

ヒッペアスケリアのりん片培養による大量増殖とウイルスフリー化に関する研究

鹿嶋 英滋^{1)*}・梁川 正¹⁾

In vitro Propagation of Bulblets and Elimination of Viruses by Bulb-scale Cultures of *Hippeaskelia* Bulbs

Eiji KASHIMA and Tadashi YANAGAWA

抄 録：ヒガンバナ科属間雑種であるヒッペアスケリアについて、りん片切片の培養による効率的な子球形成と子球の増殖方法、及び得られた子球のウイルスフリー化の可能性について検討した。その結果、りん片切片や子球への切れ目処理、液体回転培養などにより効率よく増殖が行え、ウイルス除去の可能性が示された。

キーワード：ヒッペアスケリア、in vitro 培養、りん片切片、ウイルスフリー化、大量増殖

I. 緒言

ヒガンバナ科球根植物には、ヒッペアストラム、ネリネ、スイセンなど観賞用として高い価値を持つものが多く含まれる。これらの種類の繁殖については自然の分球には期待できないことから、そのりん片切片を材料とするカッティング（切片挿し）などの方法が確立され、増殖されている。しかし、このような栄養繁殖の方法では、ウイルスによる病害のためにその品質が著しく損なわれることが多く、球根生産上重大な問題とされている。現在、ウイルスによる病害を治療する有効な方法や化学物質などはまだ見つかっておらず、ウイルスを媒介するアブラムシやスリップスといった病害虫からの嚴重な隔離栽培や、弱毒ウイルスの使用による強毒ウイルスの症状の発現の予防などに重点がおかれている。

したがって、ウイルスに感染して病徴を示している球根については、破棄するしか方法がないのが現状である。しかし、ウイルス病を完全に防除することは大変困難であり、完全なウイルスフリー球根を作出し、増殖することは球根生産上大変価値のあることである。

栄養繁殖性作物では、ウイルスフリー株の作出には、茎頂分裂組織を材料とした in vitro 培養の効果が大きいことが知られており、その他の栄養繁殖法では、ウイルスフリー株の育成は困難であるとされている。しかし、茎頂培養は、得られる茎頂分裂組織の数に限りがあり、また、茎頂を摘出して植え付けるという作業には熟練を要する。さらに茎頂培養の困難な植物種も多く、これらの点が課題とされている。しかも、ウイルスフリー球根はウイルス病に抵抗性を持つわけではないので、露地栽培されれば再びウイルスに感染してしまう場合が多い。したがって、品質の維持向上のためには、数

1) 京都教育大学 *現在 大阪府立能勢高等学校

年ごとにウイルスフリー球根に更新することが必要となり、より簡単で、大量にウイルスフリー球根を生産できる技術の確立が望まれている。また、ヒガンバナ科球根植物には属間雑種など希少で高価な種類も多数含まれるため、これらの繁殖時における病害虫などを防止するためにも、*in vitro* 培養のような無菌的条件下での増殖が望まれる。

こうした現状であるので本研究では、ヒガンバナ科属間雑種であるヒッペアスケリアについて、そのりん片切片の *in vitro* 培養による効率的な子球形成と子球の増殖方法及び得られた子球のウイルスフリー化の可能性について検討した。

Ⅱ. りん片切片の *in vitro* 培養による子球形成

ヒッペアスケリア (×*Hippeaskeria*) は、一般にアマリリスと呼ばれているヒッペアストラム (*Hippeastrum hybridum*) とスプレケリア (*Sprekelia formosissima* Herb.) との属間雑種である。スプレケリアの美しい花色とヒッペアストラムの花容をあわせ持ち、しかも美しく艶のある葉で性質が強く、手に入りにくい希少品である。

Ⅱ. の実験では、ヒッペアスケリア (×*Hippeaskelia*) について、そのりん片切片を *in vitro* 培養することによる、効率的な子球の増殖法について検討した。

2.1 材料及び方法

本学附属環境教育実践センターの実験圃場にて栽培されている栽培株を供試した (図 1)。これらの栽培株のうち、キュウリモザイクウイルス (CMV) の感染が確認された栽培株を用いた。これらの球根を掘り上げて洗浄、殺菌後 8 つに縦断し、底盤部に 1 枚または 2 枚のりん片をつけた切片に切り分けて、これらの底盤部とりん片の基部との境目の部位をメスで縦 5mm、横 5mm の形に切り出して培養する切片とした。なお、こうして切り出したこれらの切片を以下では、1 りん片切片及び 2 りん片切片と称することとした (図 2)。培地には、White (1943) の無機塩類及びビタミン類に、生長調節物質として、0.01mg/1 の α -ナフタレン酢酸と 5mg/1 の 6-ベンジルアデニンを添加し、1%の水酸化カリウム及び塩酸で pH5.8 に調整した後、20g/1 のショ糖及び 8g/1 の寒天を加えた固体培地を用いた。培養容器には、18×140mm の硬質試験管を用い、上記の培地を分注し、アルミホイルで密閉した後、加圧滅菌処理 (15 分間、120℃、1.2kgf/cm²) を行った。この培地に切片を植え付けて培養した。培養は温度 25±1℃、湿度 60±10%、3,000lux、16 時間日長照明下で行った。観察は培養開始後 10 日ごとに行い、生存切片数、子球形成切片数、子球数、形成切片当たりの子球数、形成された子球の平均径 (mm)、形成された子球の平均長 (mm)、形成された子球の平均葉数、形成された子球の平均葉長 (mm)、子球からの発根数について調査した。また、観察により得られた数値については、主に T 検定 (有意水準 5%) によって統計分析を行った。



図 1 ヒッペアスケリアの栽培株

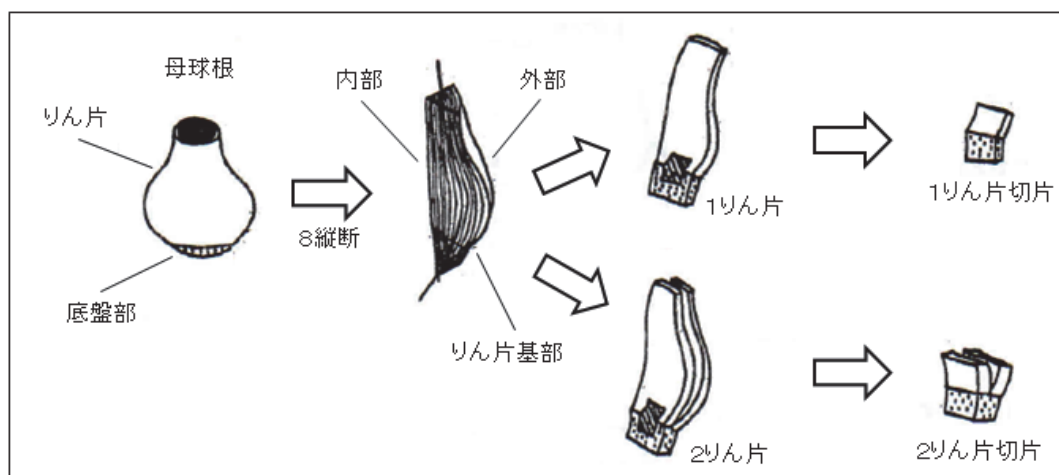


図 2 種々のりん片切片的作成

2.2 結果

いずれの切片においても、その生存切片のうち、ほぼ 90%の切片に 1 個または 2 個の子球形成がみられた。形成切片当たりの子球数や、1 母球当たりの獲得子球数を比較すると、2 りん片切片の方が高い値を示した（表 1）。また、りん片切片の母球上における内外の位置関係と子球形成については、いずれもほぼ 90%の切片に子球形成がみられ、形成切片当たりの子球数も同様であった（表 2）。切片の母球上における水平的位置関係と子球形成については、自然分球方向から採取した切片の方が子球形成切片数や子球数が多い値を示した（図 3、表 3）。さらにりん片切片からの子球の増殖効率を高める目的で、りん片切片への切れ目処理を行い、切れ目処理の有無や切れ目の本数の違いが子球形成に及ぼす影響を検討した結果、切れ目の本数の増加にともない子球数や形成切片当たりの子球数が増加した（図 4、表 4、図 5）。

表 1 種々のりん片切片における子球形成

切片の種類	供試 切片数	生存 切片数	子球形成 切片数 (%) ¹⁾	子球数	形成切片 当たりの 子球数	子球の生長状態 ²⁾					1母球 当たりの 獲得子球数
						径(mm)	×	長(mm)	葉数	葉長(mm)	
1りん片切片	77	67	60(90)	69	1.0	3.2±0.1	×	3.2±0.2	1.7±0.2	25.6±3.2	46
2りん片切片	79	65	57(88)	81	1.3	3.7±0.2	×	3.1±0.1	2.1±0.3	24.5±2.8	54
検定結果 ³⁾		(Z検定)	ns	(T検定)	ns	*		ns	*	ns	

培養後80日目の結果

1) 生存切片に対する子球形成切片の割合

2) 平均値±標準誤差

3) T検定またはZ検定による検定結果(危険率5%)、*: 有意差あり、ns: 有意差なし

表2 種々のりん片切片における子球形成

母球上の 採取部位	供試 切片数	生存 切片数	子球形成 切片数 (%) ¹⁾	子球数	形成切片 当たりの 子球数	子球の生長状態 ²⁾				
						径(mm)	×	長(mm)	葉数	葉長(mm)
内部	80	70	61(87)	80	1.3	3.5±0.1	×	3.2±0.1	2.1±0.2	24.8±1.9
外部	70	62	56(90)	70	1.3	3.4±0.2	×	3.2±0.1	1.7±0.2	25.3±3.8
検定結果 ³⁾		(Z検定)	ns	(T検定)	ns	*		ns	*	ns

培養後60日目の結果

1) 生存切片に対する子球形成切片の割合

2) 平均値±標準誤差

3) T検定またはZ検定による検定結果(危険率5%)、*:有意差あり、ns:有意差なし

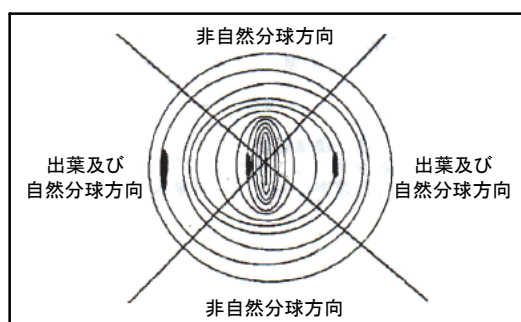


図3 母球根における自然分球の方向

表3 りん片切片の母球上における水平的位置関係と子球形成

母球上の 採取部位	供試 切片数	生存 切片数	子球形成 切片数 (%) ¹⁾	子球数	形成切片 当たりの 子球数	子球の生長状態 ²⁾				
						径(mm)	×	長(mm)	葉数	葉長(mm)
自然分球方向	77	77	63(82)	101	1.6	3.9±0.3	×	3.5±0.2	0.7±0.1	4.7±0.9
非自然分球方向	63	63	46(73)	63	1.4	3.9±0.2	×	3.6±0.2	1.0±0.1	5.9±0.8
検定結果 ³⁾		(Z検定)	*	(T検定)	ns	ns		ns	*	*

培養後30日目の結果

1) 生存切片に対する子球形成切片の割合

2) 平均値±標準誤差

3) T検定またはZ検定による検定結果(危険率5%)、*:有意差あり、ns:有意差なし

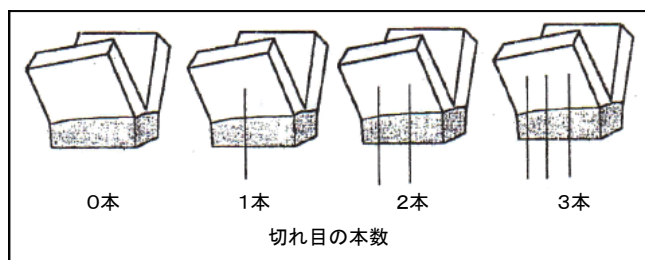


図4 切片への切れ目処理模式図

表 2 りん片切片への切れ目処理と子球形成

切れ目の 本数	供試 切片数	生存 切片数	子球形成 切片数(%) ¹⁾³⁾	子球数	形成切片 当たりの 子球数	子球の生長状態 ²⁾⁴⁾				
						径(mm)	×	長(mm)	葉数	葉長(mm)
0(無処理)	20	16	15(94)y	25	1.7a	3.4±0.2a	×	3.3±0.2a	1.6±0.2a	23.4±4.1b
1	22	19	15(79)z	33	2.4ab	4.2±0.2b	×	4.1±0.2b	2.0±0.2b	26.9±3.2b
2	23	21	15(71)z	40	2.7bc	4.3±0.1b	×	4.0±0.1b	2.0±0.1b	15.7±1.5a
3	21	19	14(74)z	55	3.9d	3.7±0.1a	×	3.8±0.1b	1.7±0.1a	14.7±1.6a
検定結果					(F検定) ⁵⁾	**		**	**	**

培養後60日目の結果

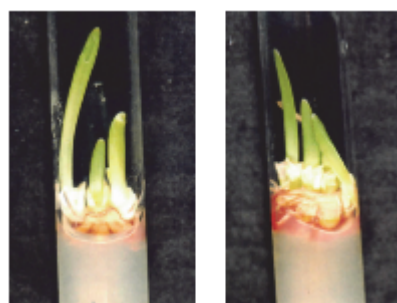
1) 生存切片に対する子球形成切片の割合

2) 平均値±標準誤差

3) 同一英小文字を付した数値間にはZ検定による有意差なし(危険率5%)

4) 同一英小文字を付した数値間にはT検定による有意差なし(危険率5%)

5) F検定による検定結果(危険率1%)、** : 有意差あり、ns : 有意差なし

図 5 りん片切片からの子球形成
(左 : 2本切れ目、右 : 3本切れ目)

Ⅲ. 培養子球の再培養による新子球形成

Ⅱ. で得られた無菌の子球を材料として、さらに新たな子球を効率よく大量に獲得するための再培養方法について検討した。

3.1 材料及び方法

培地の組成は、Ⅱ. で用いたものと同様とし、液体培地には固体培地の組成から寒天を除いたものを使用した。再培養として、硬質試験管での寒天静置培養、フラスコを用いた液体静置培養と液体回転振とう培養、ドラム型回転培養器での液体回転培養(図 6)、ジャーファーメンターでの液体通気培養を行った(図 7)。

3.2 結果

子球をそのまま上記の再培養方法で培養した結果、新たに形成された子球は少なかった。そこでさらに大量の新子球形成を目的として、子球に十字に切れ目を入れる処理、3本の切れ目を入れる処理、縦に切断する処理を施したうえで培養し、子球への処理方法や再培養の方法の違いが新子球形成に及ぼす影響を検討した(図 8)。その結果、種々の処理を施した子球については、そのほとんどに新たな子球が形成された。とくに、十字切れ目処理を施した子球は、形成子球当たりの新子球数や獲得総子球数をもっとも高い値を示した(表 5)。形成後の子球の生長状態から評価すると、十字切れ目処理を施した子球をドラム型回転培養器で培養するのが最も効率的であることがわかった(表 6、図 9)。

また、りん片切片に形成された子球を、培養開始後 20 日から 50 日の期間、10 日ごとに移植して

培養し、移植時期の違いが子球の生長に及ぼす影響や新たな子球形成の可能性について検討した結果、30 日目に移植した子球が高い生長量を示したが、新たな子球形成はわずかであった（表 7）。

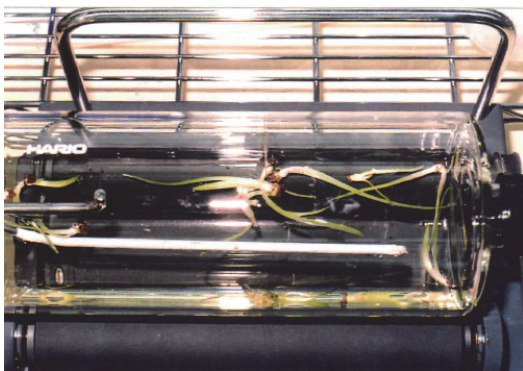


図 6 液体回転培養（ドラム型回転培養器）

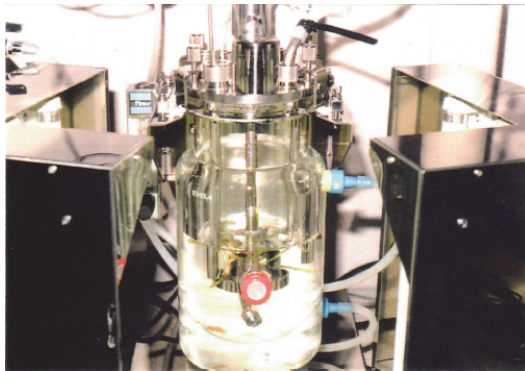


図 7 液体通気培養（ジャーフェーマンター）

表 3 種々の処理を施した子球の再培養における新子球形成

培養方法	処理の種類	供試 切片数	生存 切片数	新子球形成 切片数 (%) ^{1) 3)}	新子球数	形成切片 当たりの 新子球数 ⁴⁾	獲得総子球数 ²⁾
エルレンマイヤー フラスコ	無処理	12	12	1 (8) w	3	3.0c	15
	十字切れ目処理	12	12	9 (75) x	29	3.2d	34
液体振とう培養	3本切れ目処理	12	12	12 (100) z	19	1.7ab	22
	縦断子球処理	12	12	12 (100) z	13	1.1a	13
ドラム	無処理	12	11	0 (0) w	0	—	11
	十字切れ目処理	12	12	12 (100) z	52	4.3d	52
液体回転培養	3本切れ目処理	12	12	11 (92) y	21	1.9b	21
	縦断子球処理	12	12	9 (75) z	13	1.1a	13
ジャーフェーマンター	無処理	12	12	0 (0) w	0	—	12
	十字切れ目処理	12	12	12 (100) z	48	4.0d	52
液体通気培養	3本切れ目処理	12	12	11 (92) y	39	3.6d	43
	縦断子球処理	12	12	12 (100) z	17	1.6a	17
検定結果				(F検定) ⁵⁾		* *	

培養後60日目の結果

1) 生存数に対する新子球形成切片の割合

2) 供試子球、新子球を含む総獲得子球数

3) 同一英小文字を付した数値間にはZ検定による有意差なし(危険率5%)

4) 同一英小文字を付した数値間にはT検定による有意差なし(危険率5%)

5) F検定による検定結果(危険率1%)、* *: 有意差あり、ns: 有意差なし

表 4 種々の処理を施した子球の再培養によって得られた新子球の生長状態

培養方法	処理の種類	径(mm) ¹⁾	×	長(mm) ¹⁾	葉数	葉長(mm) ¹⁾
エルレンマイヤー フラスコ	無処理	5.3±1.2c-e	×	5.3±1.2abc	3.0±0.0	33.7±10.9ab
	十字切れ目処理	4.7±0.3cd	×	6.7±0.4cd	3.7±0.2	39.5± 3.6abc
液体振とう培養	3本切れ目処理	5.1±0.4c-e	×	6.4±0.4cd	3.1±0.4	55.1± 6.0b-g
	縦断子球処理	5.8±0.3e	×	8.6±0.5e	3.9±0.6	68.8±14.5b-h
ドラム	無処理					
	十字切れ目処理	5.4±0.3de	×	7.1±0.4cd	3.0±0.2	46.4± 4.3b-e
液体回転培養	3本切れ目処理	4.5±0.2bc	×	5.8±0.5bcd	2.8±0.2	31.7± 4.9a
	縦断子球処理	6.5±0.9e	×	8.5±1.4cde	3.2±0.5	56.6±11.7b-g
ジャーファーマンター	無処理					
	十字切れ目処理	4.0±0.3ab	×	5.0±0.4ab	3.4±0.2	52.4± 7.3b-f
液体通気培養	3本切れ目処理	3.7±0.2a	×	4.3±0.4a	2.9±0.3	45.5± 8.2a-d
	縦断子球処理	5.4±0.3de	×	7.0±0.5cd	3.9±0.5	83.1± 9.7h
検定結果	(F検定) ²⁾	**		**	ns	**

培養後60日目の結果、平均値±標準誤差

1) 同一英小文字を付した数値間にはT検定による有意差なし(危険率5%)

2) F検定による検定結果(危険率1%)、** : 有意差あり、ns: 有意差なし

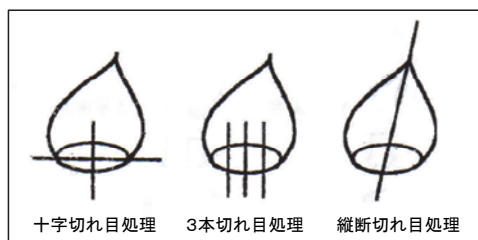


図 8 子球への処理模式図

表 5 種々の時期に移植した子球の再培養による子球の形成状態と形成子球の生長

20日	25	4.0±0.2	×	2.9±0.1	1.0±0.0	2.6±0.3	26	5.2±0.3ab	×	4.9±0.1a	2.8±0.1b	24.8±2.2a
30日	22	4.3±0.2	×	3.7±0.2	1.2±0.1	9.0±2.6	24	5.7±0.2b	×	6.3±0.2b	1.7±0.1a	54.0±5.8c
40日	26	4.5±0.2	×	4.5±0.2	1.9±0.2	17.3±3.2	30	5.2±0.2b	×	5.3±0.2a	1.8±0.1a	39.2±4.7b
50日	30	3.9±0.2	×	4.1±0.2	1.7±0.1	25.2±2.2	34	4.6±0.2a	×	5.4±0.2ab	1.9±0.1a	57.1±5.3c
検定結果							(F検定) ²⁾	**		**	**	**

移植後30日目の結果、平均値±標準誤差

1) 同一英小文字を付した数値間にはT検定による有意差なし(危険率5%)

2) F検定による検定結果(危険率1%)、** : 有意差あり、ns: 有意差なし



図 9 子球からの新子球形成（切れ目処理あり）

IV. りん片切片の *in vitro* 培養によって得られた子球のウイルス無毒化の検討

Ⅱ. 及びⅢ. において CMV 感染株から採取したりん片切片の培養によって得られた無菌の子球及び再培養によって得られた新子球について、CMV の検出を行った。

また、りん片切片に形成された子球を、種々の時期にりん片切片から摘出、移植して培養した子球について、CMV の検出を行った。

4.1 材料及び方法

りん片切片の培養によって得られた無菌の子球及び再培養によって得られた新子球について、各子球の展開葉を用いて検出試料を作成し、DIBA 法を用いて CMV の検出を行った（図 10）。また、りん片切片に形成された子球を、培養開始後 20 日から 50 日の期間、10 日ごとに移植して培養し、移植後 60 日を経過した時点で、その子球について DIBA 法により CMV の検出を行った。りん片切片の培養に用いる培地と、移植後の子球の培養に用いる培地の組成及び培養条件はⅡ. の実験と同じとした。

4.2 結果

りん片切片に形成された子球の 71. 7%は CMV を保毒していなかった。その子球を再び固体培地で培養することによって得られた子球では、78. 2%の CMV 除去率を示したのに対し、その子球を液体培地で再培養して得られた新子球は、その 85. 0%から CMV が除去されており、液体培地を用いた再培養の有効性が示された（表 8）。また、りん片切片に形成された子球を、種々の時期にりん片切片から摘出、移植して培養した子球について、CMV の検出を行った結果、移植を行わなかった子球の CMV 除去率が 43. 8%と低かったのに対し、移植を行った子球については、培養開始から 20 日後及び 30 日後の比較的若い子球を移植した場合に約 80%という高い CMV 除去率を示した（図 11）。

ニトロセルロースシートをTBSに浸した後、乾燥

抗原液を滴下し乾燥後、ブロック液に浸し静置(20分間)

一次抗体液に浸し、湿室中に静置(20分間)

TTBSで洗浄(15分間)

二次抗体液に浸し、湿室中に静置(20分間)

0.2M Tris-HClで洗浄(15分間)

基質・発色液で覆う(2～3時間)

ろ紙で挟み反応を停止させる

抗原液 : ウイルス感染株から採取した葉片を、100倍量のTTBSで磨砕し、遠心分離(10,000rpm、5分間)した上清

TBS : 0.02M Tris-HCl pH7.5、0.5M NaCl

TTBS : TBS、0.05% Tween20

TTBSPB : TBS、2%PVP、0.2% 牛血清アルブミン(BSA)

ブロック液 : TTBS、2%PVP、2% 牛血清アルブミン(BSA)

一次抗体液 : CMV抗血清をTTBSPBで3000倍に希釈したもの

二次抗体液 : アルカリ性フォスファターゼ標識ー抗ウサギIgGーヤギIgG (TAGO社製)を3000倍に希釈したもの

基質・発色液 : Fast Red TR Salt(6mg/ml、sigma社製)と0.1% Naphtol AS-MX phosphate(1mg/ml、sigma社製)を1:1に混合したもの (共に0.2M Tris-HCl pH8.2で希釈)

図 10 DIBA 法の操作手順

表 6 子球及び子球の再培養によって得られた新子球におけるCMVのDIBA法による検出

子球の種類	供試 試料数	CMV除去 試料数	CMV 除去率(%) ¹⁾
子球	60	43	71.7z
新子球			
固形培地由来	87	68	78.2y
液体培地由来	20	17	85.0x

1) 異なる英小文字を付した数値間にはZ検定(危険率5%)による有意差あり。

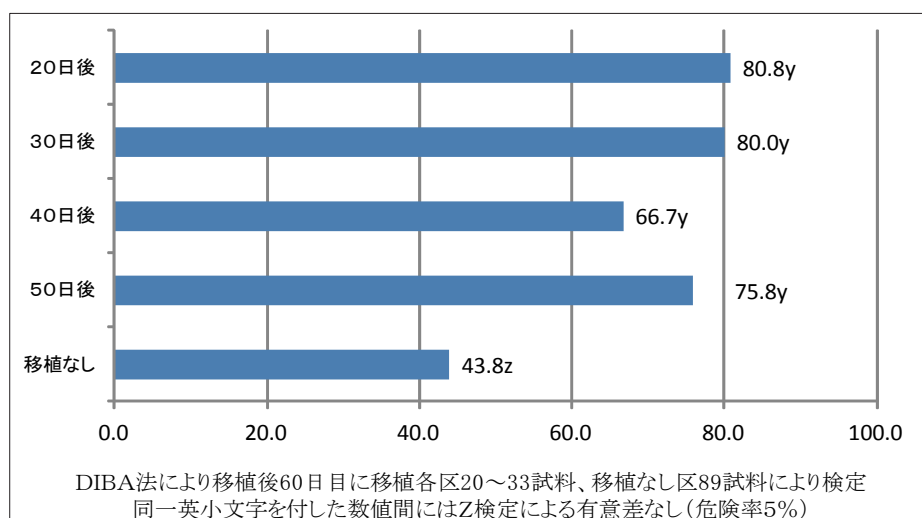


図 11 種々の時期に切片から採取した子球の再培養によるCMV除去率(%)

V. 総括

植物体のウイルスフリー化には茎頂培養法がその方法とされ、他の方法では困難とされている。しかし、本研究において、ヒガンバナ科球根植物でありその属間雑種であるヒッペアスケリアについて、培養操作が簡便であるりん片切片の *in vitro* 培養により、CMV 除去率の高い子球を大量に得ることができた。また、その子球を液体培地で再び培養することで、さらに CMV 除去率の高い、生育の促進された子球が大量に得られた。再培養を繰り返すことでさらに CMV 濃度の低い子球を大量に得ることができると考えられ、実用上大変有意義な方法といえる。

今後の課題としては、上述の球根について CMV 除去率の向上のために再培養を繰り返すことや、他のヒガンバナ科球根植物、さらにはユリ科など他の科に属する球根植物についても、同様の方法により、ウイルスフリー化の可能性を検討することがあげられる。

VI. 参考文献

- 1) Yanagawa, T. and T. Osaki. 1996. In vitro propagation of bulblets and elimination of viruses by bulb-scale cultures of *Hippeastrum hybridum* bulbs. *Plant Tissue Culture Letters*. 13(2):147-152.
- 2) 尾崎武司・野口総一郎・浜中昭彦・平田明安・梁川 正. 1996. ヒガンバナ科およびユリ科球根花卉のりん葉切片からの子球形成とウイルスの無毒化. *植物組織培養*. 13(2):153-160.
- 3) 妻木直子・高山真策. 1992. 液体振とうおよびジャーファーメンターによるヤマユリの簡易大量増殖に関する研究. *植物工場学会誌*. 3(2):124-128.
- 4) 前口良太郎. 1994. テッポウユリの組織培養によるウイルスフリー化と増殖に関する研究. 京都教育大学大学院修士論文.
- 5) 森山 潤. 1990. テッポウユリにおける組織培養による大量増殖とウイルスフリー化に関する研

究. 京都教育大学卒業論文.

- 6) 梁川 正. 1986. ヒガンバナ科及びユリ科植物の有皮りん茎切片における子球形成に関する研究.
大阪府立大学博士論文.