チューリップの栄養繁殖に関する研究(第1報)

培養リン片における器官形成について

西内 義男・明 道 博

(北海道教育大学旭川分校)(北海道大学農学部)

Studies on Vegetative Propagation of Tulip

I. Organ Formation from Excised Bulb Scales in Vitro

Yoshio NISHIUCHI

Asahikawa College, Hokkaido University of Education, Asahikawa

Hiroshi MYODO

Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo

Summary

The present investigation aimed at the development of a new technique for propagation of tulip bulb by means of tissue culture in vitro. Excised scales of the bulbs derived from eight commercial varieties; i.e., 'Apeldoorn', 'César Frank', 'Cramoisi Brilliant', 'Defiance', 'Fuga', 'Monsieur S. Mottet', 'Red Emperor', 'William Pitt' and three botanical species, namely, *Tulipa hageri*, *T. praestans* and *T. tubergeniana* 'Emir' which were cultured on synthetic media for the purpose of determining the most favorable conditions for their organ formation.

1) Callus formation of cultured scales obtained from 'Apeldoorn', 'Red Emperor', 'Defiance' and *T. praestans* was spontaneously induced on the modified Murashige and Skoog medium supplemented with α -naphthaleneacetic acid (NAA) or 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) at the appropriate concentration, whereas the scales of 'William Pitt' and 'Cramoisi Brilliant' failed to develop the callus in any case.

2) With regard to the formation of shoot-like protuberances on the cultured scales, the scale tissue of 'Apeldoorn' cultured on the medium containing either NAA 5 mg/l plus kinetin 1 mg/l or 2,4-D 1 mg/l plus kinetin 1 mg/l was capable of producing the shoot-like protuberances. In the case of *T. hageri*, the protuberances were formed on a medium with NAA 2, 10 and 25 mg/l to each of which was added 1 mg/l kinetin.

3) The scales of 'Apeldoorn', 'William Pitt' and 'Fuga' formed adventitious roots 20 to 30 weeks after inoculation, when they were cultured on a medium supplemented with NAA or a suitable combination of NAA and kinetin.

緒 言

栄養体繁殖によつて増殖を行なう花卉球根類は一般に増殖率が低い、これを高める方法としてユリやアマリスなどではリン片さし、またヒヤシンスではノッチング、スクーピング、コーリングなどの傷つけ繁殖法などが実用化されている。しかしこれらの方法はいずれもチューリップの増殖には利用することが困難とされている。チューリップはその発育相としての Juvenile phase が長く、は種から開花にいたるまでに約5年を要し、また一般にその後の球根増殖能率が低いために一つの新品

種を確立するための球数(開花球として約2,000球)に達するには10~20年を要する。したがつてこれを短期間で増殖することのできる能率的な繁殖方法の確立が切に望まれているところである。従来は、は種から開花にいたるまでの期間の短縮に関する研究(10)、球根貯蔵中の高温処理、いわゆる花飛ばし法による球根増殖率の増大に関する研究(11, 12)などが行なわれているが球根分割やリン片繁殖などによる栄養繁殖法はまだ成功をみていない。近年、組織培養技術の進歩にとりなつて、これまでは難しかつた球根類についても不定芽や不定根形成を誘導し、これにより新個体を作る可能性が期待される

1975年5月16日 受理

ようになった(9)。もしチューリップにおいてもこの増殖技術の適用が可能となれば極めて有利であるに違いない。このような観点より筆者らはチューリップ球根のリン片の組織培養を試み、そのカルス形成や器官分化に必要な諸条件について検討を加えた。

実験材料および方法

本実験に供試したチューリップは園芸品種が8種('Apeldoorn', 'César Frank', 'Cramoisi Brilliant', 'Defiance', 'Fuga', 'Monsieur S. Mottet', 'Red Emperor', 'William Pitt') および Botanical species が3種(*T. hageri*, *T. praestans*, *T. tubergeniana* 'Emir') である。球根を無菌室内において5% アンチホルミン液で20分間表面殺菌した後、満菌水で3回洗滌した。球根の基部にはえき芽があるため、この部分をあらかじめ除去し、リン片を厚さ1.5~2.5 mm、生重100~150 mgの組織片としてとり、これを培養材料とした。培養基は Mura-shige および Skoog の培地(4) をカゼイン加水分解物2 g/l およびグリシン 20 mg/l、ニコチン酸 5 mg/l、ピリドキシン 5 mg/l、チアミン 1 mg/l、イノシトール 200 mg/l に修正した。さらに α -ナフトレン酢酸(NAA) または 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸(2,4-D) とカイネチン(KIN) を適宜添加し、これに2% 蔗糖および0.7% 寒天末を加え、pH 5.6 に調整後 100 ml 容フラスコに30 ml ずつ分注した。これを二重のアルミ箔で覆い、7分間加圧滅菌(120°C 1 kg/cm²) を行なつた。このようにして調整した固型培地上に、上記の組織片を2個ずつ移植し、室温、16時間日長の人工照明下で培養した。なお、リン片は開花直前(5月中旬)より11月中旬までの間、2~3週ごとに採取して培養材料に供した。

実験結果および考察

(1) カルス形成について

組織培養に供した11種の中でカルス形成の容易な球根は 'Apeldoorn', 'Red Emperor', *praestans* および 'Defiance' の4種であり、他の *hageri*, *tubergeniana* 'Emir', 'Fuga', 'César Frank' および 'Monsieur S. Mottet' などは培養を長期間続けることによつてカルスの形成がみられたが、'William Pitt' と 'Cramoisi Brilliant' はいかなるオーキシシン濃度においてもカルスの形成はきわめて困難であつた。カルス形成におよぼすオーキシシン濃度の影響は第1表に示すように 'Apeldoorn', 'Red Emperor' および *praestans* にはいずれも NAA を添加した場合には本実験に用いた低濃度から高濃度まで広い範囲にわたりカルスの形成がみられ、このうちカルス形成の最適濃度は 'Apeldoorn' では 10~15 mg/l, 'Red Emperor' では 5~15 mg/l, *praestans* で

第1表 チューリップリン片のカルスの形成および増殖におよぼすオーキシシンの影響(9週間培養)
- : カルス形成なし, ± : 一部にカルス形成あり,
+ : カルス形成あり, +++ : 形成このカルスの増殖も良好

オーキシシン濃度	品種	'Apeldoorn'	'Red Emperor'	<i>T. praestans</i>
NAA 0 mg/l	0	-	-	-
	0.05	-	-	-
	0.5	+	±	+
	1	+	±	+
	2	+	+	+
	5	+	+++	++
	10	++	+++	+
2,4-D 0.1 mg/l	15	++	+++	+
	25	+	++	-
	0.1 mg/l	-	-	+
	0.5	±	±	+
	1	+	+	+
	5	+	++	-
	10	-	+	-

第2表 チューリップリン片のカルスの形成および増殖におよぼすオーキシシンとサイトカイニンの影響(9週間培養)
- : カルス形成なし, ± : 一部にカルス形成あり,
+ : カルス形成あり, +++ : 形成このカルスの増殖も極めて良好

() 内の値は褐変、壊死した Red Emperor の培養切片数。

オーキシシン濃度	カイネチン濃度	品種	<i>T. hageri</i>	'Red Emperor'
NAA 0 mg/l	KIN 1 mg/l	-	-	-
	5	-	-	-
	10	-	-	-
	1	+	++++ (0/24)	
	5	+	++++ (0/25)	
	10	+	++ (2/24)	
	20	+	+	(9/25)
NAA 2 mg/l	KIN 1 mg/l	+		
	2	+		
	0	+		
	10	+		
	25	+		
	0	++		
	0 mg/l	-		
2,4-D 0.1 mg/l	KIN 0 mg/l	-		
	0	-		
	0.1	+		
	0.1	+		

は 2~5 mg/l であつた。カルス形成におよぼす KIN の影響は第2表に示すように 'Red Emperor' では NAA 単独添加の場合に比較して、KIN (1~5 mg/l) が共存するとカルスの増殖は促進された。しかし、KIN 濃度を 10~20 mg/l に高めると逆にカルスの増殖は抑制され、褐変壊死するリン片が増加した。一方、*hageri* では NAA 単独添加の場合には 25 mg/l 高濃度でカルス形成が良好

第3表 チューリップリン片のカルス形成率におよぼす
培地の pH の影響（6週間培養）
カルス形成率は〔カルス形成のみられた切片数/
植込み切片数〕を百分率で示した。

pH 値	品種	'Apeldoorn'	'Red Emperor'
4.0		82%	69%
4.5		87	83
5.0		86	93
5.6		100	92
6.0		100	93

第4表 チューリップリン片のカルス形成におよぼす培
地の蔗糖濃度の影響（6週間培養）
表示は第1, 2表に準ずる。

蔗糖濃度	<i>T. praestans</i>	'Red Emperor'
0 %	+	+
0.5	+	+
1	+	+
2	+	+
4	+	±
8	—	—

であり、これより低い 2 mg/l ではその生育はわずかしか認められなかつた。しかし、このカルの生育は KIN の添加により促進された。また、2・4-D と KIN を組合わせた場合、2・4-D 0.1 mg/l～1.0 mg/l の単独添加ではカルの形成はみられないが、これに 0.1 mg/l の KIN を加えると、いずれも良好なカルの形成がみられた。また、KIN 単独添加ではいずれの濃度においてもカルス形成はみられなかつた。すなわち、KIN の添加はオーキシンによるカルス形成を促進し、また、KIN は単独では効果がなく、オーキシンの限界濃度の場合に有効であるものと考えられる。

チューリップの生育段階とカルス形成能力の関連は *praestans* の場合に顕著にみられた。すなわち、生育初期の新球の肥大があまり進んでいない段階では、培養リン片のカルス形成およびその増殖は極めて良好であつたが7月中旬の収穫期に採取したリン片では、いかなる培地上においてもカルの形成およびその増殖率は著しく低かつた。しかし 10～11 月になると再びカルス形成は旺盛になつた。このような変化は、収穫期にはチューリップの球根中に生長抑制物質が蓄積される(1) ためと考えられる。

カルス形成におよぼす培地の pH の影響についてみると、第3表に示すように 'Apeldoorn'、'Red Emperor' はともに pH 5.0～6.0 の培地で良好な結果を示したが、これより酸性の pH 4.0～4.5 では明らかに抑制的効果がみられた。また、カルス形成におよぼす培地の蔗糖濃度の影響は第4表に示すように蔗糖濃度が 0.5～2% が好適

であるが、それを全く加えない場合においてもカルの形成はみられた。しかし、これより濃度を高めると阻害効果が著しくなつた。

リン片より生じたカルスを増殖させる目的でカルの継代培養を行なつた。すなわち、NAA (0.01～10 mg/l) および 2・4-D (0.01～5 mg/l) にそれぞれ KIN (0.01～10 mg/l) を添加した培地にカルス片を移植した場合には、いずれも増殖は全くなく、褐変あるいは壊死する傾向がみられた。このことからカルの増殖を誘導するためには、培地中に何らかの物質が不足していたものと考えられる。そこで、培地にリン片から凍結抽出によつて得た汁液を種々の濃度で加えて培養してみたところ、カルの褐変および壊死はみられなかつたが、カルスを増殖させることができるまでには到らなかつた。

(2) 器官形成について

不定根や不定芽の分化はカルス形成の良好な培地において、リン片を長期間培養することによつて得られた。すなわち、'Apeldoorn' では NAA 5 mg/l と 2・4-D 1 mg/l にそれぞれ KIN 1 mg/l を添加した培地で培養すると、9週目に維管束付近から生じたカルの1部に突起を生じ、そのうち、これが shoot 様の生長を行なつた(第1図A-D)。これらの内部形態を観察したところ、

第1図 'Apeldoorn' のカルスから生じた不定芽突起

A, B: 2・4-D 1 mg/l + KIN 1 mg/l,
C: 2・4-D 1.2 mg/l + KIN 2 mg/l,
D: NAA 5 mg/l + KIN 1 mg/l.

第2図 'Apeldoorn' の不定芽状突起の縦断面

A：維管束部，B：細胞中のデンプン粒，
C：基部の生長点原基

導管が発達し（第2図A），周囲の細胞にはデンプン粒の蓄積が認められ（第2図B），また，基部には生長点原基の分化がみられた（第2図C）．NAA単独添加の培地で培養した場合には22週ごとに不定根の発生がみられた（第6図A）．一方，*hageri*ではNAA 2, 10, 25mg/lにそれぞれKIN 1mg/lを添加した培地で培養すると，10週ごとにカルス組織より細小な突起が多数発生した（第3図A）．これらの突起はそののち伸長生長し，培養30週ころには，その基部が球根様に肥大した（第4図）．これらの内部形態を観察したところ，第5図に示すようにその基部に生長点様の器官分化が起こり，導官の分化もみられた．

第3図 *T. hageri* のカルスから生じた不定芽状突起
A：培養12週目，B：培養20週目． 第4図 基部の肥大した *T. hageri* の不定芽状突起培養30週目

'Fuga'では，NAA 10mg/lおよび25mg/lにKIN 1mg/lを添加した培地で培養すると，22週ごとにカルスの内部から不定根の発生がみられた（第6図B）．'William Pitt'では，NAA 2mg/lにKIN 1mg/lを添加した培地で培養すると，22週ごとにリン片より不定根が発生し，そののち伸長生長を続けた（第6図C）．また，高濃度のNAAや2,4-Dを単独で添加した培地においても不定根が発生した．

第5図 *T. hageri* の不定芽状突起の縦断面
葉鞘状組織の中心に茎の生長点様分裂
組織がみられる。

このような組織培養による器官の分化に関しては、これまでに多くの植物で観察されており、最近においてもペチュニア(7)、ペゴニア(2)、などの葉、茎、葉柄、また、球根類ではアマリリス(3)、ヒヤシンス(5, 6)、ユリ(8)、などのリン片の組織培養では容易に不定芽や不定根が形成され、個体形成がみられている。これらの場合、不定芽の分化はオーキシン濃度に対しサイトカイニン濃度が高い場合にみられ、逆にオーキシン濃度に対しサイトカイニン濃度が低くなると不定根が発生する傾向がみられている。本実験において、'Apeldoorn' の場合にはオーキシンとサイトカイニンが共存する場合に不定芽状突起の発生がみられ、NAA 単独の場合には不定根の発生がみられたことから、これまでに知られている不定

芽や不定根の分化におよぼすオーキシンとサイトカイニンの比の効果に従うものと思われる。一方、'Fuga' や 'William Pitt' などでは、オーキシンとサイトカイニンが共存した場合には不定根の発生が良好であり、これに対し不定芽は、オーキシンとサイトカイニンのどのような濃度の組合わせの場合にも発生しなかったことから、チューリップの品種によりその内的条件は異なるためと考えられ、不定芽の発生のためには、それぞれの品種の内生ホルモンレベルを含めた内的条件を知ることと同時に、培地などの検討が必要であると思われる。

摘 要

本研究はチューリップ球根の人為的栄養繁殖の可能性を追求するために、リン片培養組織における器官形成の条件を明らかにする目的で行なった。

1) 培養に供した球根のうち、'Apeldoorn', *T. praestans*, 'Red Emperor', および 'Defiance' はカルス形成が容易であつたが、'William Pitt' と 'Cramoisi Brilliant' はカルス形成が極めて困難であつた。

2) 不定芽状突起の形成は 'Apeldoorn' では NAA 5 mg/l + KIN 1 mg/l および 2,4-D 1 mg/l + KIN 1 mg/l の組合わせにおいて誘導されたが、*T. hageri* では NAA 2, 10, 25 mg/l + KIN 1 mg/l のいずれの組合わせの場合においてもみられた。

3) 不定根の形成は 'Apeldoorn', 'Fuga', 'William Pitt' において、長期間培養によりみられた。

謝 辞 本実験に際し、終始ご援助下さつた北海道大学農学部岡沢義三教授、また実験の実施にあつては同学部花卉・造園学教室、果樹・そ業園芸学教室ならびに作物生理学教室の各位のご協力を得た。記して深謝の意を表する。

第6図 リン片のカルスから生じた不定根
A: 'Apeldoorn', B: 'Fuga', C: 'William Pitt'.

引用文献

1. 伊東秀夫・加藤徹・豊田篤治. 1960. チューリップのサーモペリオディシティと球根成分の消長について. 園学雑. 29 : 323—330.
2. FONNESBECH, M. 1974. The influence of NAA, BA and temperature on shoot and root development from *Begonia* × *cheimanth* petiol segments grown in vitro. *Physiol. Plant.* 32 : 49—54.
3. MII, M., T. MORI and N. IWASE. 1974. Organ formation from the excised bulb scales of *Hippeastrum hybridum* in vitro (Research Note). *J. Hort. Sci.* 49 : 241—244.
4. MURASHIGE, T. and F. SKOOG. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15 : 473—479.
5. PIERIK, R. L. M. and J. WOETS. 1971. Regeneration of isolated bulb scale segments of hyacinth. *Acta. Hort.* 23 : 425—428.
6. ——— and M. A. RUBING. 1973. Regeneration of bulblets on bulb scale segments of hyacinth in vitro. *Neth. J. Agr. Sci.* 21 : 129—138.
7. RAO, P. S., W. HANDRO. and H. HARADA. 1973. Hormonal control of differentiation of shoots, roots and embryos in leaf and stem culture of *Petunia inflata* and *Petunia hybrida*. *Physiol. Plant.* 28 : 458—463.
8. ROBB, S. M. 1957. The culture of excised tissue from bulb scales of *Lilum speciosum* Thun. *J. Exp. Bot.* 8 : 348—352.
9. STICHEL, E. 1959. Gleichzeitige induktion von Sprossen und Wurzeln an in vitro kultivierten Gewebestücken von *Cyclamen persicum*. *Planta.* 53 : 293—317.
10. 高野泰吉・樋口春三. 1966. チューリップの発育相と温度. 日本植物生理学会第7回シンポジウム講演要旨. 35—39.
11. 豊田篤治・西井謙治. 1957. チューリップの「花飛ばし」高温処理に関する研究 (第1報). 処理時期, 日数が発育開花並びに球根収量に及ぼす影響について. 園学雑. 26 : 243—250.
12. ———・———. 1958. チューリップの「花飛ばし」高温処理に関する研究 (第2報). 花芽阻害の経過及びその程度と球根収量との関係について. 園学雑. 27 : 63—67.