

Studies on callus introduction from the mother-scale of bulbs of *Lilium japonicum* Thunb. in vitro culture

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-03 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/520">http://hdl.handle.net/2297/520</a>

# ササユリ球根の母りん片からin vitro培養による カルス誘導に関する研究

大川 勝徳・水口 茂\*・北嶋 純也

## Studies on callus induction from the mother-scale of bulbs of *Lilium japonicum* Thunb. in vitro culture

Masanori OHKAWA, Shigeru MIZUGUCHI\*  
and Junya KITAJIMA

### Summary

Experiments were conducted to clear effect of plant hormones on callus induction from the mother-scale of bulbs of *Lilium japonicum* Thunb. in vitro culture.

The scales were cultured on MS-media containing various concentrations of 2,4-D and Kinetin or NAA and BA at 25°C continuous light of  $40\mu\text{mol m}^{-2}\text{sec}^{-1}$  for 8 weeks.

The combination of 2,4-D 1.0ppm and Kinetin 1.0ppm was the optimum condition for callus induction from the scales. The callus of 3.1~5.0mm sizes in diameter was formed on the medium of the combination of 2,4-D 10.0ppm and Kinetin 1.0ppm. And also the induction rate of the callus was stimulated by the combination of NAA 10.0ppm and BA 1.0ppm.

### 緒言

ササユリ (*Lilium japonicum* Thunb.) の花は淡桃色で香りが高く、切り花や鉢物に適している。しかし現在市販されている球根は山堀りに依存しており、自生地ではその球根が年々減少している。また山堀りした球根を圃場で栽培しても数年で消失し、その増殖や栽培等の方法はまだ確立されていない (清水, 1987, 仙道, 1971)。

近年組織培養によるササユリの増殖が試みられており、球根のりん片 (水口ら, 1992, 1994) や子球のりん片 (Fukuiら, 1989, 浅尾ら, 1992) を外殖体として子球を増殖した報告がある。しかし著者らは、母球のりん片を切断や植物ホルモン処理をした結果、1りん片当たり形成される子球数は24.4個で、りん片に直接子球を形成する方法には限界があることを報告した (水口ら, 1992)。

一方、テッポウユリでは母球のりん片からカ

ルスを誘導し、そのカルスから子球を大量増殖した報告がある (Simmonds・Cumming, 1976, Stimartら, 1980)。しかしササユリでは母球のりん片からのカルス誘導の方法を確立することが子球を大量増殖する上で重要と考え、植物ホルモンの種類やその濃度のカルス形成に及ぼす影響を明らかにする目的で本実験を行った。

### 材料および方法

#### 1. カルス誘導に及ぼす2,4-DとKinetinの影響

1993年5月1日に石川県珠洲市の雑木林で球根を15球採取して本実験に供した。球根の中部りん片 (水口ら, 1995) を7~8枚剥離し水洗い後、りん片の先端部と周縁部を2~3mm切除し、4~5分割して外殖体とした。これを70%エチルアルコールに15秒間と1.0%次亜塩素酸ナトリウムで15分間滅菌した後、滅菌水で3回洗浄した。培地はMS (Murashige・Skoog, 1962) 基本培地にショ糖3.0%を添加後、pH5.8に調節した。植物ホルモン処理は2,4-DとKinetin

をそれぞれ0.1, 1.0 および10.0ppmを組合わせた9処理区に無添加区(対照)を加えた10区とした。ゲル化剤として寒天0.8%を加え, 100×25(mm)の培養管に15ml分注し, オートクレーブで1.2kgcm<sup>-2</sup>, 120°C, 12分間滅菌した。各処理区の反復数は21である。外殖体は植付け直前に0.2%TBZ(Thiabendazole)溶液に浸漬し(Ohkawa・Mizuguchi, 1994), 背軸面が培地に接するように置床した。培養は25°C, 40μmol m<sup>-2</sup>sec<sup>-1</sup>の光条件で行い, 培養8週間後に外殖体総数に対するカルスを形成した外殖体の割合をパーセントで示した。

## 2. カルス誘導に及ぼすNAAとBAの影響

外殖体の殺菌と培地の調整方法は1と同様である。植物ホルモン処理はNAAとBAをそれぞれ0.1, 1.0および10.0ppmを組合わせた9処理区に無添加区(対照)を加えた10区とした。培養と調査の方法は1と同様である。

## 結果

### 1. カルス誘導に及ぼす2,4-DとKinetinの影響

培養8週間後における母球のりん片からのカルス誘導に及ぼす2,4-DとKinetinの影響をTable 1に示した。カルス誘導率は2,4-D 1.0ppm-Kinetin 1.0ppm区で43.8%と最も高く, 次いで2,4-D 1.0ppm-Kinetin 0.1ppm区と2,4-D 0.1ppm-Kinetin 10.0ppm区でともに37.5%を示した。一方対照区では12.5%であった。2,4-D 10.0ppm区では外殖体に褐変が多く認められた。

### 2. カルスの生長に及ぼす2,4-DとKinetinの影響

培養8週間後の各処理区におけるカルスを大きさ別に示した(Table 2)。1個の外殖体に2カ所以上にカルスを形成した場合は大きい方を調査した。2,4-D 0.1ppm-Kinetin 0.1~10.0ppm区は直径1.0mm以下のカルスが多かった。2,4-D 1.0ppm濃度でKinetin 0.1と1.0ppm区では, 1.1~3.0mmの大きさのカルス形成が良好で, それぞれ3と5個であった。2,4-D

Table 1. Effects of 2,4-D and Kinetin on callus induction from the mother-scale of bulbs.

Plant hormone		Callus induction <sup>2)</sup> (%)
2,4-D (ppm)	Kinetin (ppm)	
0	0	12.5
0.1	0.1	25.0
	1.0	12.5
	10.0	37.5
1.0	0.1	37.5
	1.0	43.8
	10.0	6.3
10.0	0.1	0
	1.0	25.0
	10.0	6.3

<sup>2)</sup>(Number of scales induced callus)/total scales×100.

Table 2. Effects of 2,4-D and Kinetin on the growth of callus on explant.

Plant hormone		Size and callus number per explant		
2,4-D (ppm)	Kinetin (ppm)	1.0	1.1~3.0	3.1~5.0 (mm)
0	0	2	0	0
0.1	0.1	4	0	0
	1.0	0	2	0
	10.0	4	2	0
1.0	0.1	3	3	0
	1.0	1	5	1
	10.0	0	1	0
10.0	0.1	0	0	0
	1.0	1	0	3
	10.0	1	0	0

Table 3. Effects of NAA and BA on callus induction from the mother-scale of bulbs.

Plant hormone		Callus induction <sup>2)</sup> (%)
NAA (ppm)	BA (ppm)	
0	0	12.5
0.1	0.1	18.8
	1.0	18.8
	10.0	13.3
1.0	0.1	41.2
	1.0	31.3
	10.0	35.3
10.0	0.1	11.8
	1.0	56.3
	10.0	6.3

<sup>2)</sup>(Number of scales induced callus)/total scales×100

10.0ppm区ではいずれのKinetin区とも小型カルス形成率が低いが、Kinetin 1.0ppm区では3.1~5.0mmの大型カルスが3個形成された。

### 3. カルス誘導に及ぼすNAAとBAの影響

カルス誘導に及ぼすNAAとBAの影響をTable 3に示した。カルス誘導率はBA 1.0ppm区でNAA濃度を高くすると増加する傾向が認められた。またNAA 10.0ppm-BA 1.0ppm区では56.3%と最も高く、次いでNAA 1.0ppm-BA 0.1ppm区で41.2%であった。一方対照区では12.5%であった。NAA 10.0ppm-BA 10.0ppm区では外殖体に褐変が認められた。

### 4. カルスの生長に及ぼすNAAとBAの影響

各処理区における大きさ別のカルス数をTable 4に示した。NAA 0.1ppm-Kinetin 0.1~1.0ppm区のカルスは1.0mm以下であった。NAA 1.0ppm-BA 10.0ppm区では3.1~5.0mmを5個、またNAA 10.0ppm-BA 1.0ppm区では1.0~5.0mmを9個であった。一方対照区では1.0mm以下を2個認められた。

## 考察

ユリ科植物の場合、カルス培養を繰り返すと遺伝的変異や子球再生率の低下などが指摘されている(大垣, 1982)。しかしPriyadarshi・Sen (1992)はテッポウユリのおりん片を2,4-D 4.5  $\mu$ molとBA 1.1  $\mu$ molを含む培地でカルスを誘導して3年間継代培養した結果、その染色体は正常であったと報告している。またSimmonds・Cumming (1976)は数種のユリをBA 5.0  $\mu$ molと2,4-D 5.0  $\mu$ molを添加した培地でカルスを誘導し、乾物1.0gのカルスから1年間に $6 \times 10^{12}$ 個の子球を再生できると報告した。

筆者らはササユリの大量増殖について、りん片から直接子球を形成する方法よりもカルス経由による方法が有利と考えた。ササユリのカルス形成に関する報告は少なく、Shoyamaら(1987)はササユリをりん片培養した結果、2,4-D 0.5ppmを含む培地からカルスを誘導

Table 4. Effects of NAA and BA on the growth of callus on explant.

Plant hormone		Size and callus number per explant		
NAA (ppm)	BA (ppm)	1.0	1.1~3.0	3.1~5.0 (mm)
0	0	2	0	0
0.1	0.1	3	0	0
	1.0	2	1	0
	10.0	0	1	1
1.0	0.1	5	1	1
	1.0	0	3	2
	10.0	0	1	5
10.0	0.1	2	0	0
	1.0	4	2	3
	10.0	0	0	1

し、また市川(1993)は植物ホルモン無添加培地でもカルスが形成されることを報告した。しかしこれらの報告を追試したが再現性を欠き、また植物ホルモンの種類やその濃度の点でも不明であった。

そこで本実験では2,4-DとKinetinおよびNAAとBAの組み合わせが母球のりん片からのカルス誘導に及ぼす影響を調べた結果、2,4-D 1.0ppmとKinetin 1.0ppm区で誘導率が最も高く、1.1~3.0mmの小型カルスが形成された。

一方2,4-D 10.0ppmの高濃度において、カルス誘導率は低下したが、直径3.1~5.0mmの比較的大きなカルスが形成された(Table 2)。従ってりん片を外殖体とした場合、2,4-D 1.0~10.0ppmとKinetin 0.1~1.0ppm, NAA 10.0ppmとBA 1.0ppmの組み合わせがカルス誘導に有効であることが判明した(Table 4)。このことについてNovak・Petru (1981)は種間雑種Crimson Beautyのりん片培養でNAA 5と10  $\mu$ mol, BAP 5と10  $\mu$ molを組み合わせた高濃度の植物ホルモン培地で子球形成は抑制されるが、カルスの生長は促進されたと報告している。本実験でも2,4-DやNAAを10.0ppmの高濃度培地で培養した場合、カルス誘導率は低下したが、誘導されたカルスは生長することが判明した。

以上のことから、ササユリの母球のりん片培養によるカルス誘導には高濃度のオーキシンが良好であり、サイトカニンはその作用を補っているものと考えられた。

### 摘要

ササユリの母球のりん片を供して、植物ホルモンの種類とその濃度がカルス誘導に及ぼす影響を研究した。植物ホルモン処理は2,4-D と kinetin およびNAA とBA をそれぞれ組合わせた9処理区に無添加区(対照)を加えた10区とした。培養は温度25°C,  $40\mu\text{mol m}^{-2}\text{sec}^{-1}$ の光条件で行った。カルスの誘導率は2,4-D 1.0 ppmとKinetin 1.0ppm区で43.8%と最も高い値を示した。また2,4-D 10.0ppmとKinetin 1.0 ppm区ではカルスの生長が良好で、その大きさは直径3.1~5.0mmであった。一方NAA 10.0 ppmとBA 1.0ppm区ではカルス誘導率が56.3%と最も高い値であった。

以上のことから、2,4-D 0.1~1.0ppmとKinetin 0.1~1.0ppm, NAA 1.0~10.0ppmとBA 1.0ppmの組合わせがササユリのカルスの誘導に有効と考えられた。

### 引用文献

- 市川 健：1993. 長期間無継代培養によるササユリ (*Lilium japonicum* Thunb.) りん茎の増殖. 静岡県農業試験場研究報告. 37: 103-111.
- 水口 茂・池川哲郎・大川勝徳：1992. ササユリのりん片培養による増殖に関する研究. (第6報)りん片の切断や植物ホルモン処理が子球形成に及ぼす影響. 園学雑. 61 (別1): 442-443.
- 水口 茂・大川勝徳・池川哲郎：1994. ササユリの母りん片由来白色カルス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.
- 水口 茂・山下恵理子・大川勝徳：1995. 自生ササユリ球根の発育とりん片培養による子球形成との関係. 園学雑. 64: 605-610.
- Murashige, T. and F. Skoog: 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Novak, F. J. and E V A Petru: 1981. Tissue culture propagation of *Lilium* hybrids. *Scientia Horticulturae.* 14: 191-199.
- 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. Edu. Kanazawa Univ. Natl. Sci.* 43: 25-28.
- 大垣晃一, 1982. ミヤマスカシユリの再分化. 園学雑. 50: 497-502.
- Priyadarshi, S. and S. Sen: 1992. A revised scheme for mass propagation of Easter Lily. *Plant Cell, Tissue Organ Cult.* 30: 193-197.
- Shoyama, Y., N. Hasegawa, and I. Nishioka: 1987. In vitro propagation of *Lilium japonicum* by culture of bulblets. *Shoyakugaku Zasshi* 41: 352-355.
- Simmonds, J. A. and B. G. Cumming: 1976. Propagation of *Lilium* Hybrids. II. Production of plantlets from bulb-scale callus culture for increased propagation rates. *Scientia Hort.* 5: 161-170.