In vitro 培養により再生したササユリ子球の維管束形成

水口 茂・大川勝徳・大城智弘

金沢大学自然科学研究科 920-1164 金沢市角間町

Formation of Vascular Bundles in Bulblets Regenerated from Scale of *Lilium japonicum* Thunb. in Vitro

Shigeru Mizuguchi, Masanori Ohkawa and Tomohiro Ohshiro

Department of Molecular Physiology, Division of Life Science, Graduate School of Natural Science and Technology, Kanazawa University, Kakuma, Kanazawa 920-1164

Summary

In vitro experiments were conducted to clarify the process of forming the vascular bundle system in regenerated bulblets from the mother scale of *Lilium japonicum* Thunb. cultured on MS medium. The medium contained $0.2\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$ α -naphthaleneacetic acid (NAA) and $0.01\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$ benzyladenine (BA) or $0.01\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$ NAA and $2.0\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$ BA or no plant growth regulators.

There were one major and two minor vascular bundles in the scale of the bulblets cultured for 8 weeks in vitro. A collateral vascular bundle (CVB) exists in the scale and in the basal plate of the bulblets; a radial vascular bundle (RVB) differentiated in the roots developing from the basal plate of the bulblets. Major vascular bundles of the bulblet scale were connected to those of the scale two nodes below; minor ones were connected to the vascular bundle of the scale one node below. Root primordia were formed from the ring tissue at the basal plate of the bulblet.

The regular system of vascular bundle was established in the regenerated bulblets cultured for 4 weeks on the medium without plant growth regulators, but it did not form on the medium containing $0.01\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$ NAA and $2.0\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$ BA. Many vascular bundle interlinkages are present in the central part of the bulblets grown on the medium with $0.01\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$ NAA and $2.0\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$ BA. Thus, a high concentration of benzyladenine (BA) results in irregular vascular bundle system in regenerated bulblets.

Key Words: in vitro propagation, *Lilium japonicum*, vascular bundles.

緒 言

ササユリにおいて, in vitro 培養によりりん片やカルスから大量の子球を得ることは増殖に有効な方法と考えられる(水口・大川, 1994). これまで子球の再生や発育について, 種々の植物生長調節物質が検討されてきた(Takayama・Misawa, 1983; 水口ら, 1994). しかし, りん片やカルスを高濃度の植物生長調節物質の添加した培地で培養した場合には, 再生した子球は急激に肥大し変形することが知られている(水口・大川, 1994). 変形した子球はりん片や根の発育が不良であることから, これを低温処理後に順化した場合には腐敗することが多い(水口・大川, 1994). これらの原因の一つとして, in vitro 培養における植物生長調節物質の濃度が子球の維管束の形成に影響を及ぼすことが考えられる.

In vitro 培養により子球を発育させる場合には, 再生

した子球のりん片, 短縮茎および根の間を連絡する維管束の正常な発達が重要である. しかし, これまでに in vitro 培養におけるユリ科植物の子球の維管束の発生や発達に関する報告はない.

そこで, 本実験は植物生長調節物質と in vitro 培養により再生したササユリの子球の維管束形成との関係を明らかにする目的で行った.

材料および方法

実験1. 子球の維管束配列

子球の形成: ササユリの球根は1995年4月1日に石川県珠洲市で採取した. 球根は水道水で洗浄し, 球根から剥離したりん片を70%エタノール液で15秒間および1.0%次亜塩素酸ナトリウム溶液で13分間滅菌した後, 滅菌水で3回洗浄した. 培地には Murashige・Skoog (1962) の無機塩を用いミオイノシトール $100\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$, ニコチン酸 $0.5\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$, ピリドキシン塩酸 $0.5\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$, チアミン塩酸 $0.1\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$, グ

1996年12月13日 受付. 1997年5月30日 受理.

リシン $2.0\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$ およびショ糖 $30\text{g}\cdot\text{liter}^{-1}$ を添加した後, pH を 5.8 に調節し, 固化剤として寒天 $8\text{g}\cdot\text{liter}^{-1}$ を添加した. 次いで培地 15 ml を培養管 (口径 $25\text{mm}\times$ 高さ 100mm) に分注して, $1.2\text{kg}\cdot\text{cm}^{-2}$, 120°C で 15 分間オートクレーブで滅菌した. りん片は周縁部分を約 2.0mm 除去した後, 植え付ける直前に 0.2% TBZ 溶液 (Ohkawa・Mizuguchi, 1994) に数秒間浸漬処理し, 背軸面が培地に接するように置床した. 培養は 25°C , $2,000\text{lx}$ 連続光で 8 週間行った.

維管束の観察: 培養 8 週間後にりん片上に形成された子球を FAA で固定後, 第三ブチルアルコールで脱水し, 常法のパラフィン法により厚さ $10\mu\text{m}$ の縦断および横断の連続切片を作製した. 染色はディラフィールドのヘマトキシリンとサフラニンの二重染色で行った (亘理, 1979). 作製した連続切片は光学顕微鏡で観察した.

実験 2. 子球の維管束の発達に及ぼす NAA と BA の影響

実験 1 で再生した子球を移植片のりん片から分離して NAA $0.2\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$ と BA $0.01\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$, NAA $0.01\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$ と BA $2.0\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$ および植物生長調節物質無添加の 3 種類の培地にそれぞれ 10 個体ずつ置床し培養した. 培養 4 週間後に各区から約 30mg の子球を選び, 実験 1 と同様に FAA で固定し, 縦断および横断連続切片を作製した後, 光学顕微鏡で観察した.

結 果

1. 子球の維管束

維管束の識別: 培養 8 週間後に再生した子球の維管束を観察した結果, 木部の横断面組織はサフラニンで淡赤色を呈するとともに, その細胞壁は肥厚していた. 縦断面では細胞壁が網状やせん紋を示し, 師部は細胞質を有していた.

維管束の形態: 再生した子球の前形成層は基本分裂組織に形成されていた. りん片の横断切片では, りん片中央部に 1 本の太い大維管束 (MV) とその両側に 2 本の細い小維管束 (mv) が認められた (第 1 図-A). りん片維管束の木部 (X) は向軸側に, 師部 (P) は背軸側に認められた. しかし, 木部と師部を囲む維管束鞘の存在は確認できなかった (第 1 図-B). 一方, 大維管束と小維管束はともに並立維管束であった.

短縮茎に走入した維管束の木部はりん片と同様に向軸側に, 師部は背軸側に認められた (第 1 図-C-D). また, 短縮茎内の維管束は上位節から下位節に縦走し, さらに子球基部の節で横走していた. これらの維管束はりん片と同様に並立維管束であった. 根原基は短縮茎内を横走している維管束組織から分化していた (第 1 図-D).

発達した根の横断面組織では, 内側に木部, 外側に師部が観察され, さらに師部は内鞘で囲まれており, 放射中心柱であった. しかし, 内皮と皮層は明確に区別できなかった (第 1 図-B). りん片の木部と師部は短縮茎に走入し, 短縮茎からそれぞれ根の木部と師部に連絡していた (第 2 図).

2. 子球の大維管束の走向

培養 8 週間後における子球の大維管束 (MV) の走向を第 3 図に示した. りん片の形成順序は茎頂部直下のりん片原基を N 節とし, 以下 1 節下を N-1 節, 2 節下を N-2 節とした. 未発達で前形成層段階である N 節のりん片の維管束は N-1 節の方向に縦走していた (第 1 図-F). N-1 節の維管束は基部の方向に縦走し, N-3 節と連絡していた (第 1 図-G). また, N-2 節と N-3 節も同様に 2 節下のりん片の維管束とそれぞれ連絡していた. N-4 節と N-5 節の維管束は上位節の維管束と連絡し, さらに移植片のりん片の維管束に連絡していた (第 1 図-H).

3. 子球の維管束の発達に及ぼす NAA と BA の影響

再生した子球を植物生長調節物質無添加培地で 4 週間培養した子球における大維管束と小維管束の走向を第 4 図に示した. N-1 節のりん片原基の大維管束は縦走して, N-3 節の維管束と連絡していた. 一方, 小維管束は 1 節下の N-2 節の維管束と連絡していた. 以下 N-2 節, N-3 節および N-4 節における各りん片の維管束の走向は, 大維管束が 2 節下, 小維管束が 1 節下にそれぞれ縦走して, りん片の維管束と連絡していた. また, N-5 節の維管束はそれより上位節にあるりん片の維管束と連絡していた.

NAA $0.01\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$ と BA $2.0\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$ との併用区において, 再生子球の維管束走向の規則性は認められなかった (第 5 図-A-B-C-D). また, この併用区の子球は無添加区と比較して球状化しており, 球状化した子球のりん片の大きさは不均一であった. 維管束数は約 1.3mm 幅のりん片で 3 本, 約 3.0mm 幅で 7 本それぞれ認められたが, 大維管束と小維管束は明確に区別できなかった (第 5 図-A).

NAA と BA との併用区では, 無添加区と比較して基本分裂組織の前形成層がより発達していることが認められた (第 5 図-B). りん片から短縮茎内に走入した維管束は短縮茎の内部で分岐したが, 走向は不規則であった (第 5 図-C). しかし, 短縮茎の基部では, 無添加区と同様に上位節のりん片から縦走してきた維管束は下位節の維管束と連絡していた (第 5 図-D).

NAA $0.2\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$ と BA $0.01\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$ との併用区の子球の短縮茎では, りん片から走入した並立維管束が N-4 節と N-5 節で横走し, 輪状の組織が形成され

ていた。そして、根原基はこの輪状の組織から発生することが認められた (第5図-E)。

考 察

In vitro で培養したササユリの子球を開花可能な球根にすることは種苗生産上、重要である。植物生長調節物質により再生した子球の維管束を発達させることは子球

から球根育成する際に重要なことと考えられる。筆者らはササユリの再生子球を高濃度の植物生長調節物質を添加した培地で培養した場合に、子球は急速に肥大するが、葉や根の原基の形成は抑制されることを報告した (水口・大川, 1994)。その理由として、高濃度のサイトカニンはりん片の細胞分裂、オーキシンは根の細胞分裂を促進させた結果、各器官の発達が旺盛になることから、

Fig. 1. Photomicrographs of transverse (A-E) and longitudinal (F-H) sections of bulblets regenerated from mother scale of *Lilium japonicum*. The bulblets were cultured on MS medium without plant growth regulators.

A ; vascular bundles in the scale. B ; collateral vascular bundle in the scale. C ; MV inserts into basal plate. D ; vascular bundle in the basal plate. E ; radiate vascular bundle in the root. F ; vascular bundle in the N node extends into N-1 node. G ; vascular bundle in the N-1 node connects to N-2 node. H ; vascular bundle of regenerated bulblet connects to vascular bundle in the mother scale at basal plate. MV ; major vascular bundles, mv ; minor vascular bundles, X ; xylem, P ; phloem, RP ; root primordium PC ; pericycle, V ; vascular bundle. MS ; mother scale. N, N-1, and N-3 indicates the positions of node order. Bars in the A to H represent 200 μ m.

Fig. 2. Illustration of vascular bundle system connected to a scale, a basal plate and a root of the regenerated bulblet of *Lilium japonicum*.
X ; xylem, P ; phloem, S ; scale, BP ; basal plate, R ; root, CVB ; collateral vascular bundle. RVB ; radial vascular bundle.

Fig. 3. Illustration of major vascular bundle system in the regenerated bulblet of *Lilium japonicum*.
MS ; mother scale, X ; xylem and P ; phloem.
Orders of the node are indicated by N-numbers.

子球の維管束は器官の急激な発達に伴わず遅れるものと考えられた。

そこで、本実験では再生子球の発育と維管束の発達が不一致となる原因を解明するため、植物生長調節物質の濃度と子球の維管束の発達との関係を検討した。植物生長調節物質無添加区において、再生された子球のりん片や短縮茎の維管束は向軸側に木部、背軸側に師部が配列する並立維管束であり、それらの木部と師部は並走していた。NAAとBAとの併用区でも木部と師部の配列は無添区と同様であった。

子球に根が発生することは子球生長の点で重要である。

Fig. 4. Illustration of vascular bundle system in the regenerated bulblet of *Lilium japonicum*.
— ; major vascular bundle. ---- ; minor vascular bundle.
Orders of node are indicated by N-numbers.

本実験では、根原基は短縮茎の基部にある輪状の組織で形成されることが認められた (第1図-D)。発生した根は放射維管束を形成し、木部と師部は内鞘の組織に囲まれていたが、内皮の存在は判別できなかった。

一般的に維管束の形成過程では、基本分裂組織で前形成層が形成され、次いで維管束へと発達する。オーチャードグラスの幼植物の場合、基本分裂組織に発達する前形成層は向基的に発達し、N節の葉柄は2節下の葉柄の維管束と連絡することが報告されている (伊東, 1984)。金浜・斉藤 (1986) はキュウリ主茎の維管束配列を調査した結果、茎内では葉柄の維管束に直接連絡する維管束と輪状の組織を経由して連絡する維管束とがあることを報告している。また、葉柄の維管束は2節下の維管束と連絡することが報告されている。本実験の結果から、ササユリの子球においてもりん片から短縮茎に走入した大維管束は縦走して2節下のりん片維管束と連絡していた。また、小維管束は1節下の維管束と連絡して規則的な連絡経路を形成していた (第1図-G, 第4図)。この規則性はオーチャードグラス (伊東, 1984) やキュウリ (金浜・斉藤, 1986) の維管束の配列と類似していた。

培地に NAA $0.2 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ と BA $0.01 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ を併用した場合には、子球基部で横走した輪状の組織から数個の根原基が形成された (第5図-E)。イネでは節間の辺周部維管束環の外側から根原基が形成されることが報告されているが (川原ら, 1968)、ササユリの培養子球の根原基の発生部位について報告はなく、本実験の結果から、培養子球の根原基の発生部位は節に相当する輪状の組織であることが明らかになった。

NAA $0.01 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ と BA $2.0 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ を併用した

Fig. 5. Photomicrographs of transverse (A and E) and longitudinal (B-D) sections of bulblets regenerated from mother scale of *Lilium japonicum*. The bulblets of A to D were cultured on MS medium containing $0.01 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ NAA and $2.0 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ BA. The bulblet of E was cultured on MS medium containing $0.2 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ NAA and $0.01 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ BA.

A ; vascular bundle of scale. B ; ground meristem. C ; branching of vascular bundle. D ; connection of vascular bundle. E ; differentiation of root primordium. V ; vascular bundle, PR ; procambium and RP ; root primordium. Arrows in the A show the vascular bundle of scale.

Bars in the A, C, D and E represent $200 \mu\text{m}$. Bar in the B represents $400 \mu\text{m}$.

培地で培養した再生子球では、りん片の維管束数は無添加区と比較して約2倍であった（第1図-A, 第5図-A）。また、短縮茎内の維管束は分岐や合流がくり返され、不規則な走向を示した（第5図-B-C-D）。このような条件下で発育した子球はりん片や根の発達が不十分となることから、器官を連絡する維管束の発達も不良であることが明らかになった。

本実験の結果から、高濃度のBAは維管束の配列を不規則にすることが明らかとなった。

摘 要

本実験は、ササユリの再生した子球を用いて植物生長調節物質と維管束組織の発達との関係を明らかにする目的で行った。

培養8週間後の再生子球のりん片では、1本の大維管束と2本の小維管束が認められた。維管束の配列ではりん片と短縮茎は並立維管束、根は放射維管束であった。

りん片の大維管束は2節下位のりん片の維管束と連絡し、小維管束は1節下位のりん片の維管束と連絡してい

ることが明らかになった。また、根原基は短縮茎内部に形成された輪状の組織から発生していた。

植物生長調節物質無添加区で培養した再生子球では維管束の走向に規則性が認められたが、NAA $0.01 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ と BA $2.0 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ の添加区では規則性が認められなかった。また、NAA $0.01 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ と BA $2.0 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ を添加した培地で培養した場合、子球の中央部に多くの維管束が認められた。

以上の結果から、高濃度のBAは子球の維管束の配列を不規則にすることが明らかとなった。

引用文献

- 伊東睦泰. 1984. オーチャードグラスにおける分げつ発生の規則性とその攪乱に関する研究. 新潟大農紀. 21:1-97.
- 金浜耕基・斉藤 隆. 1986. キュウリの主茎における維管束の配列. 園学雑. 55:181-186.
- 川原治之助・太田敏郎・長南信雄. 1968. 稲の形態形成に関する研究. 第2報. 水稻地上部における維管束の分化と器官・組織の形成との関連について. 茨城大農報. 16:7-41.
- 水口 茂・大川勝徳. 1994. ササユリの母りん片白色カルス

- 由来の子球の発育に及ぼすナフタレン酢酸とベンジルアデニンの影響. 園学雑. 63 : 429-437.
- 水口 茂・大川勝徳・池川哲郎. 1994. ササユリの母リン片由来白色カルの生長とそのカルスからの子球形成に及ぼすナフタレン酢酸とベンジルアデニンの影響. 園学雑. 63 : 131-137.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15 : 473-497.
- Ohkawa, M. and S. Mizuguchi. 1994. Effect of thiabendazole on prevention of contamination in scale culture of mother bulb of *Lilium japonicum* Thunb. in vitro. *Bull. Fac. Educ. Kanazawa Univ. Nat. Sci.* 43 : 25-28.
- Takayama, S. and M. Misawa. 1983. A scheme for mass propagation of *Lilium* in vitro. *Scientia Hortic.* 18 : 353-362.
- 巨理俊次. 1979. 作物試験法. p. 189-213. 農業技術協会. 東京.