

ニホンスイセンの茎頂組織からの苗条原基誘導

永井輝行*・大澤勝次**

* 福井県園芸試験場

(〒919-11 福井県三方郡美浜町久々子 35-32-1)

** 農業生物資源研究所

(〒305 茨城県つくば市観音台 2-1-2)

(1995年6月10日受付)

(1996年2月15日受理)

ニホンスイセンの苗条原基誘導を目的として、温度 25°C、照度 3000 lux の連続照明下で傾斜回転培養(2~4 rpm)を行い、植物ホルモンが茎頂組織の生育に及ぼす影響をみるとともに、長期培養による苗条原基の誘導を試みた。

培養 7 週間では、B5 液体培地、MS 液体培地において、ともに NAA 無添加区と NAA 0.02 mg/l 区で茎頂組織が生長し、NAA 0.2 mg/l 区で茎頂組織が肥大した。BAP の 0.02~0.2 mg/l 添加は NAA の作用を促進した。NAA 2 mg/l 以上では柔組織の増殖がみられた。オーキシンとして 2,4-D を用いると NAA に比べて柔組織の増殖が促進され、サイトカイニンとして 4PU を用いると BAP に比べて茎頂組織の生長が促進され、いずれも苗条原基誘導に不適当と考えられた。NAA 0.2 mg/l + BAP 0.2~2 mg/l を添加した MS 液体培地で培養開始 183 日目に苗条原基様の集塊が得られ、この苗条原基から完全な植物体が誘導された。

1. 緒言

スイセン(*Narcissus*)は、ヨーロッパ、地中海沿岸地方原産の球根植物で、数多くの園芸品種がイギリス、オランダ、アメリカなど世界各地で栽培されている。房咲きスイセンに分類されるニホンスイセン(*Narcissus tazetta* L. var. *chinensis* ROEM.)は、日本自生の早咲き性スイセンで、中国に栽培されているスイセンと同種とされており¹⁾、芳香に富み、清楚な草姿から、切り花としての利用が多い。

一般にスイセンの増殖は、自然分球や 2 りん片挿しなどの栄養繁殖によって行われているが、増殖率が低く、組織培養の利用が望まれていた。これまでに、りん片培養^{2,4)}、花茎培養^{2,3)}、カルス培養^{2,5)}などが検討されてきたが、増殖率や変異抑制の点で実用的な方法は開発されていない。

近年、染色体変異を伴わない安定した大量増殖法の一つとして苗条原基を用いた培養が試みられている^{6,7)}。これまで 52 種の植物について苗条原基の成功例⁸⁾が報告さ

れている。球根植物ではユリ⁹⁾やニンニク¹⁰⁾などで可能になっているが、ニホンスイセンでの成功例はない。また、ニホンスイセンは、不稔性¹³⁾であるため、交雑育種が困難で、品種改良が遅れているが、苗条原基を利用した人為四倍体の作出¹¹⁾や形質転換¹²⁾などがスイセンにも応用できれば、品種改良が大きく前進することになると考えられる。

そこで、本報ではニホンスイセンの茎頂を用いて、苗条原基を誘導するために必要な植物ホルモンの影響と長期間培養の効果を明らかにしたので報告する。

2. 材料および方法

(1) 供試材料、培養条件

5 月に掘り上げたニホンスイセンの球根を室内に貯蔵して供試材料とした。

球根は水洗後、塩化ベンザルコニウム 100 倍液又は中性洗剤 500 倍液に 10~30 分間浸漬した。その後りん片を除去し、底盤部に中心球を付けた状態に調整し、99% エタノールで 10~30 秒間、アンチホルミン(有効塩素

5%)3倍液で15分間殺菌し、滅菌水で3回洗浄した。

外植体として、葉原基1~2枚を有する約0.7mmの莖頂組織を摘出し、液体培地10mlを入れた径21mm又は25mmの平底試験管に置床し、小型の傾斜回転培養器を用いて毎分2~4回転で回転培養した。培養温度は25°C、光条件は蛍光灯による上部約3000luxの連続照明とした。

(2) 初代培養における生育

培地は、B5液体培地に種々の濃度のNAAとBAPを組み合わせて添加した25種類と、MS液体培地にNAAとBAPを組み合わせて添加した16種類(Table 1)、2,4-DとBAPを組み合わせた16種類(Table 2)およびNAAと4PUを組み合わせた12種類(Table 3)を用いた。

いずれの培地もショ糖2%を添加し、pH5.7とした。培養期間は7週間とした。一部の個体を、マイクロライザー(DSK社)で厚さ80~100 μ mの切片に切断してプレパラートとし、経時的に回転培養中の組織の変化を観察した。

(3) 長期培養による苗条原基の誘導

種々の濃度のNAAとBAPを組み合わせた計8種類(Table 4)のMS液体培地(ショ糖3%, pH5.7)に莖頂組織を置床し、183日間回転培養を行い、苗条原基の誘導を図った。培地の交換は1回目を57日目に行い、以後培養組織の生長に応じて22~39日ごとに行った。その際、培養組織が試験管の内壁に固定されないように、伸長した葉の切除や分割を行った。

3. 結果および考察

(1) 初代培養における生育

莖頂組織(Fig. 1-1)の生育は、1.「莖頂組織の成長」(Fig. 1-2)、2.「莖頂組織の肥大」(Fig. 1-3 C)、3.「柔組織の増殖」(Fig. 1-3 D)の3種類に大別できた。「莖頂組織の成長」は、葉の伸長と莖頂組織での新たな葉原基の分化によって特徴づけられ、「莖頂組織の肥大」は、葉の伸長抑制と葉原基あるいは莖頂組織の肥厚で特徴づけられた。また、「柔組織の増殖」は、莖頂組織の切り口から形成されることが多かった。

培養7週では苗条原基の形成は認められなかった。苗条原基の誘導に要する期間は植物によって大きく異なり、下西ら¹⁴⁾が行ったメロンの苗条原基誘導では培養6日目に腋芽原基の増加が認められ、苗条原基の誘導がかなり早期に開始されることを報告している。しかし、アサツキ¹⁵⁾では数カ月間の継代培養が必要であり、またカラデウム¹⁶⁾においても初代培養では苗条原基の誘導が行われなかったことが報告されている。スイセンでも初代培

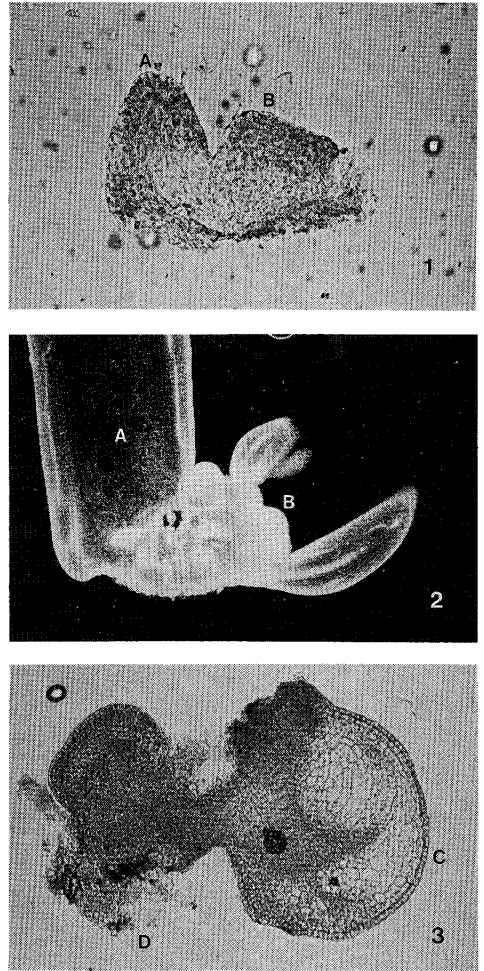


Fig. 1 Histological characteristics of cultured shoot apices of *Narcissus*.

- (1) A shoot apex used for explant.
- (2) A shoot apex showing the growth. Elongation of leaf and differentiation of leaf primordia were observed. A shoot apex was cultured for 82 days on MS medium with 4 mg/l BAP.
- (3) Enlargement of leaf primordia and shoot apex with proliferation of parenchymatous tissue at the cut end. A shoot apex was cultured for 31 days on MS medium with 2 mg/l NAA+2 mg/l BAP.

A: leaf primordia or leaf, B: apical meristem, C: enlargement of shoot apex, D: proliferation of parenchymatous tissue.

養で苗条原基の誘導が行われず、継代培養が不可欠であった。

莖頂組織の生育に及ぼすNAAとBAP添加濃度の影

Table 1. Effects of NAA and BAP concentrations on growth response of shoot apex explants in primary culture.

Basal Medium	NAA Conc. (mg/l)	BAP Conc. (mg/l)				
		0	0.02	0.2	2	4
B5	0	G ^{*15/5*2}	G4/4	G3/3	G6/6	G5/5
	0.02	G6/6	G6/6	G4/4	G4/4	G4/4
	0.2	G2/4	G2/4	E4/4	E4/4	E3/4
		E2/4	E4/4	P1/4		P1/4
		P1/4				
	2	E2/5	E1/5	P3/3	E2/4	E1/5
P3/5		P4/5		P2/4	P4/5	
4	E4/5	P5/5	E2/5	E3/4	P5/5	
	P3/5		P5/5	P2/4		
MS	0	G4/4	— ^{*3}	G4/4	G3/3 E1/3	G4/4
	0.02	G4/4	—	G3/3	G4/4	G4/4
					E2/4	E1/4
	0.2	G2/4 E4/4	—	E4/4 P1/4	E4/4	E4/4
					P2/4	
	2	E4/4 P4/4	—	E4/4 P4/4	P4/4	E1/3
P2/3						

*1 Growth response was observed 48 and 47 days after initiation of the culture on 25 June for B5 medium and on 9 June for MS medium, respectively.

G: Growing of shoot apex,

E: Enlargement of leaf primordia and shoot apex,

P: Proliferation of parenchymatous tissue.

*2 Number of responded explants / number of examined explants.

*3 —: Not examined.

響を **Table 1** に示した。B5 培地を基本培地として用いた場合についてみると、「茎頂組織の成長」は、NAA 無添加区あるいは NAA 0.02 mg/l の低濃度添加区で多く認められ、BAP を同時に 0.02~0.2 mg/l の低濃度で添加することによって葉の伸長が促された。また、「茎頂組織の成長」は、NAA 濃度が高くなるに従って明らかに抑制された。「茎頂組織の肥大」は、NAA 0.2 mg/l において最も高い頻度で観察され、0.02~2 mg/l の BAP の添加がこれを促した。「柔組織の増殖」は 2 mg/l 以上の高濃度の NAA によって促された。この NAA と BAP 添加の影響は、MS 培地でもほぼ同じように認められた。

オーキシンとして、2,4-D と NAA の結果を比較すると、「茎頂組織の成長」は、オーキシンの種類による差がなく、いずれもオーキシン無添加区と 0.02 mg/l 区で認められた (**Table 2**)。しかし、「茎頂組織の肥大」は、2,4-D では 0.02 mg/l で多くなり、NAA に比べて低い濃度域で肥大が促された。「柔組織の増殖」についてみ

ると、2,4-D を用いた場合は BAP 濃度に関わらず 0.2 mg/l 以上添加した区で認められ、2,4-D の「柔組織の増殖」を促進する作用は NAA より強かった。

サイトカインとして、4PU を用いた場合には「茎頂組織の成長」が強く促され、「茎頂組織の肥大」及び「柔組織の増殖」が抑えられた (**Table 3**)。

以上のように、2,4-D は NAA に比べて茎頂組織の生育に抑制的に作用し、柔組織の増殖を促進し、4PU は BAP に比べて葉の伸長が旺盛となった。田中⁶⁾は茎頂組織から不定苗条に移る途中で苗条原基が存在するとしているので、柔組織の増殖や葉の伸長が促進される 2,4-D や 4PU はニホンスイセンの苗条原基誘導に不適当と考えられた。

(2) 長期培養による苗条原基の誘導

ニホンスイセンの茎頂は回転培養中の生育が遅く、苗条原基を誘導するには、長期間培養を継続する必要があった。

メロンでは初代培養で葉原基の伸長した個体からこぶ

Table 2. Effects of 2, 4-D and BAP concentrations*¹ on growth response of shoot apex explants in primary culture.

2, 4-D Conc. (mg/l)	BAP Conc. (mg/l)			
	0	0.2	2	4
0	G* ² 4/4* ³	G3/3	G3/3 E1/3	G2/4 E2/4
0.02	G4/4	G4/4 E4/4	G4/4 E4/4	G1/4 E4/4
0.2	E4/4 P4/4	E2/2	E3/4 P4/4	E2/4 P3/4
2	P2/2	P4/4	E1/4 P4/4	E1/3 P3/3

*¹ MS medium was used as a basal medium.

*² Growth response was observed 48 days after initiation of culture on 25 May.

G: Growing of shoot apex,

E: Enlargement of leaf primordia and shoot apex,

P: Proliferation of parenchymatous tissue.

*³ Number of responded explants / number of examined explants.

Table 3. Effects of NAA and 4 PU concentrations*¹ on growth response of shoot apex explants in primary culture.

NAA Conc. (mg/l)	4 PU Conc. (mg/l)		
	0.2	2	4
0	G* ² 4/4* ³	G4/4	G4/4
0.02	G4/4	G4/4	G4/4
0.2	G2/2	G4/4 E1/4	E3/3
2	G1/4 E3/4 P2/4	E4/4 P4/4	E4/4

*¹ MS medium was used as a basal medium.

*² Growth response was observed 48 days after initiation of culture on 7 September.

G: Growing of shoot apex,

E: Enlargement of leaf primordia and shoot apex,

P: Proliferation of parenchymatous tissue.

*³ Number of responded explants / number of examined explants.

状組織を選抜して培養し、苗条原基を誘導している¹⁴⁾。スイセンの初代培養において NAA 無添加又は NAA 0.02 mg/l を含む培地では茎頂組織が成長し (Fig. 1-2), こぶ状組織は分化しなかった。そこで継代培養時に、伸

Table 4. Effects of long term subculture*¹ (157 days) on induction of shoot primordia.

NAA Conc. (mg/l)	BAP Conc. (mg/l)	
	0.2	2.0
0	G* ² 4/4* ³	G4/4
0.02	G4/4	G5/5
0.2	E4/4	E+SP 3/5 E2/5
2.0	P5/5	P5/5

*¹ Culture was started on 17 May and the media were replaced by fresh ones after 57 days of culture, followed by repeated renewal of the media with 22-39 day-intervals.

*² Growth response of shoot apex explants.

G: Growing of shoot apex,

E: Enlargement of leaf primordia and shoot apex,

SP: Shoot primordia,

P: Proliferation of parenchymatous tissue.

*³ Number of responded explants / number of examined explants.

長した葉を切除して培養を継続したが、苗条原基は誘導できなかった。

NAA 0.2 mg/l 又は 2 mg/l を含む培地では、培養初期に葉の伸長が抑制され、白色又は一部緑色の表皮を持つ組織と増殖した柔組織になり、急激な生育がないまま少しずつ肥大した。NAA 2 mg/l を含む培地では、長期の培養によって柔組織の増殖が進み、表面の組織が分離して、培地中に浮遊し、139 日目の調査以降培地がにごるようになった。

NAA 0.2 mg/l + BAP 2 mg/l 添加区で茎頂組織の肥大した部位を長期間培養した結果、苗条原基様の組織が観察され、培養開始 183 日目にその部分から苗条原基様の集塊が得られた (Table 4)。その個体は 56 日目の調査時から表面に凹凸のある部分が認められ、114 日目の調査時にはその部分の発育がみられ、161 日目には Fig. 2-1A のように発達していた。苗条原基の発生部位は、葉又はりん片の底盤部に近い部分で、2りん片の培養による増殖において不定芽の発生する部位¹⁾にあたると思われた。

培養 183 日目には NAA 0.2 mg/l + BAP 0.2 mg/l 添加区においても苗条原基様の集塊が得られた。しかし、早くから苗条原基様組織が認められた NAA 0.2 mg/l + BAP 2 mg/l 添加区での苗条原基様集塊のほうが発育がよく、その形成量も多かった。

球根類の苗条原基はメロンのような 1 年性植物に比べて、誘導に長期間を必要とし、誘導期間の比較的短かつ

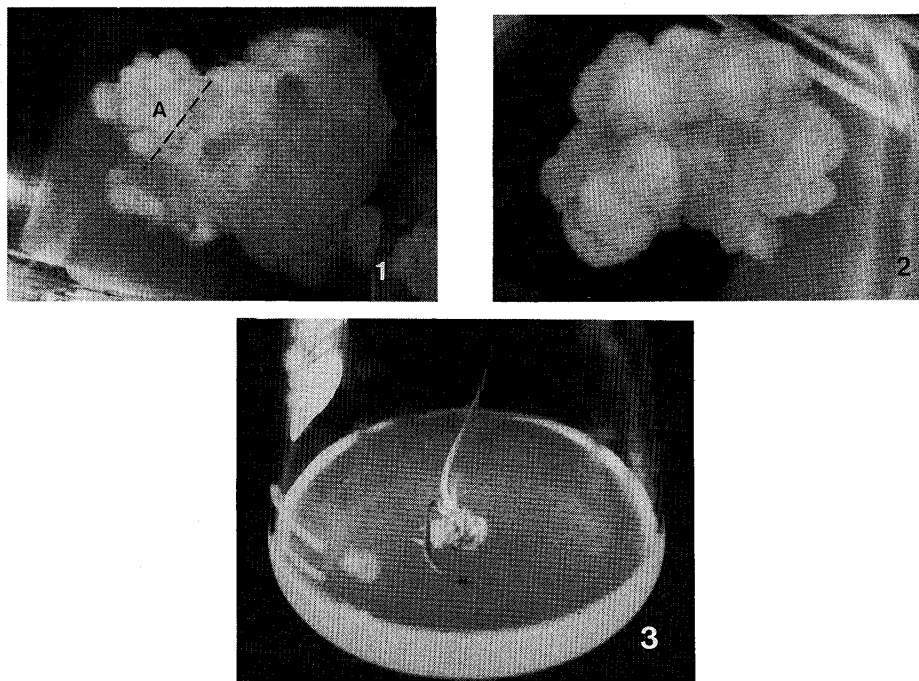


Fig. 2 Shoot primordia of *Narcissus*.

- (1) Shoot tip explant at 161 days of culture. Shoot primordia(A) produced on the explant were excised and subcultured at the site indicated by the dotted line at 183 days of culture.
- (2) Shoot primordia of *Narcissus* 98 days after subcultured.
- (3) Regenerated *Narcissus* from shoot primordia.

たユリ⁹⁾やラッキョウ¹⁷⁾でも2~3カ月を要している。アサツキ¹⁵⁾は誘導に長期間を必要とし、3カ月目に黄色集塊を分離し、9カ月目に再分化能を調査している。ニホンスイセンの苗条原基誘導は、培養を開始して6カ月と、球根類の中でも長期間を要した。しかし、苗条原基誘導に必要なホルモン濃度はアサツキ¹⁵⁾、ラッキョウ¹⁷⁾、ニンニク¹⁰⁾の場合に近かった。

このようにして誘導されたニホンスイセンの苗条原基は白色緻密で、表面に多数のコブ状の突起があり(Fig. 2-2)、Gu⁵⁾らがスイセンのりん片基部から誘導し、カルスと呼んでいる組織に似ていた。苗条原基を誘導した培地と同一組成の培地でこれを継代すると突起部分などの変色や表皮の退化などが生じた。そこで、この苗条原基の継代条件や再分化方法を検討し、完全な植物体を誘導することができた(Fig. 2-3)。次報で継代条件と再分化条件の詳細を報告する。

謝 辞

本研究のとりまとめに当たって指導を受けた岐阜大学農学部の福井博一博士に深謝致します。

文 献

- 1) 釜江正巳, 1965. 神戸大学教育学部研究集録第33号, p. 143-165.
- 2) Seabrook, J. E. A., B. G. Cumming, L. A. Dionne, 1976. CAN. J. BOT., 54: 814-819.
- 3) Hosoki, T., T. Asahira, 1980. Hortscience, 15(5) : 602-603.
- 4) Hussey, G., 1982. Ann. Bot., 49: 707-719.
- 5) Gu, H.-S., C.-H. Gao, S.-T. Wang, 1987. Acta Botanica Sinica, 28(3) : 336-339.
- 6) 田中隆荘, 1983. 種苗産業と育種新技術, p. 171-197, シーエムシー, 東京.
- 7) Tanaka, R., H. Ikeda, 1983. Jpn. J. Genet., 58: 65-70.
- 8) 谷口研至, 田中隆荘, 1988. 農業及び園芸, 63(11) : 49-53.
- 9) 姫野正己, 田中隆荘, 谷口研至, 1986. 園学要旨, 昭61秋 : p. 334-335.
- 10) 綾部昌則, 佐藤禎浩, 岩田 光, 谷口研至, 田中隆荘, 1987. 育種学雑誌, 37別1: p. 132-133.
- 11) 田中隆荘, 谷口研至, 藤重郁子, 1988. Jpn. J. Genet., 63: 113-125.
- 12) 吉岡啓子, 花田薫, 野村幸雄, 井上真奈美, 美濃部侑三, 大澤勝次, 1989. 日本育種学会第76回講演会要旨集, p. 6-7.
- 13) 釜江正巳, 1972. 神戸大学教育学部研究集録第47号, p. 69-71.

- 14) 下西 恵, 永井輝行, 野村幸雄, 吉岡啓子, 大澤勝次, 1993. 植物組織培養, **10**(1): 17-24.
- 15) 大澤勝次, 吉岡啓子, 1990. バイオホルティ, **6**: 14-20.
- 16) 中沢廣久, 戸田義宏, 島 拓雄, 1986. 園学要旨, 昭61秋: p. 330-331.
- 17) 岡田昌久, 松本満夫, 1990. 園学雑 59 別 1, '90[野菜]: p. 284-285.

Summary

Induction of Tissue-cultured Shoot Primordia from Shoot Apices in *Narcissus tazetta* L. var. *chinensis* ROEM.

Teruyuki NAGAI* and Katsuji OOSAWA**

* *Fukui Prefectural Horticultural Experiment Station, Mihama, Fukui 919-11, Japan*

** *National Institute of Agrobiological Resources, 2-1-2, Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan*

Effects of hormonal conditions in culture media on induction of tissue-cultured shoot primordia from shoot apices were investigated in *Narcissus tazetta* L. var. *chinensis* ROEM. Shoot apices were cultured on the media with different concentrations of auxins(NAA and 2, 4-D)and cytokinins(BAP and 4PU)by slanted rotary culture(2~4 rpm)under continuous light condition(approx. 3000 lux)at 25°C. The same shoot apices which grew normally were subcultured for a long time to induce shoot primordia.

Shoot apices grew normally at 0 and 0.02 mg/l NAA, and the enlargement of leaf primordia and shoot apices were observed at 0.2 mg/l. Addition of BAP at 0.02 to 0.2 mg/l together with the same concentrations of NAA promoted growth and enlargement of shoot apices. Addition of NAA at 2 mg/l or higher than this level inhibited growth of shoot apices and brought about formation of parenchymatous tissues at the cut end of explants. Addition of 2, 4-D instead of NAA increased formation of parenchymatous tissues, and addition of 4PU instead of BAP decreased enlargement of leaf primordia and shoot apices. These results suggested that 2, 4-D and 4PU may be unsuitable for induction of tissue-cultured shoot primordia. Shoot primordia were induced from enlarged leaf primordia about 180 days after initiation of culture with 0.2 mg/l NAA+0.2~2 mg/l BAP, and eventually developed into entire plants.