

フリージア培養小植物体からの球茎形成

平田 毅*・今西英雄・土井元章

大阪府立大学農学部

(〒593 堺市学園町1番1号)

* 現 三共株式会社農業科学研究所

(〒520-23 滋賀県野洲郡野洲町野洲 1041)

(1994年3月26日受付)

(1994年10月8日受理)

フリージア (*Freesia hybrida*) ‘コート・ダ・ジュール’の苗条原基由来の培養小植物を用いて, *in vitro*での球茎形成条件を検討した。生長調節物質無添加の培地に植え付けた小植物体における球茎形成の誘導には低温処理が必要であり, 15°Cで15週間の低温処理を施し, その後23°Cに移すと, シュートあたり1球の割合で球茎が形成された。その際, 培地中のショ糖濃度を高めることにより, 球茎の肥大が促された。球茎の形成には低温処理開始以降の光条件は関係なく, 球重は小さくなったものの暗黒下でも球茎が形成された。得られた球茎は休眠状態にあり, 高温処理により休眠を打破して植え付けたところ, 0.1g以下の極小球でも高率で発芽した。この方法で球茎を増殖する場合, 実験結果から見積ると, 苗条原基1gから始めて, 1年間に160球程度の球茎が得られるものと試算された。

1. 緒言

わが国では切花として年間900万本程度が生産されているフリージア (*Freesia hybrida*, アヤメ科)の球茎増殖は, 一般に茎の基部節間が肥大した切り下球と呼ばれる球茎とその球茎の基部の節に形成される木子と呼ばれる小球茎を分球することによって行なわれている。

しかし, この栄養繁殖方法では, 増殖率が年間数倍程度と低く, 球茎生産地の減少ともあいまって, 近い将来球茎の供給不足が懸念される。一方, 高冷地栽培, 地中冷却栽培などを組み入れた新しい作型の開発により, 切花生産における作期の拡大が期待されている。そのためには, 高品質の球茎を必要な時期に必要な量だけ供給することが, ますます重要になってくる。

以上のような観点から, 我々は組織培養を利用したフリージアの大量増殖に関する研究を開始し, これまで, 茎頂由来の苗条原基を液体振とう培養して増殖することにより, 効率的に培養増殖苗を得ることができていることを明らかにした。また, この苗を用いて球茎養成栽培を行うと球茎の他に数個の木子が収穫され, 1gの苗条原基

から1年で500球程度の球茎および木子が得られることを示した¹⁾。しかし, この方法では, 球茎養成を *ex vitro*で行う関係上, 球茎の収穫時期が春から初夏に限られ, とりわけ晩冬に植え付ける抑制栽培用の球茎を供給することが困難である。

そこで, *in vitro*下で培養小植物体に直接球茎を形成させることができれば, 年間を通じて安定した無病球茎の供給ができるのではないかと考え, 茎頂培養由来の苗条原基から得た小植物体の *in vitro*での球茎形成の諸条件を検討した。

2. 材料および方法

(1) 培養方法

実験を通じて, 培地には標準濃度の NH_4NO_3 を1/10強度にまで減じたMS培地を用いた。寒天培地の場合寒天濃度0.8%, また特に断わらない限りショ糖を2%添加した。培養容器としては, 茎頂培養(初代培養)の場合を除き, 100mlのエrlenマイヤーフラスコを用い, 30mlの培地を入れ, アルミホイル栓により封じた。

培養は, 明期の光強度 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$, 低温処

理の期間を除き温度 23°C として行った。

(2) 植物材料

‘コート・ダ・ジュール’を供試した。

苗条原基の誘導、増殖は Doi ら (1992) に述べた方法に準じて行った³⁾。ただし本実験では、植物材料を無病化するために、はじめに、休眠打破した球茎から発芽した栄養生長段階のシュートから茎頂を切り出し、NAA 1 mg/l, BA 1 mg/l を含む寒天培地に外植して、そこで形成された苗条原基を液体培地に移して増殖した。

苗条原基は、BA 1 mg/l を添加した液体培地を用いて、23°C、暗黒下で振とう培養することで増殖させ、月 1 度の継代を重ねて維持した。苗条原基からシュートを形成させる際には、苗条原基を BA 1 mg/l を含む寒天培地に継代し、2 ヶ月間、23°C 16 時間日長下で培養した。形成されたシュートは、大きさを揃えたうえで生長調節物質無添加の培地 30 ml を入れた 100 ml フラスコあたり 5 本を継代して、約 1 ヶ月後にシュート長 6~8 cm に達した段階で、1 区 3~4 フラスコとして種々の処理を開始した。

(3) 低温処理による球茎形成の誘導

上述の生長調節物質無添加の寒天培地で培養している小植物体に対して、15°C、連続照明下で 10 週あるいは 15 週間の低温処理を行い、その後 23°C、連続照明下に移して 5 週間培養した。対照区としては、23°C で 20 週間培養する区を設けた。

培養終了時点で、形成された球茎を小植物体ごと培養器外に取り出し、水洗いして寒天を洗い流した後、2 週間室内で風乾し、葉と根を除き、球茎部の新鮮重を測定した。

(4) 培地中のショ糖濃度が球茎の肥大に及ぼす影響

ショ糖濃度を 0, 2, 5, 8, 11% と変えた生長調節物質無添加の寒天培地に継代した小植物体に対して、15°C、連続照明下で 15 週間の低温処理を行った。その後、23°C、連続照明下に移して 5 週間培養後、上述の方法で球茎の新鮮重を測定した。

(5) 光照射の有無が球茎の肥大に及ぼす影響

ショ糖濃度 8%、生長調節物質無添加の寒天培地に継代した小植物体に対して、15°C で 15 週間の低温処理を施し、その後 23°C に移して 5 週間培養した。低温処理開始以降の光条件を、連続照明とする区と、暗黒とする区を設けた。

3. 結果

(1) 低温処理による球茎形成の誘導

10 週、15 週間処理区とも、低温処理後 23°C に移すと葉が徐々に枯れ始め、培養終了時には完全に枯れ込ん

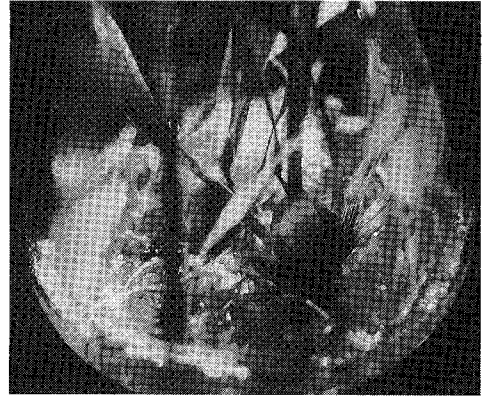


Fig. 1 Corms formed in the basal portion of the shoots.

Photograph was taken after exposing plantlets to 15°C for 15 weeks and then 23°C for 5 weeks.

Table 1. Effects of chilling durations on *in vitro* corm formation from freesia plantlets.

Duration of chilling at 15°C (weeks)	Corm formation (%)	Corm fresh weight (g)
0	0	—
10	58	0.20 ± 0.07*
15	100	0.31 ± 0.04

After exposing plantlets to chilling under continuous light, they were cultured at 23°C for 5 weeks. the control plantlets (0 weeks) were kept at 23°C for 20 weeks. Phytohormone free MS agar medium with 1/10 strength NH_4NO_3 and 2% sucrose was used.

* Standard error.

だ状態となった。球茎の形成は 23°C で培養し続けた対照区では全くみられず、10 週処理区では 23°C に移してから一部の個体で、15 週処理区では低温処理開始 12 週目頃より全個体でシュート基部が肥大し始め、23°C での培養終了時点では球茎の肥大が完了していた (Fig. 1)。球茎形成率は、10 週間処理区で 58%、15 週間処理区で 100% となった (Table 1)。また、形成された球茎の新鮮重も、15 週間処理区で重くなった。なお、球茎は培養小植物体 1 本あたり 1 球の割合でしか形成されず、木子の形成はみられなかった。

(2) 培地中のショ糖濃度が球茎の肥大に及ぼす影響

低温処理開始 10 週目の観察では、ショ糖 11% 添加区においてシュート基部が肥大した個体の割合が最も高く、すでに 80% の個体が球茎形成を開始していた。低温処理終了時点では、ショ糖無添加区以外で、ほとんどの個体が球茎形成を開始しており、さらに 23°C に移して培養するといずれの実験区とも全個体で球茎が形成さ

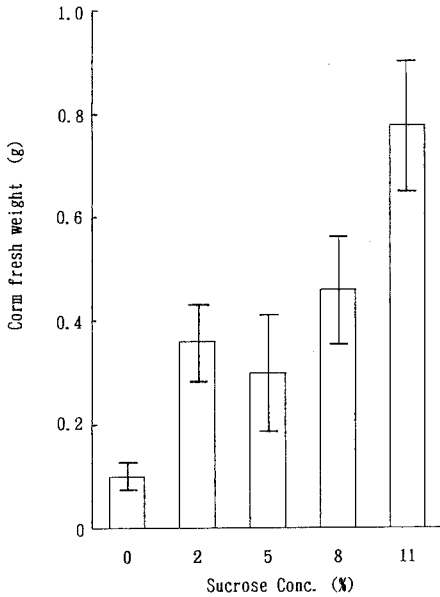


Fig. 2 Effects of sucrose concentration on growth of freesia corms induced by chilling.

Sucrose was added to phyto hormone free MS agar medium with 1/10 strength NH_4NO_3 . Bars indicate the standard error.

Table 2. Effects of light during chilling period on formation and growth of freesia corms.

Light during chilling period	Corm formation (%)	Corm fresh weight (g)
No	93	0.52 ± 0.06*
Yes	100	0.82 ± 0.07

After exposing plantlets to chilling at 15°C for 15 weeks in the dark or continuous light, they were cultured at 23°C for 5 weeks under same lighting conditions. Phytohormone free MS agar medium with 1/10 strength NH_4NO_3 and 8% sucrose was used.

* Standard error.

れた。得られた球茎の新鮮重は、シヨ糖無添加区では平均 0.1 g と小さかったが、シヨ糖濃度を高めると球重が増加する傾向にあり、特にシヨ糖 11% 添加区では平均 0.8 g とシヨ糖 2% 添加区に比べて約 2 倍の重さの球茎が得られた (Fig. 2)。

(3) 光照射の有無が球茎の肥大に及ぼす影響

暗黒下で低温処理を開始した区では、しだいに葉が黄化して、シュートが徒長した。いずれの実験区とも球茎はほぼ全個体で形成されたものの、得られた球茎の新鮮重は、連続照明下で培養した方が大きくなった (Table 2)。

4. 考 察

組織培養によるフリージアの大量増殖に関しては、これまでいくつかの報告がなされており、外植体として球茎、茎、葉、小花柄、花芽およびやくを用いて誘導されたカルスから小植物体を再生させる方法²⁻⁵⁾、花芽から不定芽形成を誘導し、そこから小植物体を形成させる方法などがある^{6,7)}。しかし、カルスを経由する方法では後の栽培で遺伝的変異が問題となるであろうし、外植体から直接小植物体を再生させる方法では増殖効率が必要もある。

これまで、球根植物においては、*in vitro* でりん茎や塊茎などの貯蔵器官を形成させる試みが多くなされているが、フリージアでは *in vitro* で球茎を形成させたという報告はない。同じアヤメ科の球根植物であるグラジオラスでは、小植物体を液体培養することにより、球茎が容易に形成されるが⁹⁾、この方法にならってフリージアで同様の予備実験を行ったところ、球茎はまったく形成されなかった。

フリージアの球茎では、高温で休眠が打破されると球茎上の芽が低温下でも発芽するようになるが、休眠打破が不完全な状態で低温へ移すと、球茎上に直接新球が形成される⁹⁾。また、発芽した直後の苗を 5°C で約 10 週間低温処理した後、18~20°C で栽培すると、早い段階で比較的大きな球茎が形成されることが報告されている¹⁰⁾。*in vitro* の条件下でも、培養小植物体が球茎を形成するには低温が必要であり、15°C で 15 週間程度の低温処理を行えば、確実に球茎形成を誘導できることが本実験で明らかとなった。また、その後の実験で低温処理期間は 12 週間程度にまで短縮できることが分かった。ただし球茎は、1 シュートあたり 1 球が得られるのみであり、木子が形成されることはなかった。なお、得られた球茎は休眠状態にあり、25~30°C での高温処理を 8~10 週間行うことにより休眠が打破され、0.1 g 以下の極小球でも発芽させることができた(データ省略)。

フリージアの球茎形成には 2 つの温度感応相があり、まず球茎形成誘導のため 10°C 前後での低温感応相が、続いて 20°C 前後の温度条件下で光合成産物が葉から茎へ集積する球茎肥大相が必要であるとされている¹¹⁾。本実験の結果は、この説を支持するものであった。事実、低温処理後 23°C 条件下に移すと、葉が徐々に枯れ込み球茎の肥大が急速に促された。

培地に添加した高濃度のシヨ糖は、培養植物に対し水ストレスを与えることと、それが根から取り込まれ炭素

源となるという2つの働きをもっている。フリージアにおいては、培地中のシヨ糖濃度を高めることは、球茎形成の誘導よりもむしろその後の肥大に効果があるようであった。したがって、23°C一定の条件で培地中のシヨ糖濃度を高めて培養しても、球茎形成を高率で誘導することはできなかった。この点、高濃度シヨ糖による水ストレスが引き金となって球形成が容易に誘導されるグラジオラスやジャガイモの場合とは傾向を異にしている。しかし、球茎の肥大に高濃度のシヨ糖が有効であった点は、グラジオラス¹²⁾、ジャガイモ^{13,14)}、ヤマノイモ¹⁵⁻¹⁷⁾などでの実験結果と同様であった。

供試する小植物体の大きさにより、球茎の肥大に影響がみられるかどうかは明確ではないが、低温処理時の光条件を変えた実験に用いた培養植物が他の実験に比べてやや大きく、この場合比較的大きな球茎が得られていることから、大きな球茎を得るためには、培地中の糖濃度を高めるとともに、低温処理開始時の植物体を大きくすればよいことが推察される。しかし、実際の栽培では、0.2g程度の球茎でも、植え付けた後花成誘導に必要な低温を与えるまでに十分な栄養生長期を設けることで、品質のよい切花を得ることができると、培養効率を高める意味で低温処理までの継代回数を減らし、培養期間を短縮する必要があることなどから、苗条原基塊を直接生長調節物質無添加の培地に植え付けてシュートを形成させた後、継代せずに低温処理を開始する方が多数の球茎を効率的に得ることができると考えられる。

また、低温処理以降の培養条件を暗黒としても、形成される球茎は小さくなるものの、ほぼ全個体で球茎が形成されたことから、光条件は球茎形成の誘導には関係していないことがうかがわれる。また、培養期間の一部を暗黒で行うことは、培養コストの軽減に有効であろう。

一方、生長調節物質であるGA₃がサトイモの *in vitro* での塊茎形成に有効であるという報告がある¹⁸⁾。その一方で、グラジオラスにおいては、ジベレリンの合成阻剤であるパクロブトラゾールが *in vitro* での球茎形成を促すことが報告されており¹²⁾、フリージアに対してもGA₃とパクロブトラゾールの類縁化合物であるウニコナゾールの球茎形成に対する効果を検討したが、必ずしも十分な球茎形成率が得られなかった(データ省略)。

いま、1gの苗条原基からスタートして、シュートを形成させた後、*in vitro* で球茎形成を誘導して球茎を得る増殖法を考え、これまでの実験結果をもとに増殖効率を試算すると、4ヵ月の苗条原基の増殖で16倍、そこ

から3ヵ月の培養でシュートが苗条原基1gから10本、これを4ヵ月15°Cの低温にあて球茎を誘導してから23°Cで1ヵ月培養し球茎の肥大を促してシュート1本につき1球の球茎を収穫するとして、1年後に約160球の球茎が得られることとなる。この増殖率は組織培養による増殖率としては必ずしも高いものではないが、実際の球根養成栽培での分球による増殖では年間せいぜい数倍程度の増殖率しか得られないことを考えると、無病球を必要な時期に安定して供給できるという点で、球茎の長期貯蔵が必要である抑制栽培や球根養成を兼ねて切花生産を行う作型への球茎供給の一方法として実用化が可能であると考えられる。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、研究経費等で格別のご援助を賜った三洋電機株式会社ならびに三洋電機特機株式会社 M・L・C 事業部各位に深謝の意を表す。

文 献

- 1) Doi, M., S. Hamatani, T. Hirata, H. Imanishi, T. Hisamoto, 1992. Acta Hort., **319**: 249-254.
- 2) Bajaj, Y. P. S., R. L. M. Pierik, 1974. Neth. J. Agric. Sci., **22**: 153-159.
- 3) Hussey, G., 1975. J. Exp. Bot., **26**: 253-262.
- 4) 森 泰, 長谷川嬉, 狩野邦雄, 1975. 園学雑, **44**: p. 294-302.
- 5) Stimart, D. P., P. D. Ascher, 1982. Scientia Hort., **17**: 153-157.
- 6) Pierik, R. L. M., H. H. M. Steegmans, 1975. Neth. J. Agric. Sci., **23**: 334-337.
- 7) Pierik, R. L. M., H. H. M. Steegmans, 1976. Neth. J. Agric. Sci., **24**: 274-277.
- 8) Steiaitz, B., H. Lilien-Kipnis, 1989. J. Plant Physiol., **135**: 495-500.
- 9) 阿部定夫, 川田譲一, 歌田明子, 1964. 園試報, **A 3**: p. 251-317.
- 10) 青葉 高, 1970. 園学雑, **39**: p. 369-374.
- 11) 青葉 高, 1972. 園学雑, **41**: p. 290-296.
- 12) Steiaitz, B., A. Cohen, Z. Goldberg, M. Kochba, 1991. Plant Cell, Tissue, Organ Culture, **26**: 63-71.
- 13) Mes, M. G., I. Menge, 1954. Physiol. Plant., **7**: 637-649.
- 14) Palmer, C. E., O. E. Smith, 1970. Plant Cell Physiol., **11**: 303-314.
- 15) Forsyth, C., J. Van Standen, 1984. Plant Physiol., **115**: 79-83.
- 16) Sengupta, J., G. C. Mitra, A. K. Sharma, 1984. Plant Cell, Tissue, Organ Culture, **3**: 325-331.
- 17) Ng, S. Y. C., 1988. Plant Cell, Tissue, Organ Culture, **14**: 121-128.
- 18) 菓子野利浩, 長田龍太郎, 轟 篤, 1992. 園学雑, **61** 別1: p. 228-229.

Summary

In Vitro Corm Formation of Freesia Plantlets

Tsuyoshi HIRATA*, Hideo IMANISHI and Motoaki DOI

College of Agriculture, University of Osaka Prefecture, Sakai, Osaka 593, Japan

* Present address: *Agrochemicals Research Laboratories, Sankyo Company Ltd.,
1041 Yasu Yasu-cho, Shiga 520-23, Japan*

Factors affecting *in vitro* corm formation of freesia 'Cote d'Azur' were investigated using plantlets regenerated from shoot primordia. A corm was formed from each shoot by exposing plantlets to chilling at 15°C for 15 weeks followed by 23°C for 5 weeks. Modified MS agar medium containing high concentrations of sucrose facilitated the corm growth. Corms were harvested even under the dark condition, although the corm fresh weight was less than under the light condition. The corms obtained were in the dormant state requiring high temperatures to breaking dormancy. The corms including those less than 0.1 g had the potential to sprout when planted after exposure to high temperature of 25-30°C. It was estimated that about 160 corms could be obtained per year from a 1 g shoot primordia through this micropropagation system.