養やチューリップの花茎切片の培養(16)で報告されている。ヒメサユリでも同様なことが鱗片(8)と葉(9)の培養で確認されており、更に本研究によって茎や花被片でも確認されたことから、植物体はその部分、更にはそのなかでの位置によって子球形成能力が異なるといえよう。これは萌芽から開花までの間で、部分ないしはそのなかでの位置によって組織の成熟度が異なることと関連していると思われる。例えば花被や茎は花糸や花柱と比べその生長を比較的早く完了し、一方花糸や花柱はその生長を遅くまで続けているものと推定される。このような組織の成熟度または細胞分裂活性能力の違いは各器官に含有される内生ホルモンをはじめとする種々の物質の種類や含量・活性に関連していると思われ、これが採取時期による子球形成能力の差となって現われるものと考えられる。また同様な理由で、各植物体部分についてもそのなかでの位置による相違がみられるであろう。しかし今までのところ、これらの点を詳しく解析した報告はほとんどなく、今後研究されるべき課題といえよう。

テッポウユリの鱗片培養では 100 個の鱗片から 8,000 個以上の子球が得られる(13)。ヒメサユリの場合、鱗片挿しと鱗片培養(3,8)の結果からみて、その鱗片がテッポウユリのような高い子球形成能力を持っているとはいえない。また本研究の結果からも明らかのように、鱗片が他の植物体部分と比べて子球再生能力が特にすぐれているとはいえないことから、ヒメサユリの組織培養による子球増殖のためには鱗片のほかに花被片、茎及び葉の切片を培養することが有効と思われる。しかし鱗片は滅菌操作がきわめて煩雑であることから、花被片、茎及び葉の利用がより効率的かもしれない。

前報(9)及び本研究の結果から、組織培養による子球増殖のためには、萌芽 1, 2 週間後に蕾、葉及び茎を採取し、未展開葉や花被片では基部約 1~2 cm の範囲から、茎では頂部約 5 cm の範囲からそれぞれ約 5 mm の長さの切片を調製して培養することが、現在考えられる最も効果的な方法と結論できよう。

摘 要

1. ヒメサユリ (*L. rubellum* Baker) の組織培養による繁殖を効果的に進めるため、既に報告した葉(9)の他に鱗片(対照)と同等またはそれ以上の効率で子球を形成する植物体部分があるかどうかを萌芽期から開花期

までの植物体を用いて検討した。

2. 花被片, 花糸, 花柱及び茎は子球を形成したが, それは採取時期によって異なった。すなわち花被片や茎は開花4週間前及び同2週間前, 花柱や花糸は開花時に採取した場合に比較的高い子球形成能力を示した。

3. 花被片, 花糸及び花柱は, それらの基部側からの切片が高い子球形成率を示し, 茎では頂部付近からの切片が多くの子球を形成した。

4. 萌芽後比較的早い時期に採取した茎の頂部5cmから調製した節切片及び節間切片はともに多くの子球を形成し, 特に節切片は非常に高い子球形成能力を持つことがわかった。

5. 本研究の結果から, ヒメサユリの組織培養による子球増殖のために, 花被片や茎は外植体としてきわめて有効で, それらの鱗片とほぼ同等かそれ以上の子球形成能力を持つことがわかった。

謝辞 本研究は萩屋薫教授の指導の下に行われた。英文の校閲をいただいた S. M. Goldstein 教授 (パデュー大学) に謝意を表します。

引用文献

1. CHLYAH, H. 1974. Etude histologique de la néoformation de méristèmes caulinares et radiculaires à partir de segments d'entre-nœuds de *Trenia fournieri* cultivés *in vitro*. Can. J. Bot. 52 : 473—476.
2. HACKET, W. P. 1969. Aseptic multiplication on lily bulblets from bulb scales. Intern. Plant prop. Soc. Proc. 19 : 105—108.
3. 池田幸弘. 1966. ヒメサユリの増殖試験. 昭和40年度試験成績 (花卉) (新潟園試) : 73—75.
4. 池田幸弘. 1971. ヒメサユリに関する研究 (第2報) 変異ならびに園芸品種としての利用について. 新潟園試研究. 6 : 42—70.
5. KATO, Y. Adventitious bud formation in etiolated stem segments and leaf callus of *Heloniopsis orientalis*. Z. Pflanzenphysiol. 75 : 211—216.
6. MONTEZUMA-DE-CARVALHO, J. and M. L. GUIMARAES. 1974. Production of bud and plantlets from the stamen's filaments of *Lilium regale* cultivated *in vitro*. Biol. Plant 16 : 472—473.
7. MURASHIGE, T. and F. SKOOG. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15 : 473—497.
8. 新美芳二・小野沢剛. 1977. ヒメサユリ (*Lilium rubellum* Baker) の栄養繁殖に関する研究. 第1報. リン片培養とリン片ざしによる子球形成. 園学要旨. 昭52秋 : 348—349.
9. NIIMI, Y. and T. ONOZAWA. 1979. *In vitro* bulblet formation from leaf segments of lilies, especially *Lilium rubellum* Baker. Scientia Hort. 11 : 379—389.
10. ROBB, S. M. 1957. The culture of excised tissue from bulb scales of *Lilium speciosum* Thun. J. exp. Bot. 8 : 348—352.
11. 澤 完・別府恵美子・門田寅太郎. 1972. ユリの挿し木繁殖に関する研究. 第1報. テッポウユリの茎挿しについて. 園学要旨. 昭47秋 : 322—323.
12. SIMMONDS, J. A. and B. G. CUMMING. 1976. Propagation of *Lilium hybridum*. II. Production of plantlets from bulb-scale callus culture for increased propagation rates. Scientia Hort. 5 : 161—170.
13. STIMART, D. P. and P. D. ASCHER. 1978. Tissue culture of bulb scale sections for asexual propagation of *Lilium longiflorum* Thunb. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 103 : 182—184.
14. TAKAYAMA, S. and M. MISAWA. 1979. Differentiation in *Lilium* bulb scales grown *in vitro*. Effect of various cultural conditions. Physiol. Plant. 46 : 184—190.
15. 田村 親. 1978. ヒヤシンスの培養リン片における不定芽形成. 園学雑. 46 : 501—508.
16. WRIGHT, N. A. and P. G. ALDERSON. 1980. The growth of tulip tissues *in vitro*. Acta Horticulturae 109 : 263—270.