

N⁶-Benzyladenine および低温が試験管内で培養した
ユリ (*Lilium* spp.) の発育相の転換に及ぼす影響

石森 崇晃

**Effect of N⁶-Benzyladenine and Low temperature on Developmental
Phase Changes in *Lilium* spp. Cultured *In Vitro***

**By
Takateru Ishimori**

新潟大学大学院自然科学研究科博士後期課程

環境管理科学専攻

目次

第1章 緒言	1
第2章 サイトカニンおよび温度がユリ子球の幼若相から 花熟相への移行に及ぼす影響	3
第1節 シンテッポウユリ‘ホワイト阿賀’の <i>in vitro</i> 子球の幼若相から花熟相への移行に N ⁶ -Benzyladenine および温度が及ぼす影響	3
第2節 コルヒチンがシンテッポウユリ‘ホワイト阿賀’の <i>in vitro</i> 子球の茎伸長に及ぼす影響	23
第3節 数種類のユリの子球の幼若相期間に及ぼす N ⁶ -Benzyladenine の影響	33
第3章 <i>in vitro</i> ユリ子球の花芽形成に影響する要因	39
第1節 N ⁶ -Benzyladenine と温度がヒメサユリ <i>in vitro</i> 子球 の幼若相期間と花芽形成に及ぼす影響および子球の 発達と花芽形成との関係	39
第2節 光線および硝酸アンモニウム濃度が <i>in vitro</i> で 茎伸長したシンテッポウユリ‘ホワイト阿賀’の 子球の花芽形成に及ぼす影響	56
第4章 総合考察	65
引用文献	67
英文摘要	71
謝辞	76

第1章 緒言

ユリ(*Lilium*)の発育相は、幼若相(juvenile phase)、花熟相(vegetative adult phase)および花芽形成相(flowering phase)に分けられる(Langens-Gerritsら, 2003)。ユリ子球は、幼若相では1または2, 3枚の葉を形成し、花熟相へ移行すると茎を伸長し、さらに花熟相から花芽形成相へ移行すると花芽を形成する。多くの種類のユリは、幼若相期間または花芽分化時期によって2つのタイプに分類することができる。すなわち、幼若相期間によって、シンテッポウユリやタカサゴユリなど1年以内の短い幼若相期間をもつ種類(タイプAと呼ぶ)とヒメサユリやササユリなど1年より長い幼若相期間をもつ種類(タイプBと呼ぶ)に分けられる。また花芽分化時期によって、シンテッポウユリやタカサゴユリなど鱗茎の外に伸長した茎の頂部で分化を開始する種類(タイプ1と呼ぶ)とヒメサユリ、ササユリやエゾスカシユリなど夏から秋の間に鱗茎内部の茎の頂部で分化を開始する種類(タイプ2と呼ぶ)に分類することができる(大川, 1989; 清水, 1971)。タイプAとタイプBの幼若相期間の違いや、タイプ1とタイプ2の花芽分化時期の違いがどのような要因、メカニズムによって生じているのかは分かっていない。

ユリ子球の幼若相から花熟相への移行は、外部形態的には茎伸長によって、内部形態的には細胞分裂活性の増加に伴う茎頂分裂組織の外衣・内体構造の発達によって特徴づけられる(Langens-Gerritsら, 2003)。一方、*Triteleia*(Hanら, 1991)やシネラリア(Athertonら, 1998)の発生学的により進んだ相への移行は茎頂の大きさや茎頂における葉の分化速度の増加によって特徴づけられる。サイトカイニン(シトカイニン)はタバコの茎頂の細胞分裂と発達および葉の分化速度に影響を及ぼす(Wernerら, 2001)ことから、ユリ、*Triteleia* およびシネラリアの茎頂の変化および発育相の転換においてサイトカイニンが本質的な役割を担っている可能性がある。しかし、ユリの幼若相から花熟相への移行におけるサイトカイニンの役割はほとんど知られていない。

低温はユリ子球の幼若相から花熟相への移行を促進して、茎伸長を生起させる(Langens-Gerritsら, 2003)。低温はミカヅキモの細胞(Hogetsuら, 1986)やトウモロコシの培養細胞(Chuら, 1992)の表層微小管の脱重合を促し、表層微小管はセルロース微繊維の沈着位置を制御することによって植物細胞の伸長方向を決定する(柴岡, 2003)。これらのことから低温は表層微小管の動態に関与して茎細胞の伸長に影響している可能性があるが、調査されていない。一方、低温は、タイプ1に属するテッポウユリおよびカノコユリで春化作用をもち、花熟相から花芽形成相への移行を促進する(大川, 1995)が、タイプ2に属するユリで低温が花芽形成相への移行に及ぼす効果については不明である。

自然条件下で生育しているテッポウユリ，ウケユリ，タモトユリ，ヤマユリ，サクユリ，コオニユリ，スゲユリ，カノコユリ，クルマユリ，ハカタユリ，三宅島自生のイワトユリ，トサヒメユリ，オニユリ，キカノコユリはタイプ 1 に属し，鱗茎から外に茎を伸長した後，すなわち，伸長茎と普通葉が日光に曝された後，その茎の頂部で花芽分化を開始する（清水，1971；大川，1989）．このことから，これらのユリでは伸長茎または普通葉への光線の照射が花熟相から花芽形成相への移行の引き金になっている可能性がある．この可能性は，テッポウユリおよびカノコユリで，低温の春化作用が長日によって代替される（大川，1995）ことから支持される．しかしながら，光線がどのような生理的メカニズムによって花芽形成を促すのかは明らかになっていない．

このように，ユリの発育相の転換に関わる要因やメカニズムは不明な点が多い．これは，今までの研究が圃場で鱗片繁殖された子球や実生球などを用いて行われており，制御できない多数の環境要因が子球の生長に影響するため発育相転換に関わる本質的な要因を特定することが困難であったからであると推察される．一方で，環境刺激や生理活性物質が植物に及ぼす影響についての実験は環境の制御が容易な *in vitro* で行われることがあり，ウキクサ (*Lemna*) の花芽分化に関する研究において，*in vitro* での実験は多くの生理学的知見を明らかにした（Gupta・Maheshwari，1969；Fujioka・Sakurai，1992）．最近，ユリの発育相の転換に関する研究においても，*in vitro* 実験の有効性が明らかとなった（Langens-Gerritsら，2003）．そこで本研究では，タイプ A-1 に属するシンテッポウユリ‘ホワイト阿賀’とタイプ B-2 に属するヒメサユリを実験植物として扱い，*in vitro* 子球の発育相の転換に及ぼすサイトカイニン，低温および光線の影響を調査することによってユリ発育相転換のメカニズムについて明らかにすることを試みた．

第 2 章 サイトカイニンおよび温度がユリ子球の幼若相から花熟相への移行に及ぼす影響

第 1 節 シンテッポウユリ ‘ ホワイト阿賀 ’ の *in vitro* 子球の幼若相から花熟相への移行に N⁶-Benzyladenine および温度が及ぼす影響

緒言

ユリ (*Lilium*) の発達過程は 3 つの発育相, すなわち幼若相 (juvenile phase), 花熟相 (vegetative adult phase), 花芽形成相 (flowering phase) に分けられ (Langens-Gerrits ら, 2003), 幼若相から花熟相への移行は茎伸長の開始によって特徴付けられる。幼若相から花熟相への移行の要因についての最近の研究は, *in vitro* 子球を用いて, 制御された培養条件下で行われている (Langens-Gerrits ら, 2003)。ユリ子球の茎伸長は, 子球の重さ (Niimi, 1995; Langens-Gerrits ら, 2003), 大きさ (Matsuo・Arisumi, 1978) および温度 (Langens-Gerrits ら, 2003) に影響される。特に, ユリの種類や発達段階によっては, 低温が茎の節間伸長にとって必須の因子である (Langens-Gerrits ら, 2003)。しかし, 低温がどのような生理的役割を担っているのかは不明である。

ユリの幼若相から花熟相への移行は, 形態学的に茎頂分裂組織における細胞分裂活性の増加に伴う外衣・内体構造の発達により特徴づけられる (Langens-Gerrits ら, 2003)。サイトカイニンはタバコの茎頂分裂組織の大きさと細胞分裂活性に影響することが Werner ら (2001) によって示されていることから, ユリ子球の茎頂の変化と花熟相への移行においてサイトカイニンが本質的な役割を担っている可能性がある。しかし, その役割を明らかにした研究は少ない。そこで, *in vitro* で培養したシンテッポウユリ ‘ ホワイト阿賀 ’ の鱗片上に発生した子球の幼若相から花熟相への移行における N⁶-Benzyladenine (BA) および温度の影響と役割を調査した。

材料および方法

(1) 培養に用いた鱗片の準備

新潟市で育成したシンテッポウユリ ‘ ホワイト阿賀 ’ の鱗茎から剥がした鱗片を, 水道水で洗浄した後, 70% エタノール (v/v) で 10 秒間表面殺菌した。その後, 鱗片は水道水で洗浄し, 10 倍に希釈した 10% (w/v) ベンザルコニウム溶液 (日本製薬株式会社) で 10 分間殺菌し, さらに, 有効塩素濃度 2% の次亜塩素酸に 20 分間浸した後, 滅菌水で 3 回洗浄した MS 基本培地 (Murashige and

Skoog, 1962) に 6 % ショ糖, 0.7 % 寒天 (伊那食品工業株式会社) を添加したものを基本培地 (MSSA 培地と呼ぶ) とし, 鱗片は, 約 1 cm² の断片に切り, MSSA 培地に 0.54 μM 1-Naphthaleneacetic acid (NAA) および 0.044 μM BA を添加した培地で培養した. 培地は, 0.1 N HCl または 0.1 N NaOH によって pH 5.7 に調節した後, 100 ml 三角フラスコに 30 ml ずつ分注してアルミホイルでふたをし, 121 °C, 1.2 kg · cm⁻² の圧力下で 10 分間蒸気圧滅菌した.

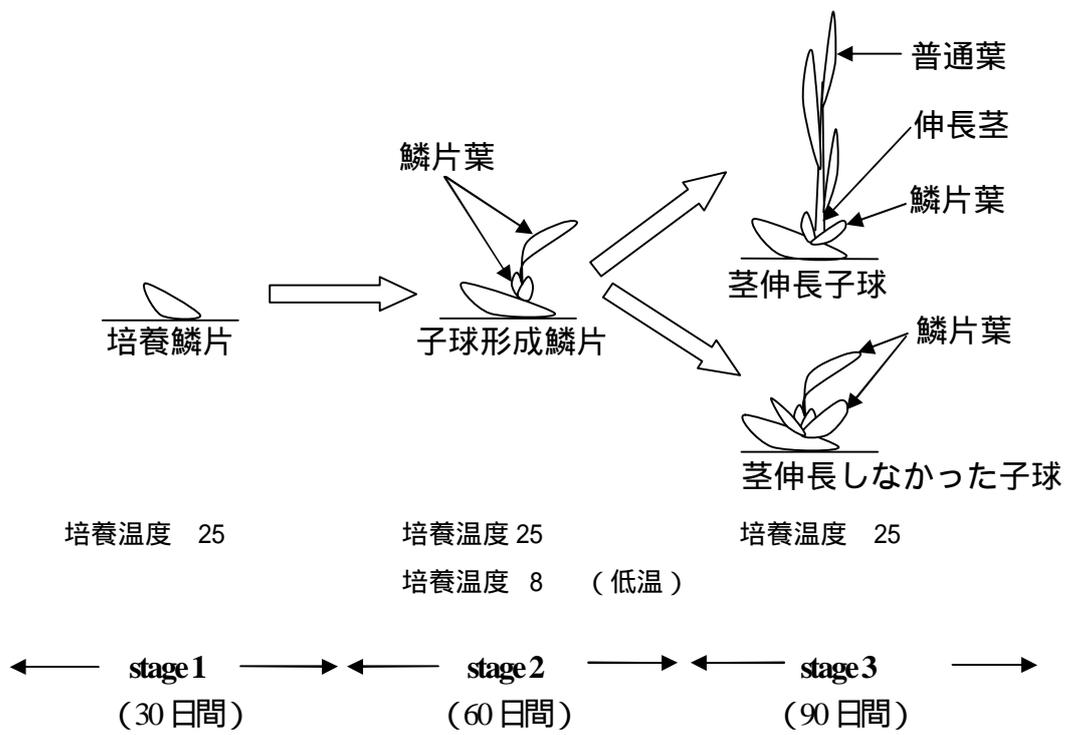
鱗片の断片を 8 から 12 週間 25 °C 暗黒下で培養して *in vitro* 子球を得た (G-1 子球と呼ぶ). 200 から 400 mg の G-1 子球の鱗片を実験に用いた.

(2) 各ステージにおける植物生長調節物質と温度

G-1 子球から剥がした鱗片は暗黒下で 180 日間培養した. 培養期間は, 3 つのステージ (stage 1, 2 および 3) に区分し (第 1 図), それぞれのステージの期間, 温度および培地に添加した植物生長調節物質は第 1 表に示した. 0.54 μM NAA と 0.044 または 4.4 μM BA を含む MSSA 培地を 30 ml 入れた 100 ml 三角フラスコに 10 個の鱗片を置床し, 25 °C で 30 日間培養した (stage 1). 子球を形成した鱗片 (子球形成鱗片) は, stage 1 と同じ濃度の BA を添加した MSSA 培地を入れたフラスコに 5 個ずつ置床して, 25 °C または 8 °C (温度処理) で 60 日間培養し (stage 2), その後 25 °C で 90 日間培養した (stage 3) (第 1 図). 鱗片は, stage 2 および 3 において, 30 日ごとに継代培養され, その都度, 発達した根と鱗片葉の上部を除去した. 鱗片から形成した子球および茎伸長子球の累積数は 30 日ごとに, 子球の鱗片葉および普通葉の数は stage 2 終了時から 30 日後 (培養開始から 120 日後) に計測した. なお, 本研究では, 子球の底盤部 (盤茎) に着生した葉を鱗片葉, 底盤部から伸長した茎に着生した葉を普通葉と定義した. データは 2 元配置分散分析によって統計分析した. stage 2 および stage 3 の子球の茎頂または茎の形態は, 第 2 表に示した方法によって観察した.

(3) 茎頂の直径の測定

0.044 または 4.4 μM BA を含む培地で培養し, stage 2 において 25 °C または 8 °C で温度処理した子球は, stage 2 終了時に 5 個ずつ採取し, カミソリの刃で約 1 mm の厚さをもつ縦断切片にした. これらの試料は, 1 mM MgSO₄, 5 mM Ethylene glycol-bis (2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA) および 1% glycerol を含む 50 mM Piperazine-N,N'-bis[2-ethanesulfonic acid] (PIPES) バッファー (pH 6.8) に 3.7% のパラホルムアルデヒドを溶かした溶液で 2 時間固定した. 試料は, Optimal Cutting Temperature (O.C.T.) compound (Sakura Finetek USA, Inc.) に包埋して -196 °C の液体窒素に数分間浸して凍結した後, 凍結ミクロトームで 100 μm の縦断切片にした. 切片は, 水道水で洗



第1図 鱗片培養の方法の概略とそれぞれのステージにおける子球の外観。各ステージの培養条件の詳細は第1表を参照。

第 1 表 各ステージの培養期間，温度および培地に添加した 1-Naphthaleneacetic acid(NAA)および N⁶-Benzyladenine(BA)の濃度

ステージ	培養 日数	温度 ()	NAA (μ M)	BA (μ M)
stage 1	30	25	0.54	0.044
			0.54	4.4
stage 2	60	25	0	0.044
			0	4.4
		8	0	0.044
stage 3	90	25	0	4.4
			0	0.044
			0	4.4

第2表 ユリ子球の茎頂または茎の観察に用いた固定，切片化，染色の方法および検鏡に用いた顕微鏡

処理	観察対象			
	茎頂の直径	前形成層の配列 および柔細胞の形態	茎の柔細胞の 微小管	茎の柔細胞の セルロース微繊維の結晶
固定	3.7%パラホルム アルデヒド固定	FAA 固定 ^z	3.7%パラホルム アルデヒド固定	3.7%パラホルム アルデヒド固定
切片化	凍結切片法	パラフィン切片法	凍結切片法	凍結切片法
染色	デラフィールド・ ヘマトキシリン染色	デラフィールド・ ヘマトキシリン染色	蛍光抗体法	-
検鏡	明視野顕微鏡	明視野顕微鏡	蛍光顕微鏡	偏光顕微鏡

^z FAA (90:5:5 (v/v/v) = 70%エタノール:酢酸:ホルムアルデヒド)

浄した後，デラフィールド・ヘマトキシリンで 5 分間染色し，明視野顕微鏡下で観察しながら最も大きな茎頂を含む連続切片の最も若い 2 つの葉の間の直径距離を茎頂の直径として計測した．

(4) 茎頂の柔細胞の形態と前形成層の配列の観察

0.044 または 4.4 μM BA を含む培地で培養し，stage 2 で 25 °C または 8 °C で温度処理した子球は，stage 2 の終了時に 10 個ずつ採取し，FAA 溶液(90:5:5 (v/v/v) = 70% エタノール:酢酸:ホルムアルデヒド)で 1 時間以上固定した後，24 時間流水(水道水)で洗浄し，水-エタノールシリーズ(20 から 100%)で脱水した．続いて，子球は，4 段階のエタノール-クロロホルムシリーズ(33 から 100%)で処理し，60 °C のパラフィンの中で数日間保持した．その後，子球は，パラフィンブロックに包埋して，ミクロトームで 25 μm の切片にした．切片は，デラフィールド・ヘマトキシリンで染色し，明視野顕微鏡下で観察した．

(5) 茎頂の柔細胞の微小管の配向の観察

4.4 μM BA を含む培地で培養し，stage 2 において 25 °C または 8 °C で温度処理した子球は，stage 2 の終了時に 5 個ずつ採取し，カミソリの刃で約 1 mm の厚さの縦断切片にした．これらの試料は，1 mg/l ロイペプチン (Sigma-Aldrich Inc.)，1% グリセロールおよび 3.7% のパラホルムアルデヒドを溶かした微小管安定化緩衝液 (MSB: 1 mM MgSO_4 ，25 mM EGTA を含む 50 mM PIPES バッファー (pH 6.8)) で 2 時間固定した．試料は，(3)で述べたのと同じ方法で包埋，凍結した後，凍結ミクロトームで 25 μm の縦の切片にして，MAS コート付きスライドガラス(松浪硝子工業株式会社)に貼りつけた．切片は，1 mg/l ロイペプチンを含む 200 ml の MSB に 1 時間浸漬した後，1 mg/l ロイペプチン，25 mM EGTA および 2% Cellulase “Onozuka” RS(ヤクルト薬品工業株式会社)を含む 50 mM クエン酸バッファー (pH 5.0) で 30 分間処理し，MSB で洗浄後，さらに 1% Triton X-100 を含む MSB で 20 分間処理した．続いて，切片は Fluorescein isothiocyanate (FITC) を結合した抗 α -チューブリンマウスモノクローナル抗体(DM1A)(Sigma-Aldrich Co.)を 1:50 の比率で溶かした Phosphate-buffered saline (PBS)(150 mM NaCl を含む 20 mM リン酸バッファー (pH 7.0)) を滴下し，湿潤箱の中で 12 時間維持した．切片は，PBS で洗浄した後，0.1% n-propyl gallate(Sigma Chemical Co.)を含む封入剤 (PBS とグリセロールの混合液 (1:1)) で封入し，蛍光顕微鏡下で観察した．

(6) 茎頂の柔細胞のセルロース微繊維の配向の観察

4.4 μM BA を含む培地で培養し，stage 2 において 25 °C または 8 °C で温度処

理した子球は，stage 2 終了時から 10 日後に 5 個ずつ採取し，カミソリの刃で約 1 mm の厚さの縦断切片にした．これらの試料は，(3)で述べたのと同じ方法で固定，包埋，凍結した後，凍結マイクロトームで 25 μm の縦断切片にした．切片のセルロース微繊維の結晶は，偏光顕微鏡下で観察した．

結果

BA および stage 2 の温度が茎伸長した子球の形成に及ぼす影響

鱗片から形成された子球の累積数は BA 濃度によって影響され（第 3 表），子球の形態および茎伸長子球の数は BA および stage 2 の温度に影響された（第 3 表および第 2 図）．0.044 μM BA を含む培地では stage 2 の温度に関わらず茎伸長子球は形成されなかった．一方，4.4 μM BA を含む培地では茎伸長子球が形成され，stage 2 で 8 で培養した場合は 25 で培養した場合に比べて茎伸長子球の割合が増加した．すなわち，前者の場合，子球の 63%が茎伸長し，後者の場合，子球の 12%のみが茎伸長した．第 3 図は，培養期間中の茎伸長子球の割合の変化を示す．4.4 μM BA を含む培地で培養し，stage 2 において 8 で温度処理した場合，茎伸長子球の割合は培養 91 日目から 120 日目までの間に急激に増加した（第 3 図）．stage 2 終了時から 30 日後に茎伸長した子球は，鱗片葉とともに底盤部を除去してから 4.4 μM BA を添加した修正 MSSA 培地（硝酸アンモニウムを含まない MSSA 培地）に移植して 25 ，連続照明下（20,000 lx，光子束密度 150 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ）で 90 日間培養（第 4 図 A）すると，花芽（第 4 図 B，C）または止め葉（第 4 図 D，E）を形成した．

BA および stage 2 の温度が子球の葉数に及ぼす影響

stage 2 の終了時から 30 日後（培養開始から 120 日後）の鱗片上に形成された子球の鱗片葉数は stage 2 の温度に，普通葉数は BA 濃度および stage 2 の温度に，累積葉数（鱗片葉数+普通葉数）は BA 濃度にそれぞれ影響された（第 4 表）．4.4 μM BA を含む培地で培養した子球は，0.044 μM BA を含む培地で培養した子球よりも多くの葉を分化した．4.4 μM BA を含む培地で培養した場合，stage 2 で 25 で温度処理するとほとんどの葉が鱗片葉となり子球底盤部に着生し，一方，8 で温度処理すると伸長した茎に普通葉が着生した．0.044 μM BA で培養した場合，stage 2 の温度に関わらず，すべての葉が鱗片葉となり子球底盤部に着生した．

BA および stage 2 の温度が茎頂の直径に及ぼす影響

stage 2 の終了時（培養開始から 90 日後）の子球の茎頂の直径は BA および

第 3 表 N⁶-Benzyladenine (BA) と stage 2 の温度が鱗片から生じた子球の累積数，茎伸長子球の累積数とその割合(%) に及ぼす影響^z

BA (μ M)	stage 2 の 温度 ()	(A) 子球の累積数 / 鱗片	(B) 茎伸長子球の累積数 / 鱗片	茎伸長子球の 割合 (%) ^x
0.044	25	2.0 \pm 0.1 ^y	0.0 \pm 0.0	0 \pm 0
	8	2.0 \pm 0.2	0.0 \pm 0.0	0 \pm 0
4.4	25	3.5 \pm 0.6	0.4 \pm 0.2	12 \pm 6
	8	2.6 \pm 0.3	1.5 \pm 0.2	63 \pm 8

有意差

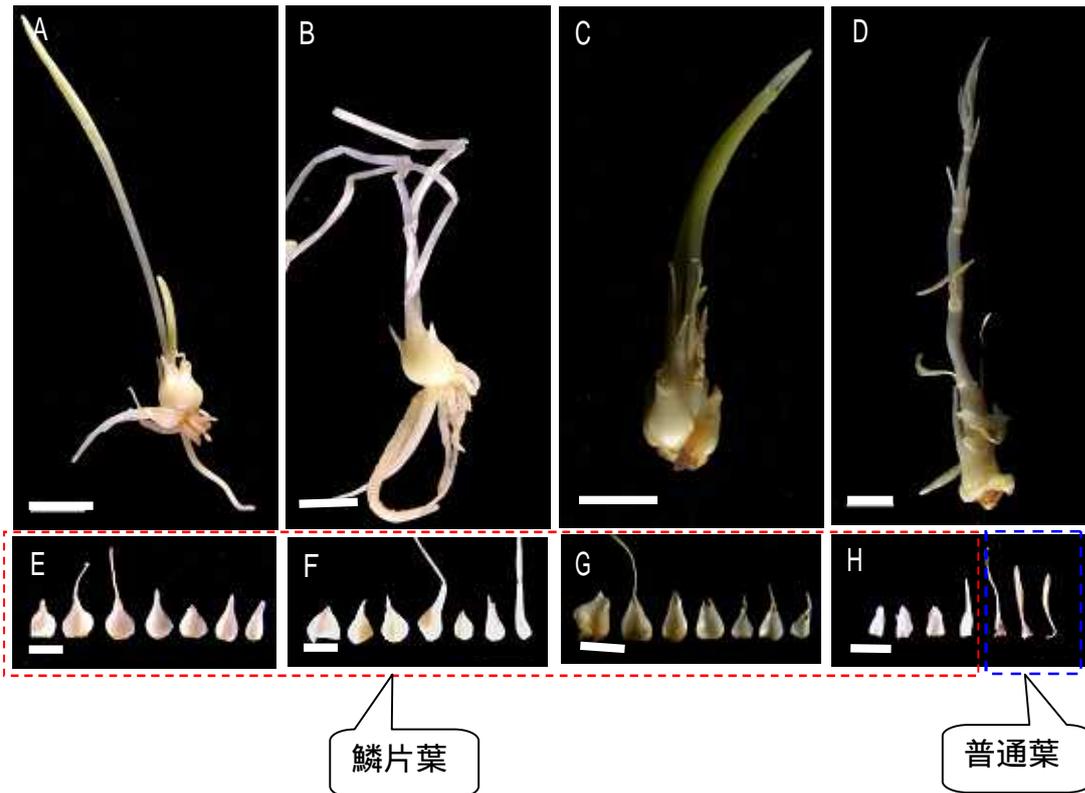
BA の濃度(a)	*	**	**
stage 2 の温度 (t)	NS	**	**
a \times t	NS	**	**

^{**}, ^{*}, それぞれ有意水準 $P \leq 0.01$ または $P \leq 0.05$ で有意差あり; NS, 有意差なし

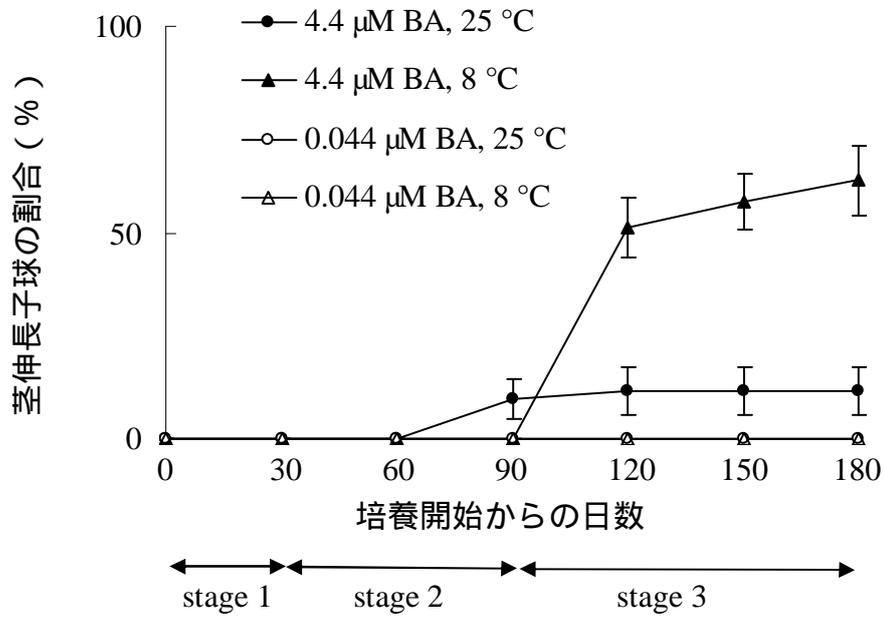
^z データは stage 3 の終了時(培養開始から 180 日目)に計測した

^x 茎伸長子球の割合 (%) = (B/A) \times 100

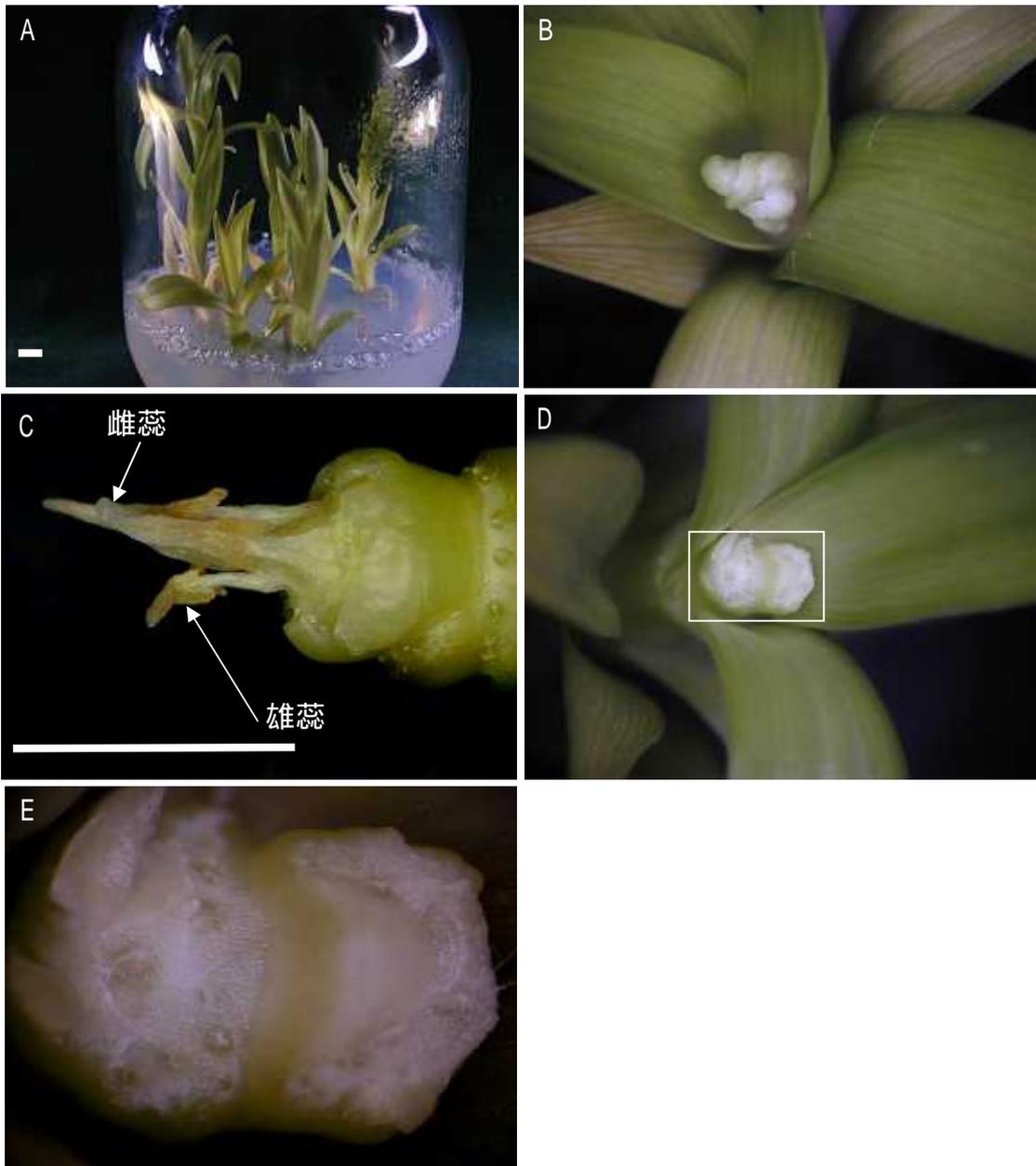
^y 数値は, 平均値 \pm 標準誤差 (n=6) を示す



第2図 stage 3 の 30 日目（培養開始から 120 日後）の鱗片上に形成された子球と子球に着生した鱗片葉および普通葉の形態．0.044 μM BA (A, B) または 4.4 μM BA (C, D) を含む培地で培養し，stage 2 において 25 $^{\circ}\text{C}$ (A, C) または 8 $^{\circ}\text{C}$ (B, D) で温度処理した鱗片上に形成された子球．E, F, G, H は，それぞれ A, B, C, D の子球に着生した鱗片葉または普通葉．バーの長さは 10 mm を示す．



第3図 茎伸長子球の割合 (%) の変化．鱗片は，0.044 または 4.4 μM BA を含む培地で培養し，stage 2 において 25 または 8 で温度処理．バーは標準誤差を示す (n=6) ．



第4図 *in vitro*で茎伸長したシンテッポウユリ‘ホワイト阿賀’の子球の花芽または止め葉の形成．4.4 μM BA, 8区において stage 2 終了時から30日後に茎伸長した子球を, 連続照明下でさらに90日間培養(A). その結果, 茎頂に形成された花芽(B, C) および止め葉を形成して生長を停止した茎頂部(D, E). Eは, Dの四角形で囲まれた部分の拡大写真．バーの長さは5 mmを示す．

第4表 N⁶-Benzyladenine (BA) とstage 2の温度が子球の鱗片葉数，普通葉数および累積葉数（鱗片葉数 + 普通葉数）に及ぼす影響^z

BA (μ M)	stage 2 の温度 ()	鱗片葉数 / 子球	普通葉数 / 子球	累積葉数 / 子球
0.044	25	10.7 \pm 1.2 ^y	0.0 \pm 0.0	10.7 \pm 1.2
	8	10.3 \pm 0.5	0.0 \pm 0.0	10.3 \pm 0.5
4.4	25	16.7 \pm 0.3	1.2 \pm 0.9	17.9 \pm 0.6
	8	6.4 \pm 0.6	10.1 \pm 2.9	16.5 \pm 2.5
有意差				
BA濃度 (a)		NS	**	**
stage 2の培養温度(t)		**	*	NS
a \times t		**	*	NS

** , * , $P \leq 0.01$ または $P \leq 0.05$ で有意差あり； NS , 有意差なし

^z データはstage 2終了時から30日後（培養開始から120日後）に計測した

^y 数値は平均値 \pm 標準誤差 (n = 3) を示す

stage 2 の温度に影響され，4.4 μM BA を含む培地で培養し，stage 2 において 8 で温度処理した子球の茎頂は他の条件下のそれに比べて著しく増大した（第 5 表）。

BA および stage 2 の温度が茎頂の前形成層の配列と柔細胞の形態に及ぼす影響
stage 2 の終了時の子球の茎頂の茎原基における前形成層の配列および柔細胞の形状に差がみられた（第 5 図 A-E）。正方形の柔細胞（第 5 図 E）は，4.4 μM BA を含む培地で培養し，stage 2 において 8 で温度処理した子球の茎原基の縦断切片（第 5 図 D）で観察されたが，他の条件下の子球ではほとんど観察されなかった（第 5 図 A-C）。正方形の細胞は，stage 2 終了時から 30 日目の子球の伸長中の節間で縦方向へ伸長していた（第 5 図 F）。一方，前形成層は，stage 2 の温度に関わらず，0.044 μM BA を含む培地ではさまざまな方向に配列し（第 5 図 A, B），4.4 μM BA を含む培地では茎の軸に平行に規則的に配列した（第 5 図 C, D）。

stage 2 の温度が茎頂の茎の柔細胞の微小管およびセルロース微繊維の配向に及ぼす影響

4.4 μM BA を含む培地で培養した場合，子球の茎頂の茎の柔細胞における stage 2 終了時の微小管の配向と stage 2 終了時から 10 日後のセルロース微繊維の配向は，stage 2 の温度に影響された（第 6 図 A-D，第 7 図 A, B）。stage 2 において 8 で温度処理した子球の茎の柔細胞では，茎の軸に対して横方向に配向した微小管が観察された（第 6 図 B, D）。一方，stage 2 において 25 で温度処理した場合にはそのように配向した微小管はほとんど観察されなかった（第 6 図 A, C）。8 で温度処理した子球の茎の柔細胞では，茎の軸に対して横方向に配向したセルロース微繊維の結晶が観察された（第 7 図 B）。一方，25 で温度処理した子球ではそのように配向したセルロース微繊維はほとんど観察されず，デンプン粒が多く形成された（第 7 図 A）。

考察

4.4 μM BA を含む培地では茎伸長子球と茎伸長しなかった子球が観察され，stage 2 において 8 低温で温度処理すると，25 で温度処理した場合に比べて茎伸長子球の割合が増加した（第 3 表）。0.044 μM BA を含む培地では stage 2 の温度に関わらず茎伸長子球は得られなかった。茎伸長子球は，連続照明下（20,000 lx）で培養すると，花芽を形成した（第 4 図）。これらの結果は，シントポウユリ *in vitro* 子球の幼若相から花熟相への移行には，好適な濃度の

第5表 stage 2終了時の鱗片上に発達した子球の茎頂の直径^z

N ⁶ -Benzyladenine(BA) (μ M)	stage 2 の温度()	茎頂の直径 (μ m)
0.044	25	182.1 \pm 31.4 ^y
	8	174.7 \pm 12.0
4.4	25	228.8 \pm 48.3
	8	416.5 \pm 32.5

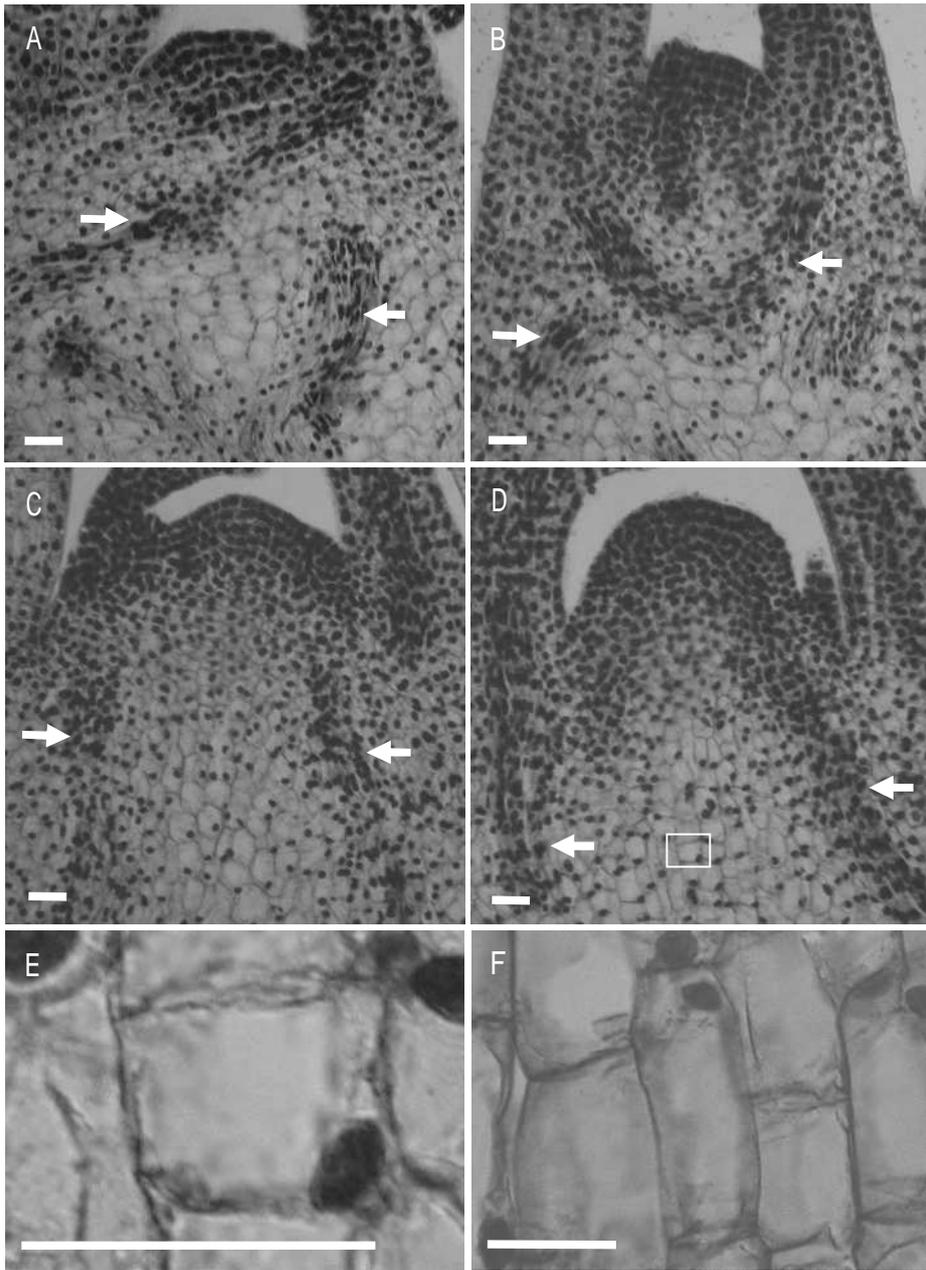
有意差

BA濃度 (a)	**
stage 2の温度 (t)	*
a \times t	*

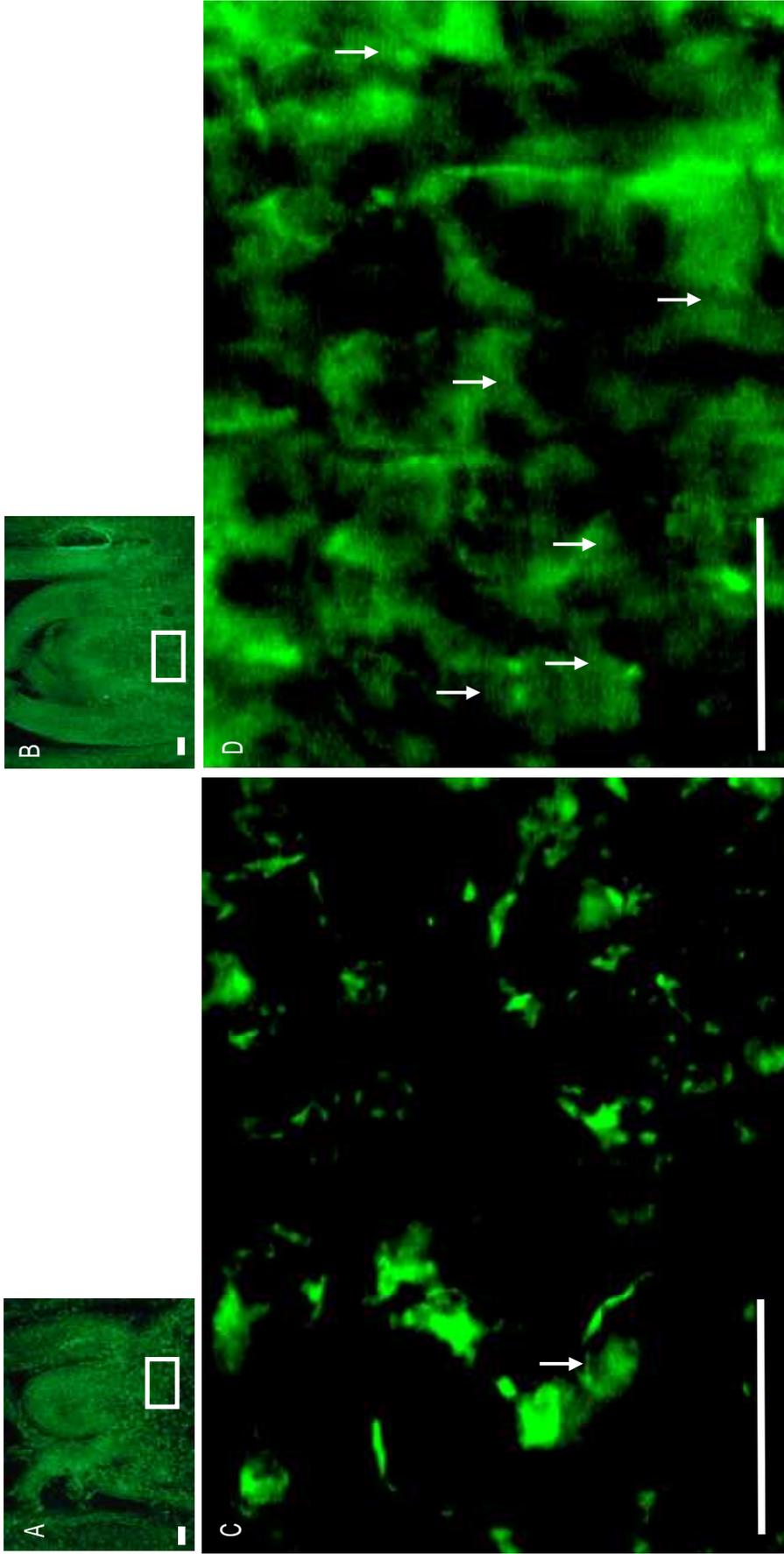
** , * , それぞれ有意水準 $P \leq 0.01$ または $P \leq 0.05$ で有意差あり

^z 0.044または4.4 μ M BAを含む培地で培養し , stage 2において25または8 (第1表および第1図参照)で温度処理した

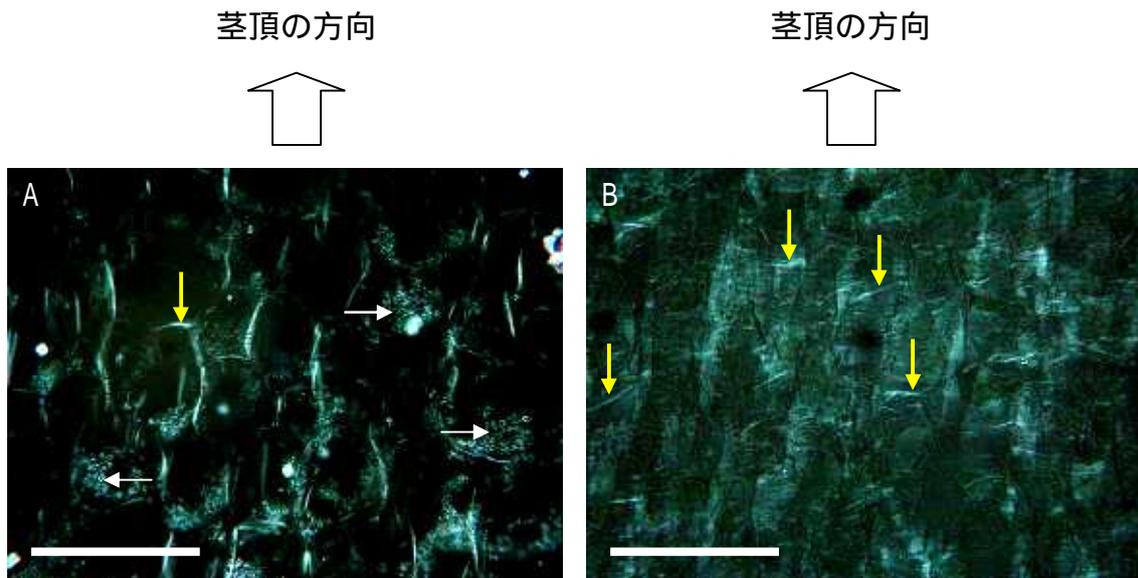
^y 数値は平均値 \pm 標準誤差(n=5)を示す



第 5 図 0.044 または 4.4 μM BA を含む培地で培養し，stage 2 において 25 または 8 $^{\circ}\text{C}$ で温度処理した子球の縦断切片（第 1 表および第 1 図参照）．0.044 μM BA を含む培地で培養して 25 $^{\circ}\text{C}$ （A）または 8 $^{\circ}\text{C}$ （B）で温度処理，または 4.4 μM BA を含む培地で培養して 25 $^{\circ}\text{C}$ （C）または 8 $^{\circ}\text{C}$ （D）で温度処理した子球の stage 2 終了時の茎頂．E は D の四角形で囲まれた部分で観察された正方形の細胞．F は，4.4 μM BA を含む培地で培養して 8 $^{\circ}\text{C}$ で温度処理した子球の stage 2 終了時から 30 日後の伸長中の節間で観察された長方形の細胞．バーの長さは 50 μm を示す．矢印は前形成層を示す．



第6図 4.4 μM BA を含む培地で培養した子球の茎頂付近の茎の柔細胞の微細管の配向. stage 2 において 25 (A, C) または 8 (B, D) で温度処理した子球の stage 2 終了時の柔細胞で観察された微細管. 矢印は横方向に配向した微細管を示す. C および D は, それぞれ A および B の四角形で囲まれた部分の拡大写真. 矢印は横方向に配向した微細管を示す. バーの



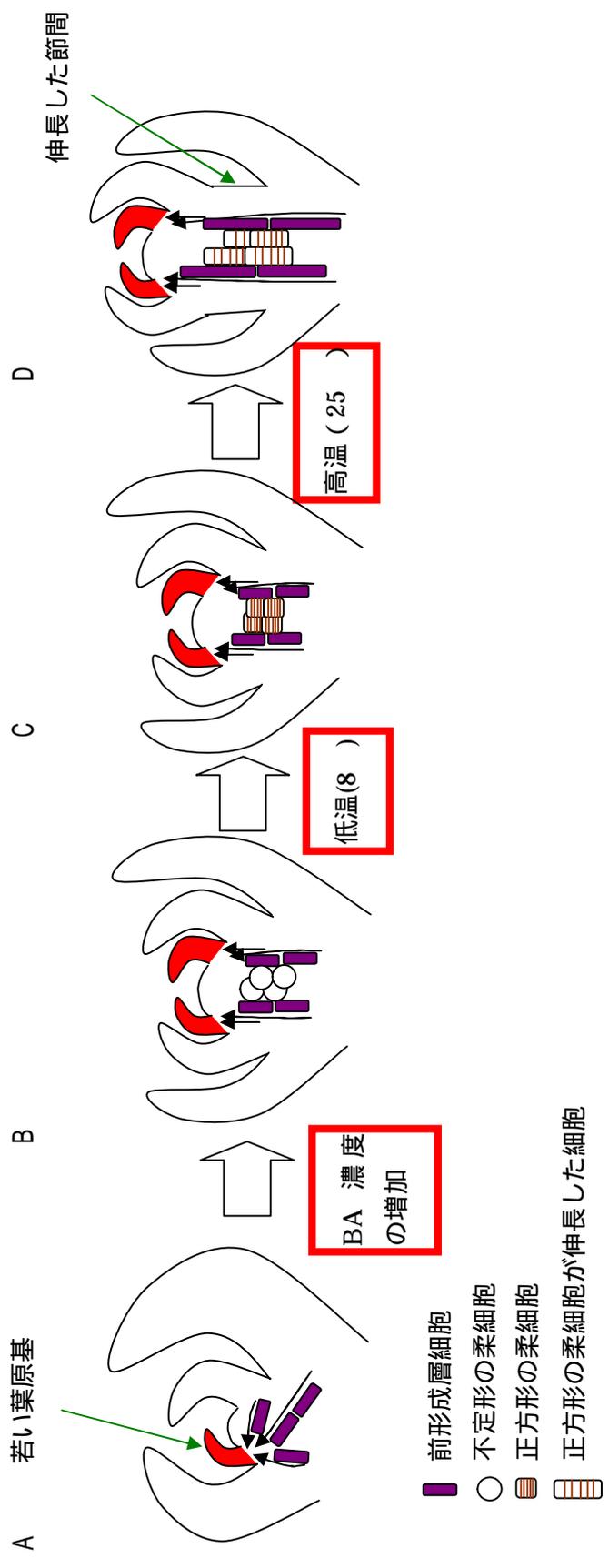
第7図 4.4 μM BA を含む培地で培養した子球の茎の柔細胞のセルロース微繊維の結晶の配向 . stage 2 において 25 (A) または 8 (B) で温度処理し , さらに stage 3 で 10 日間培養した子球の茎頂の先端から 500 から 1000 μm 下に位置する細胞の縦断切片 . A の写真の白い矢印はデンプン粒を示す . 黄色い矢印は横方向に配向したセルロース微繊維の結晶を示す . バーの長さは , 100 μm を示す .

BAが必要であること、さらに、以前報告された結果(Langens-Gerritsら, 2003)と同様に低温がユリ子球の幼若相から花熟相への移行を促すことを示している。

BA濃度の増加は、葉の形成(第4表)と茎の軸に平行な前形成層の配列(第5図A-D)を促し、BA濃度の増加と低温は子球の茎頂の直径を相乗的に増加させた(第5表)。内生サイトカニンレベルの増加はタバコの茎頂の細胞分裂を促す(Wernerら, 2001)ことから類推すると、高濃度のBA(4.4 μM)は葉原基発生の場である茎頂の周縁分裂組織(原, 1994)の細胞分裂活性を促し、その結果として、茎頂の直径および葉数の増加が引き起こされた可能性がある。一方、種子植物における前形成層の発生は葉原基の発生に影響され(Steeves・Sussex, 1972)、茎で発生した前形成層は葉原基へ向かって求頂的に発達する(原, 1994)ことから、BA濃度は葉分化への影響を介して前形成層の配列に影響したと推測される。すなわち、茎で発生した前形成層は、葉分化速度の遅い0.044 μM BAの子球では、茎頂で非対称に配置された若い葉原基に向かって発達して茎の軸と交差し(第8図A)、一方、葉分化速度の速い4.4 μM BAの子球では、茎頂でほぼ対称に配置された若い葉原基へ向かって発達して茎の軸にほぼ平行になった(第8図B)と考えられる。

8 低温は、4.4 μM BAを含む培地で培養した子球の茎における細胞の形態形成に影響し、柔細胞の微小管およびセルロース微繊維の横方向への配向(第6図B, D, 第7図B)と正方形の細胞の形成(第5図E)を促した。この正方形の細胞は茎節間の伸長に伴って縦方向に伸長して長方形の細胞となった(第5図F)。表層微小管およびセルロース微繊維の配向は植物細胞の形と伸長方向を決定し、表層微小管とセルロース微繊維が横方向に配向した細胞は横方向への伸長が抑制され縦方向へ伸長する特性をもつようになる(柴岡, 2003)。一方、サイトカニンは細胞の表層微小管の縦方向への配向を促して茎または胚軸の縦方向への伸長を抑制する(Shibaoka, 1994; 柴岡, 2003)。以上のことから、低温は、高濃度BA存在下で、茎の柔細胞の表層微小管およびセルロース微繊維の横方向への配向を促進することにより縦方向に伸長する特性をもった正方形の細胞の形成を促し、茎節間を構成する柔細胞の斉一的な縦方向への伸長、すなわち茎伸長を可能にしたのかもしれない。

今回の研究の結論として、BA濃度の増加は子球の茎頂の細胞分裂、葉分化および茎の軸に平行な前形成層の発達を促し(第8図A, B)、その後、低温は茎の柔細胞の表層微小管およびセルロース微繊維の横方向への配向を促す(第8図C, D)ことで茎伸長を促進したと考えられる。



第8図 BA と温度が茎頂の若い葉原基の配置と茎の発達に及ぼす影響についての模式図．0.044 μM BA (A) または 4.4 μM BA (B-D) を含む培地で培養した子球の縦断面．黒矢印は前形成層の発達の方向，正方形の細胞の茶線はセルロース微繊維を示す．茎の形態変化を促す要因は赤い枠で囲んだ．

摘要

子球の幼若相から花熟相への移行は茎伸長によって識別した。シンテッポウユリ‘ホワイト阿賀’の子球から剥がした鱗片を 0.044 または 4.4 μM N^6 -Benzyladenine(BA)を含む MS 培地に置床して暗黒下で 180 日間培養した。培養期間を、stage 1 (0 から 30 日目)、stage 2 (31 から 90 日目)、stage 3 (91 から 180 日目)の 3 つに区分した。鱗片は、stage 1 で 25℃、stage 2 で 25℃ または 8℃ (温度処理)、stage 3 で 25℃ で培養した。

- 1) 4.4 μM BA を含む培地に鱗片を置床して培養し、stage 2 において 25℃ で温度処理した場合、茎伸長子球と茎伸長しなかった子球が生じた。stage 2 において 8℃ で温度処理すると、茎伸長子球の割合が増加した。一方、0.044 μM BA を含む培地で鱗片を培養した場合、stage 2 の温度に関わらず茎伸長子球は生じなかった。
- 2) 4.4 μM BA を含む培地で培養した場合、0.044 μM BA を含む培地で培養した場合に比べ、子球は多くの葉を生じた。stage 2 において 25℃ で温度処理した場合にはほとんどの葉が子球底盤部に着生し、8℃ で温度処理した場合には、伸長茎に普通葉が着生した。一方、0.044 μM BA を含む培地で子球を培養した場合、stage 2 の温度に関わらず、すべての葉が子球底盤部に着生した。
- 3) 4.4 μM BA を含む培地で培養し、stage 2 において 8℃ で温度処理すると、子球の茎頂の直径は他の条件下のそれに比べて大きく増大した。
- 4) 4.4 μM BA を含む培地で培養し、stage 2 において 8℃ で温度処理した場合、子球の茎原基の縦断切片では、正方形の柔細胞が観察されたが、他の条件下で培養した場合には、それがほとんど観察されなかった。これらの細胞は、伸長した茎節間で縦方向に伸長していた。
- 5) 4.4 μM BA を含む培地で培養した場合、子球の茎の前形成層はシュート軸に対して平行に規則的に配列した。一方、0.044 μM BA を含む培地で培養した場合にはさまざまな方向に配列した。
- 6) 4.4 μM BA を含む培地で培養し、stage 2 において 8℃ で温度処理すると、子球の茎の柔細胞の微小管およびセルロース微繊維が茎の軸に対して横方向に配向した。一方、stage 2 において 25℃ で温度処理した場合には、そのような配向はほとんど観察されなかった。

第2節 コルヒチンがシンテッポウユリ‘ホワイト阿賀’の *in vitro* 子球の 茎伸長に及ぼす影響

緒言

ユリの種類や子球の発達段階によっては低温が茎伸長に必須である (Langens-Gerrits ら, 2003). シンテッポウユリ‘ホワイト阿賀’の鱗片上に発達した子球においても同様のことが観察され, 低温に遭遇することにより茎を伸長し (第2章第1節; Ishimori・Niimi, 2003; Ishimori ら, 2007), これは低温が茎の柔細胞の表層微小管およびセルロース微繊維の横方向への配向を促したことにより起こったと考えられた. 細胞のセルロース微繊維の横方向への配向が細胞の縦方向への伸長を促すこと (柴岡, 2003), さらに, 微小管の配向と胚軸, 上胚軸または茎の伸長との間に関係があること (Sakiyama-Sogo・Shibaoka, 1994; Steen・Chadwick, 1981; Kaneta ら, 1993; Sakoda ら, 1992) が示されていることから, この推察は支持される. しかしながら, 低温がどのようなメカニズムで表層微小管およびセルロース微繊維の配向を制御するのかはほとんど明らかになっていない.

低温は微小管の重合を阻害し (Hepler・Palevitz, 1974), 脱重合を促進すること (Hogetsu, 1986; Kerr・Carter, 1990), セルロース微繊維の沈着場所は表層微小管の配向によって決定される (柴岡, 2003) ことから, 第2章第1節で観察された微小管およびセルロース微繊維の横方向への配向の促進は, 低温による微小管の重合阻害または脱重合促進が関係している可能性が高い.

そこで本節では, 微小管の重合を阻害し, 脱重合を促進するコルヒチン (Morejohn・Fosket, 1991) を培養中の子球に処理することにより茎伸長が起こるかどうかを調べ, 茎の柔細胞の表層微小管およびセルロース微繊維の横方向への配向と微小管の重合阻害または脱重合促進との間に一定の関係が見出されるかどうかを考察した.

材料および方法

(1) 低温処理とコルヒチン処理に用いた鱗片の準備

第2章第1節で述べたシンテッポウユリ‘ホワイト阿賀’の鱗茎から剥がした鱗片を材料として用い, 鱗片の殺菌および基本培地 (MSSA 培地) の作製と滅菌は第2章第1節に述べた方法に従った. 鱗片 (G-0 鱗片と呼ぶ) を, カミソリで 5 × 5 mm 断片に切断して 0.54 μM 1-Naphthaleneacetic acid (NAA) および 0.044 μM N⁶-Benzyladenine (BA) を添加した MSSA 培地に置床し, 25 °C 暗黒下で 8 から

12 週間培養して *in vitro* 子球 (G-1 子球と呼ぶ) を得た。この G-1 子球から剥がした鱗片 (G-1 鱗片と呼ぶ) は、同一培地条件でさらに 8 から 12 週間培養した。そして G-1 鱗片上に発達した 200 から 400mg の重さの子球 (G-2 子球と呼ぶ) から採取した鱗片 (G-2 鱗片と呼ぶ) を本実験で用いた。

(2) 各ステージにおける植物生長調節物質およびコルヒチンの濃度と温度

G-2 鱗片は 3 つの培養ステージ (stage 1, 2 および 3) で、暗黒下で 180 日間培養した。鱗片上に形成された子球は 30 日ごとに継代培養した。子球が鱗片葉と根を形成している場合、鱗片葉の上部と根は継代培養時に除去した。鱗片上に形成された子球は、以下に述べる方法で低温処理またはコルヒチン添加処理した。低温およびコルヒチン添加処理を行わない区を対照区として設けた。鱗片培養の方法の概略と各ステージで鱗片上に形成された子球の外観は第 9 図に示した。stage 1 では鱗片を 0.54 μM NAA と 4.4 または 44 μM BA を添加した MSSA 培地で 25℃ で 30 日間培養した。その後 stage 2 では、子球形成鱗片を、25℃ または 8℃ (低温) で培養、またはコルヒチン添加培地で 25℃ で培養した。対照区

- ・ stage 2 : 4.4 μM BA を含む MSSA 培地が入った三角フラスコに子球形成鱗片を 5 個ずつ置床して 25℃ で 30 日間培養。

- ・ stage 3 : 子球形成鱗片を stage 2 と同じ培地上で、25℃ で 120 日間培養。
低温処理

- ・ stage 2 : 4.4 μM BA を含む MSSA 培地が入った三角フラスコに子球形成鱗片を 5 個ずつ置床して 8℃ で 60 日間培養。

- ・ stage 3 : 子球形成鱗片を stage 2 と同じ培地上で、25℃ で 90 日間培養。
コルヒチン添加処理

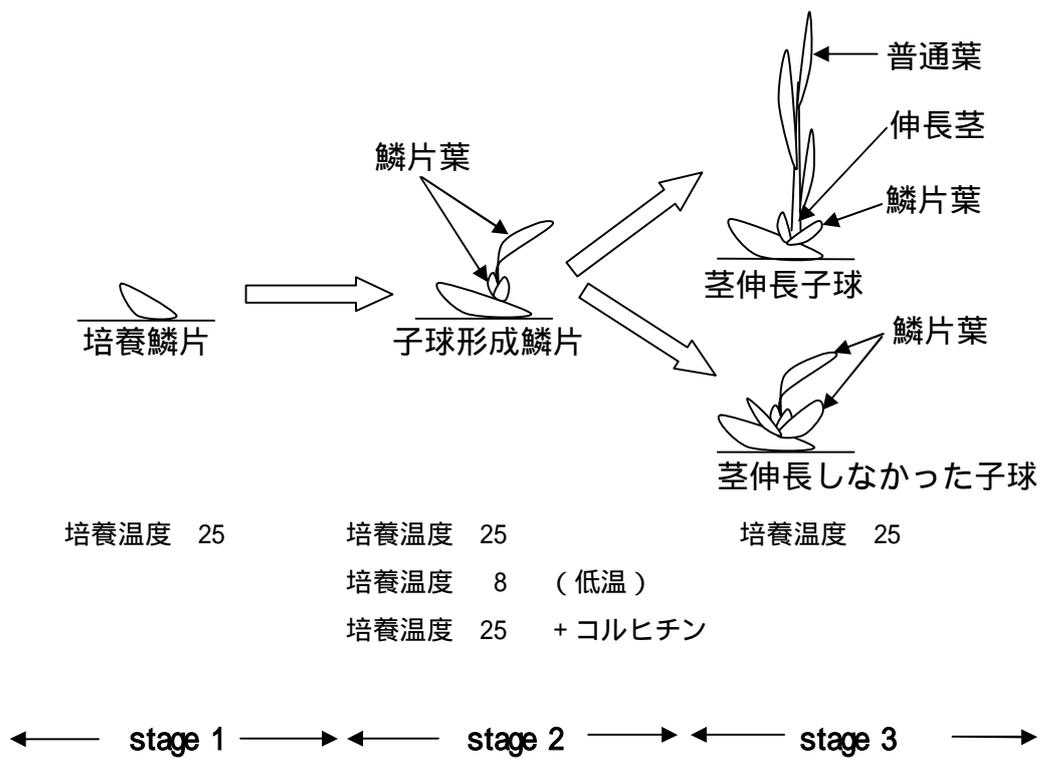
- ・ stage 2 : 4.4 μM BA および 1 または 10 μM コルヒチンを含む MSSA 培地が入った三角フラスコに子球形成鱗片を 5 個ずつ置床して 25℃ で 30 日間培養。

- ・ stage 3 : 子球形成鱗片を stage 2 と同じ培地上で、25℃ で 120 日間培養。
以上の培養条件については、第 6 表にまとめた。

鱗片から形成した子球の累積数は培養開始から 180 日後に、茎伸長子球の累積数は培養開始から 30 日ごとに計測した。データは、Sheffe の方法または Fisher の最小有意差法によって処理間で多重比較した。

結果

stage 1 で 4.4 μM BA を含む培地で培養した場合、培養終了時 (培養開始から 180 日後) までに鱗片上に形成した茎伸長子球の数および割合は、stage 2 にお



第9図 鱗片培養の方法の概略とそれぞれのステージにおける子球の外観。各ステージの培養条件の詳細は第6表を参照。

第 6 表 対照区，低温およびコルヒチン添加処理区における各ステージの培養期間，温度および培地に加えた 1-Naphthaleneacetic acid(NAA)，N⁶-Benzyladenine(BA)およびコルヒチンの濃度

処理区	ステージ	培養 日数	温度 ()	NAA (μM)	BA (μM)	コルヒチン (μM)
対照区	stage 1	30	25	0.54	4.4	0
	stage 2	30	25	0.54	44	0
	stage 3	120	25	0	4.4	0
低温処理区	stage 1	30	25	0.54	4.4	0
	stage 2	60	8	0	4.4	0
	stage 3	90	25	0	4.4	0
コルヒチン添加処理区	stage 1	30	25	0.54	4.4	0
	stage 2	30	25	0.54	44	0
	stage 3	120	25	0	4.4	10
					4.4	0

いて 25 で培養した対照区に比べて、8 で培養した低温処理区で増加した。一方、コルヒチン添加培地での培養（コルヒチン添加処理）は茎伸長子球の数および割合を増加させる効果はなかった（第 7 表）。

stage 1 で 44 μM BA を含む培地で培養した場合、鱗片から形成された子球の累積数は、コルヒチン無添加、25 の対照区と比較して、8 低温処理区および 1 μM コルヒチン添加処理区で減少した。一方、茎伸長子球数は 1 μM コルヒチン添加処理により増加した（第 8 表）。茎伸長子球の割合は、低温処理および 1 または 10 μM コルヒチン添加処理によって増加し、低温処理区で最大となった（第 8 表）。低温処理区では、茎伸長子球の割合は培養 90 日目（低温処理終了時）から培養 120 日目までの間に急激に増加した（第 10 図）。一方、1 または 10 μM コルヒチン添加処理区では、茎伸長子球の割合は、培養 60 日目から、すなわちコルヒチン添加培地から無添加培地に移植してから、培養 150 日目または 180 日目にかけて緩やかに増加した（第 10 図）。1 μM コルヒチン添加培地で培養した子球のうち処理後に茎伸長した子球の外部形態は、低温処理後に茎伸長した子球のそれと比べてほとんど違いがなかった（第 11 図）。

考察

stage 1 で 44 μM BA を含む培地で培養した場合、30 日間のコルヒチン添加培地での培養による処理は低温処理と同じように子球からの茎伸長を促進した（第 8 表、第 10、11 図）。コルヒチンが微小管の重合を阻害して脱重合を促す（Morejohn・Fosket, 1991）ことから、本結果は、微小管の重合阻害または脱重合促進とユリ子球の茎伸長との間に一定の関係があることを証明したといえる。さらに、本結果は、低温が茎の柔細胞の表層微小管およびセルロース微繊維の横方向への配向を促進する（第 2 章第 1 節）メカニズムに微小管の重合阻害または脱重合促進が関わっている可能性を支持する。

stage 1 で 4.4 μM BA を含む培地で培養した場合、低温処理は子球からの茎伸長を促進したが、44 μM BA を含む培地で培養した場合（第 8 表）とは異なり、コルヒチン処理はそれを促進しなかった（第 7 表）。ジャガイモの塊茎の内生サイトカイニンレベルは、温度に影響され、3 の低温に遭遇すると増加する（Suttle・Banowitz, 2000）ことから、本結果においても低温処理した子球では内生サイトカイニン濃度が増加したことが考えられ、低温処理子球では stage 1 で添加した BA 濃度の違いが茎伸長に影響することはなかったが、コルヒチン処理のみの子球では stage 1 で添加した BA 濃度の違いがそのまま茎伸長に影響した可能性がある。

チューリップやユリなどの球根植物の茎伸長は低温によって促進される。こ

第7表 stage 1 で 4.4 μM BA を含む培地で培養した鱗片から生じた子球の累積数，茎伸長子球の累積数およびその割合(%)に及ぼす低温処理またはコルヒチン添加処理の影響^z

処理	stage 2 の 温度 ()	stage 2 のコル ヒチン濃度 (μM)	(A)子球の累積数 / 鱗片	(B)茎伸長子球 の累積数 / 鱗片	茎伸長子球 の割合 (%) ^y
対照区	25	0	2.5 \pm 0.5 ^a	0.1 \pm 0.1a	4.9 \pm 3.1a
低温処理	8	0	2.4 \pm 0.5a	1.3 \pm 0.2b	58.0 \pm 5.6b
1 μM コルヒチン添加処理	25	1	3.0 \pm 0.4a	0.3 \pm 0.0ab	11.8 \pm 3.5ab
10 μM コルヒチン添加処理	25	10	3.4 \pm 0.6a	0.4 \pm 0.2ab	17.0 \pm 9.6ab

同じ列の異なるアルファベット間では Sheffe の方法で $P \leq 0.01$ で有意差あり

^z データは stage 3 終了時 (培養開始から 180 日後) に計測した

^y 茎伸長子球の割合 (%) = $B/A \times 100$

^x 数値は平均値 \pm 標準誤差 (n=6) を示す

第 8 表 stage 1 で 44 μM BA を含む培地で培養した鱗片から生じた子球の累積数 茎伸長子球の累積数およびその割合(%) に及ぼす低温処理およびコルヒチン添加処理の影響^z

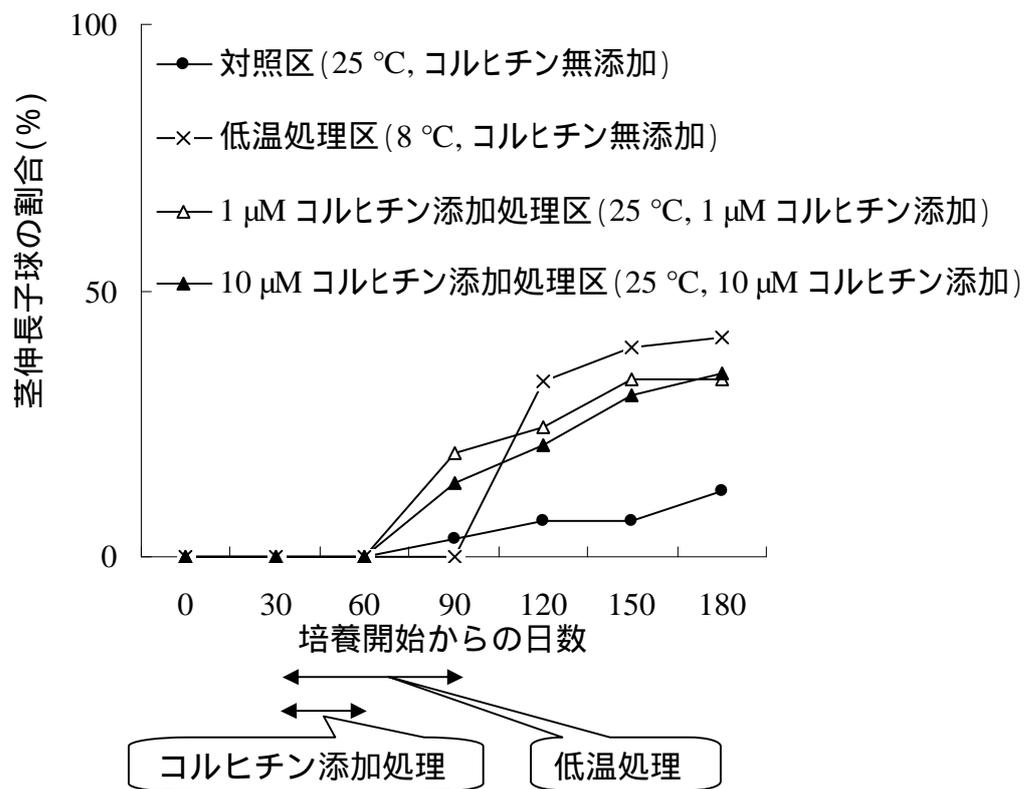
処理	stage 2 の 温度 ()	stage 2 の ヒチン濃度 (μM)	stage 2 のコル ヒチン / 鱗片	(A)子球の累積数 の累積数 / 鱗片	(B) 茎伸長子球 の累積数 / 鱗片	茎伸長子球 の割合 (%) ^y
対照区	25	0		5.3 \pm 0.7 ^a	0.6 \pm 0.2a	12.5 \pm 4.2a
低温処理	8	0		3.2 \pm 0.3b	1.3 \pm 0.1ab	41.2 \pm 3.8b
1 μM コルヒチン添加処理	25	1		4.6 \pm 0.3ab	1.6 \pm 0.4b	33.2 \pm 6.5b
10 μM コルヒチン添加処理	25	10		3.6 \pm 0.6b	1.1 \pm 0.2ab	34.3 \pm 7.5b

同じ列の異なるアルファベット間では Fisher の最小有意差法で $P \leq 0.05$ で有意差あり

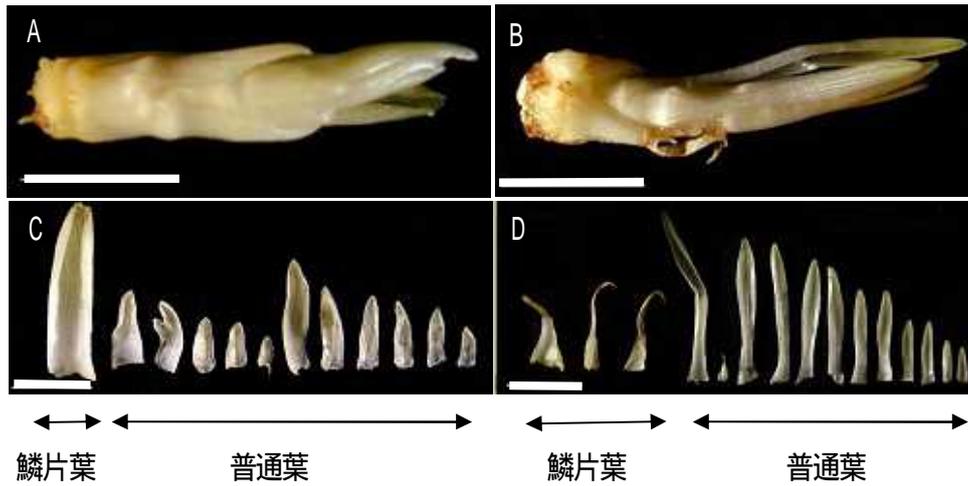
^z データは stage 3 終了時 (培養開始から 180 日後) に計測した

^y 茎伸長子球の割合 (%) = $B/A \times 100$

^x 数値は平均値 \pm 標準誤差 (n=6) を示す



第10図 培養中の茎伸長子球の割合(%)の変化.鱗片は,stage 1で44 μM BAを含む培地で培養.図中の括弧内に各処理区の培養条件を示した.



第 11 図 培養開始から 120 日後の鱗片上に発達した子球とその鱗片葉および普通葉の形態 . stage 1 で 44 μM BA を含む培地で培養した鱗片上で発達し , stage 2 で低温処理した後に茎伸長した子球 (A) とその鱗片葉および普通葉 (C) , stage 2 で 1 μM コルヒチンで処理した後に茎伸長した子球 (B) とその鱗片葉および普通葉 (D) . バーの長さは 10 mm を示す .

れについては従来から休眠打破として捉えられ、低温処理と植物ホルモンや貯蔵糖の動向との関係で論じられてきた (Kamenetsky ら, 2003; Rebers ら, 1995; Takayama ら, 1993; 新美ら, 1988) が、本結果は、低温処理と微小管の重合阻害または脱重合促進との関係についても検討する必要があることを示している。従って、低温が (1) 植物ホルモンや貯蔵糖の動向と (2) 微小管の重合および脱重合に及ぼす影響を調査し、(1) および (2) と表層微小管およびセルロース微繊維の横方向への配向との関連性について研究することにより低温処理と球根植物の茎伸長との関係が明らかになる可能性がある。

摘要

シンテッポウユリ ‘ホワイト阿賀’ の子球から剥がした鱗片を MS 培地に置床して暗黒下で 180 日間培養し、コルヒチン添加処理または低温処理した。コルヒチン添加処理および低温処理を行わない区を対照区として設けた。培養期間を、対照区およびコルヒチン添加処理区では、stage 1 (0 から 30 日目)、stage 2 (31 から 60 日目) および stage 3 (61 から 180 日目)、低温処理区では、stage 1 (0 から 30 日目)、stage 2 (31 から 90 日目) および stage 3 (91 から 180 日目) に区分した。対照区に用いた鱗片は、stage 1 では 4.4 または 44 μM N^6 -Benzyladenine (BA)、stage 2 および stage 3 では 4.4 μM BA を含む培地に置床して 25℃ で培養した。コルヒチン添加処理に用いた鱗片は、対照区と同じ濃度の BA を含む培地に置床して 25℃ で培養し、stage 2 では BA と共に 1 または 10 μM コルヒチンを添加した培地で培養した。低温処理に用いた鱗片は対照区と同じ濃度の BA を含む培地に置床して stage 1 で 25℃、stage 2 で 8℃、stage 3 で 25℃ で培養した。

1) stage 1 において 44 μM BA を含む培地で培養後、鱗片上に形成した子球は、低温処理またはコルヒチン (1 または 10 μM) 添加処理すると、対照区の子球と比べて高頻度で伸長茎を生じた。1 μM コルヒチン添加処理後に茎伸長した子球と低温処理後に茎伸長した子球の外部形態はほとんど同じであった。

第3節 数種類のユリの子球の幼若相期間に及ぼす N⁶-Benzyladenine の影響

緒言

テッポウユリでは、茎伸長および伸長した茎からの上根（吸収根）の発生が球根成長を促進する（松尾，1986）。これには普通葉による光合成の促進と上根による土壌からの養分吸収の促進が関連していると考えられ、球根養成栽培において鱗茎からできるだけ早く茎伸長を生起させることは市場価値のある十分な大きさのユリ球根を生産するために重要な課題であるといえる。一方、ユリ子球の幼若相から花熟相への移行は茎伸長の生起によって特徴付けられ（Langens-Gerritsら，2003）、花芽形成は茎節間の伸長が開始した後に起こる（清水，1971）ことから、茎伸長を早めることは切花生産や育種を行う上でも有益である。以前の研究で、シンテッポウユリ‘ホワイト阿賀’の鱗片上に発達した子球は、4.4 または 44 μM N⁶-Benzyladenine(BA)を含む培地で 25℃ で一定期間培養した後 8℃ 低温下で培養すると高頻度で茎伸長することが明らかとなった（第2章第1節および第2節；Ishimori・Niimi，2003；Ishimori・Niimi，2005；Ishimoriら，2007）。以上の理由から BA の添加と低温処理が子球の茎形成・伸長に及ぼす影響を他のユリで調べることは興味ある課題であるといえよう。

そこで本節では、BA の添加と低温処理によりロンギフロラム・ハイブリッドのシンテッポウユリ‘ホワイト阿賀’と同様なことが他の種類のユリでも起こるかどうかを、オリエンタル・ハイブリッドの‘アカプルコ’および‘カサブランカ’、アジアティック・ハイブリッドの‘コネチカットキング’、原種のアカカノコユリおよびヒメサユリを用いて調査した。

材料と方法

(1) 培養に用いた鱗片の準備

新潟大学農学部の実験圃場で栽培した‘アカプルコ’、‘カサブランカ’、‘コネチカットキング’、アカカノコユリおよびヒメサユリの鱗茎から剥がした鱗片を材料として用い、鱗片の殺菌および基本培地（MSSA 培地）の作製と滅菌は、第2章第1節に述べた方法に従って行った。鱗片は、約 1cm² の断片に切断して 0.54 μM 1-Naphthaleneacetic acid(NAA)および 0.044 μM BA を添加した MSSA 培地に置床し、25℃ 暗黒下で 6 ヶ月間培養した。この鱗片上に形成された子球（G-1 子球と呼ぶ）から鱗片（G-1 鱗片と呼ぶ）を分離し、さらに 6 ヶ月間培養した。この方法により得られた 200 から 1000 mg の子球（G-2 子球と呼ぶ）の鱗片

(G-2 鱗片と呼ぶ) を本実験に用いた。

(2) 各ステージにおける植物生長調節物質と温度

G-2 鱗片は以下に述べる方法に従って全期間，暗黒下で培養した。培養期間は 3 ステージ (stage 1, 2 および 3) に区分した。各ステージの期間の設定はユリの種類によって異なるため，第 9 表にまとめて示した。

・ stage 1 : 0.54 μM NAA と 44 μM BA を含む MSSA 培地を 30 ml 入れた 100 ml 三角フラスコに 10 個のユリ鱗片を置床し，25℃ で培養。

・ stage 2 : 子球を形成した鱗片 (子球形成鱗片) を 4.4 μM BA を含む MSSA 培地を含有するフラスコに 5 個ずつ置床して 8℃ (低温処理) で培養。

・ stage 3 : 子球形成鱗片を stage 2 と同じ組成の培地で，25℃ で培養。

鱗片は，stage 1 および stage 2 の終了時に継代培養し，同時に，発達した鱗片葉の上部および根を除去した。鱗片から形成された茎伸長子球の累積数は培養開始から 30 日ごとに stage 3 終了時まで計測した。

結果

stage 1 において 44 μM BA を含む培地で 25℃ で培養した後，stage 2 において 4.4 μM BA を含む培地で 8℃ で一定期間培養すると，本実験に用いたすべての種類のユリの鱗片から茎伸長子球が生じ，stage 3 の終了時までには鱗片あたり 0.17 から 0.96 個の茎伸長子球が生じた (第 9 表)。「アカプルコ」および「カサブランカ」の子球は，90 日目から 120 日目にかけて，アカカノコユリ，「コネチカットキング」およびヒメサユリの子球は，120 日目から 150 日目にかけて急激に伸長茎を生じ始めた (第 12 図)。特に，ヒメサユリ鱗片から形成された茎伸長子球数は，stage 1 の期間，すなわち 44 μM BA を含む培地で 25℃ 培養する期間を 30 日間から 60 日間に延長し，stage 2 の期間，すなわち 4.4 μM BA を含む培地で 8℃ で培養する期間を 120 日間から 90 日間に短縮することにより増加した (第 9 表，第 12 図 E, F)。

考察

44 μM BA を含む培地で 25℃ で培養した後 4.4 μM BA を含む培地で 8℃ で一定期間培養すると，本実験に用いたアジアティック・ハイブリッド，オリエンタル・ハイブリッドおよび原種のユリの鱗片上に子球が形成され，培養 90 日目から 150 日目までの間に茎伸長を始めた (第 12 図)。タカサゴユリやシンテツポウユリを除く多くのユリの実生は，自然条件下で生長した場合，幼若相から

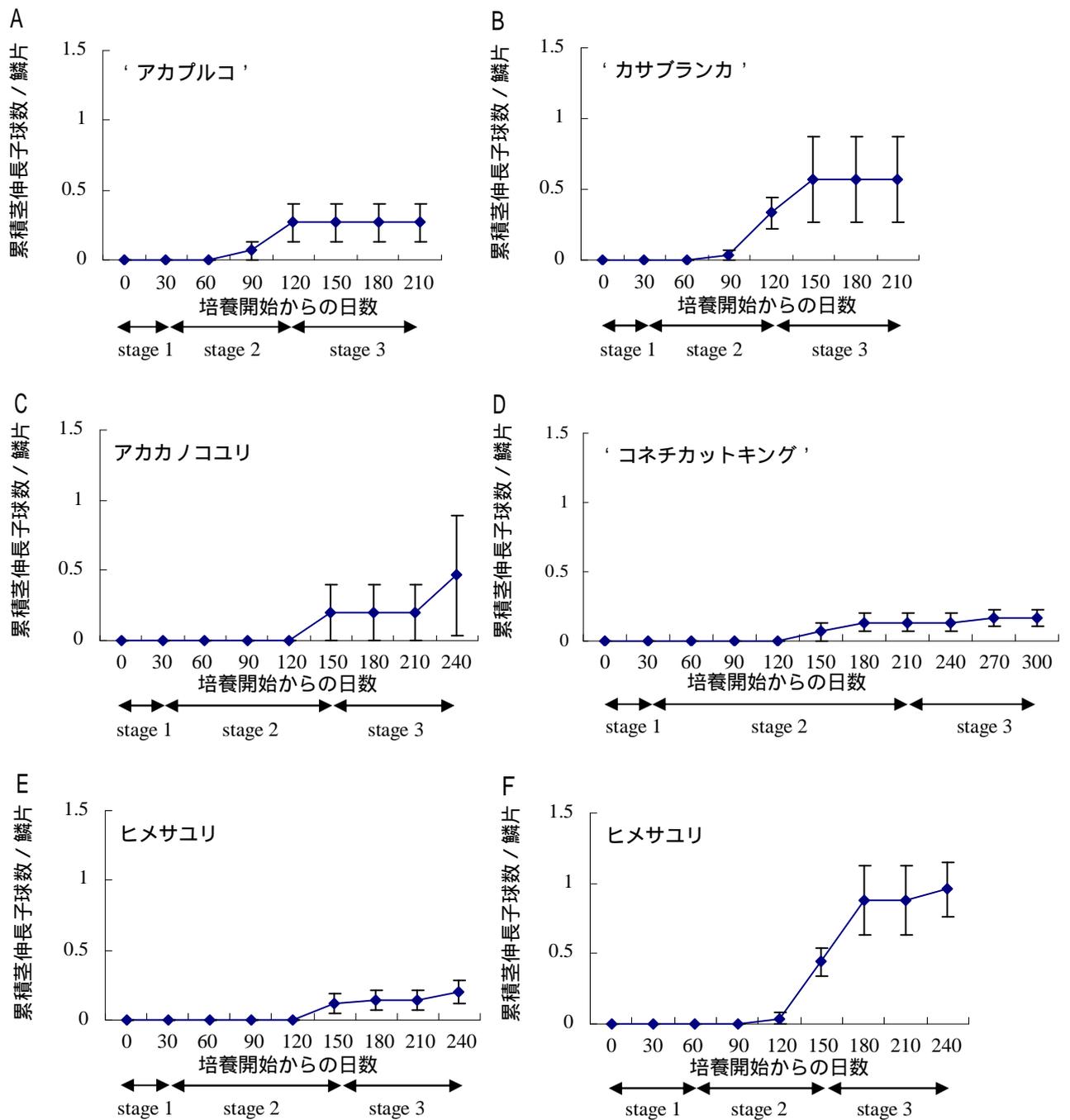
第9表 オリエンタル・ハイブリッド(OH), アジアティック・ハイブリッド(AH)または原種に分類されるユリの鱗片上に形成された茎伸長子球の累積数^z

園芸 分類	品種	各 stage の期間 (日)			茎伸長子球 の累積数 / 鱗片	反復回数 ^y
		stage 1	stage 2	stage 3		
OH	‘アカブルコ’	30	90	90	0.27 ± 0.13 ^x	3
OH	‘カサブランカ’	30	90	90	0.57 ± 0.30	6
AH	‘コネチカットキング’	30	180	90	0.17 ± 0.06	6
原種	アカカノコユリ	30	120	90	0.47 ± 0.43	6
原種	ヒメサユリ	30	120	90	0.20 ± 0.08	10
原種	ヒメサユリ	60	90	90	0.96 ± 0.19	5

^z データは stage 3 終了時に計測した

^y 1 反復 5 個の子球形成鱗片 (材料と方法参照) を培養

^x 数値は平均値 ± 標準誤差を示す



第12図 'アカプルコ'(A)、'カサブランカ'(B)、アカカノコユリ(C)、'コネチカットキング'(D)およびヒメサユリ(E, F)の鱗片上に形成された茎伸長子球の累積数の変化。鱗片の培養条件は第9表に示した。バーは標準誤差を示す。

花熟相へ移行するまでに 1 年より長い期間を要する（清水，1971）ことから，本実験において所定濃度の BA を含む培地で培養して 8 週で一定期間低温処理したユリ子球の幼若相期間は，自然条件下で生長した子球のそれに比べて短くなったと考えることができよう．さらに，この結果は，BA が，シンテツポウユリ‘ホワイト阿賀’の茎形成・伸長に及ぼした効果（第 2 章第 1 節および第 2 節；Ishimori・Niimi 2003；Ishimori・Niimi 2005；Ishimori ら，2007）と同様の効果を他のユリでももつことを部分的に示唆している．

240 日間培養したヒメサユリの鱗片から形成された茎伸長子球数は，stage 1 の期間を 30 日間から 60 日間に延長し，stage 2 の期間を 120 日間から 90 日間に短縮することにより増加した（第 9 表，第 12 図 E，F）．この結果は，子球が茎伸長するためには，低温に遭遇する前に 25℃ で一定以上生長する必要があることを示唆している．Langens-Gerrits ら（2003）は，一定以上の重さに達しない子球は低温に遭遇してもほとんど茎伸長しないと報告しており，本実験結果はこの結果と矛盾しない．従って，ユリ子球の幼若相は前半期と後半期に分けることができ，低温は，後半期に達した子球でのみ相転換を促すことができるのかもしれない．この点を明らかにするためには，25℃ の培養期間と 8 週の低温培養期間を様々に設定し，第 2 章第 1 節の方法と結果を参考にして，低温で培養中の子球の内部形態の変化や表層微小管およびセルロース微繊維の配向の変化と子球の生長との関係を調べることが必要であろう．

以上のことから，圃場での球根養成栽培において子球からの茎伸長を促進するためには，以前から重要視されている鱗片葉の形成・発達を促すことによる光合成の促進に加えて，(1)植物のサイトカイニンの主要な合成場所である根（Letham・Palni，1983）の形成・発達の促進および(2)低温に遭遇する前の生長期間の確保が必要であるといえよう．

摘要

ユリ子球から剥がした鱗片を MS 培地に置床して全培養期間，暗黒下で培養した．培養期間を，stage 1，stage 2，stage 3 の 3 つに区分した．鱗片は，stage 1 で 44 μM N⁶-Benzyladenine(BA) を含む培地に置床して 25℃ で培養した後，4.4 μM BA を含む培地に移して，stage 2 で 8 週，stage 3 において 25℃ で培養した．オリエンタル・ハイブリッドユリの‘アカプルコ’および‘カサブランカ’では，0 から 30 日目までを stage 1，31 から 120 日目までを stage 2，121 から 210 日目までを stage 3 とした．アジアティック・ハイブリッドユリの‘コネチカットキング’では，0 から 30 日目までを stage 1，31 から 210 日目までを stage 2，211 から 300 日目までを stage 3 とした．アカカノコユリで

は、0 から 30 日目までを stage 1 , 31 から 150 日目までを stage 2 , 151 から 240 日目までを stage 3 とした . ヒメサユリでは , 0 から 30 日目までを stage 1 , 31 から 150 日目までを stage 2 , 151 から 240 日目までを stage 3 , または 0 から 60 日目までを stage 1 , 61 から 150 日目までを stage 2 , 151 から 240 日目までを stage 3 とした .

1) 鱗片上に形成した子球は , ‘アカプルコ’ および ‘カサブランカ’ では , 培養 90 日目から 120 日目にかけて , ‘コネチカットキング’ , アカカノコユリおよびヒメサユリでは , 培養 120 日目から 150 日目にかけて急激に伸長茎を生じ始めた . これらのユリでは , stage 3 終了時までには鱗片あたり 0.17 から 0.96 個の茎伸長子球が生じた .

2) ヒメサユリでは , stage 1 で 30 日間鱗片を培養した場合に比べ , 60 日間培養した場合に茎伸長子球が高頻度で生じた .

第3章 *in vitro* ユリ子球の花芽形成に影響する要因

第1節 N⁶-Benzyladenine と温度がヒメサユリ *in vitro* 子球の幼若相期間と花芽形成に及ぼす影響および子球の発達と花芽形成との関係

緒言

ヒメサユリは発芽してから最初に開花するまでに4から5年を要する(清水, 1971)。ヒメサユリの実生や鱗片繁殖子球が開花までに長期間を要するのは幼若相の期間が長いためであり, この期間の短縮は育種, 栽培上の重要な課題となっている。シンテツポウユリ‘ホワイト阿賀’では N⁶-Benzyladenine(BA)と低温処理が培養鱗片上に発達した子球の茎形成と伸長に影響し(第2章第1節; Ishimori・Niimi, 2003; Ishimoriら, 2007), この2つの要因は, ヒメサユリや他の数種類のユリの子球の幼若相期間にも影響する可能性が示された(第2章第3節)。そこで本節では, 幼若相が最も長いユリの1つであるヒメサユリの培養鱗片上に形成された子球を使い, BA と温度が子球の幼若相期間やこの相の完了後に起こる花芽形成に及ぼす影響について調査した。

ユリの花芽分化は, 茎が伸長した後に起こり(清水, 1971), 伸長していない子球では起こらない。しかし, 茎伸長の生起と花芽形成との関係の背景にあるメカニズムは分かっていない。そこで, ヒメサユリの鱗片上で発達して茎伸長した子球と茎伸長しなかった子球との間, 花芽形成した茎伸長子球と花芽形成しなかった茎伸長子球との間で形態を比較し, 茎発達と花芽形成との関係について考察した。

材料および方法

培養に用いた鱗片の準備

月田農園から購入した開花球根を新潟大学農学部実験圃場でプランターを用いて栽培し, その鱗茎から剥がした鱗片を材料として用いた。鱗片の殺菌および基本培地(MSSA培地)の作製と滅菌は第2章第1節に述べた方法に従った。鱗片を, 約1cm²の断片に切って0.54 μM 1-Naphthaleneacetic acid(NAA)および0.044 μM BAを添加したMSSA培地に置床し, 25℃暗黒下で6ヶ月間培養して*in vitro*子球を得た(G-1子球と呼ぶ)。G-1子球から剥がした鱗片(G-1鱗片と呼ぶ)をさらに同じ組成の培地で1年間培養して得られた200から1000 mgの*in vitro*子球(G-2子球と呼ぶ)の鱗片(G-2鱗片と呼ぶ)を実験に用いた。

実験 1 N^6 -Benzyladenine と温度が *in vitro* 子球の幼若相期間と花芽形成に及ぼす影響

各ステージにおける植物生長調節物質と温度

G-2 鱗片は以下に述べる方法で 300 日間、暗黒下で培養した。培養期間は、3 ステージ (stage 1, 2 および 3) に区分した。それぞれのステージの期間、温度および培地に添加した植物生長調節物質は第 10 表に示した。

・ stage 1 : 0.54 μM NAA と 0.044 または 4.4 μM BA を含む MSSA 培地を 30 ml 入れた 100 ml 三角フラスコに 10 個の鱗片を置床し、25℃ で 60 日間培養。

・ stage 2 : stage 1 と同一濃度の BA を含む MSSA 培地を含有するフラスコに子球を形成した鱗片 (子球形成鱗片) を 5 個ずつ置床して 25℃ または 8℃ (温度処理) で 150 日間培養。

・ stage 3 : 子球形成鱗片を stage 2 と同じ培地上で、20℃ で 90 日間培養。

鱗片は、培養開始から 60 日後および 210 日後に継代培養した。継代培養時に子球から発達した鱗片葉の上部と根は除去した。鱗片から形成した子球、茎伸長子球および花芽形成子球の累積数、子球の鱗片葉および普通葉の数は、stage 3 終了時 (培養開始から 300 日後) に計測した。本研究における鱗片葉と普通葉の定義については、第 2 章第 1 節の材料および方法 (2) で述べた。なお、花被を形成した子球を花芽形成子球とした。データは 2 元配置分散分析法によって統計分析した。

実験 2 *in vitro* 子球の発達と花芽形成との関係

各ステージにおける植物生長調節物質と温度

G-2 子球から剥がした鱗片は暗黒下で 300 日間培養した。培養期間は、3 つのステージ (stage 1, 2 および 3) に区分した。

・ stage 1 : 0.54 μM NAA と 44 μM BA を含む MSSA 培地を 30 ml 入れた 100 ml 三角フラスコに 10 個の鱗片を置床し、25℃ で 60 日間培養。

・ stage 2 : 4.4 μM BA を含む MSSA 培地を含有するフラスコに子球を形成した鱗片 (子球形成鱗片) を 5 個ずつ置床して 8℃ (低温処理) で 150 日間培養。

・ stage 3 : 子球形成鱗片を stage 2 と同じ組成の培地で 20℃ で 90 日間培養。

鱗片は、培養開始から 60 日後および 210 日後に継代培養した。継代培養時に子球から発達した鱗片葉の上部と根は除去した。鱗片から形成し、茎伸長した子球、茎伸長しなかった子球、および花芽形成した子球の数、子球の茎の長さおよび直径と鱗片葉および普通葉の数を stage 3 終了時 (培養開始から 300 日後) に計測した。花被を形成した子球を花芽形成子球として数えた。

第 10 表 各ステージの培養期間，温度および培地に添加した 1-Naphthaleneacetic acid(NAA)および N⁶-Benzyladenine(BA)の濃度

ステージ	培養 日数	温度 ()	NAA (μ M)	BA (μ M)
stage 1	60	25	0.54	0.044
			0.54	4.4
stage 2	150	25	0	0.044
			0	4.4
		8	0	0.044
			0	4.4
stage 3	90	20	0	0.044
			0	4.4

茎頂の組織学的観察

stage 2 終了時（培養開始から 210 日後）に茎伸長した子球と茎伸長しなかった子球をそれぞれ 5 個ずつ鱗片から分離し，第 2 章第 1 節の材料と方法(4)と同じ方法で，茎頂の組織切片を作製した．切片は，デラフィールド・ヘマトキシリンで染色して明視野顕微鏡下で観察した．

結果

実験 1 N⁶-Benzyladenine と温度が *in vitro* 子球の幼若相期間と花芽形成に及ぼす影響

BA 濃度および stage 2 の温度は，鱗片から形成した茎伸長子球および花芽形成子球の割合に影響した（第 11 表）．0.044 μM BA を含む培地で培養した場合，子球はほとんど茎伸長せず，stage 2 において 25℃ で温度処理した子球の 5% が茎伸長したのみであった．一方，4.4 μM BA を含む培地では，0.044 μM BA を含む培地に比べて多くの子球が茎伸長し，stage 2 において 25℃ で温度処理した場合，子球の 61% が茎伸長した．stage 2 において 8℃ で温度処理すると茎伸長子球の割合は 28% に減少した．4.4 μM BA，8℃ 区で茎伸長した子球のみが花芽を形成し，他の条件下の子球は花芽を形成しなかった．多くの花芽はほとんど発達せずに枯死し，一部の花芽は大きく発達したが奇形であった（第 13 図）．

BA 濃度と stage 2 の温度（25℃，8℃）は子球あたりの鱗片葉数，普通葉数および累積葉数（鱗片葉数 + 普通葉数）に影響した（第 12 表）．4.4 μM BA を含む培地で培養し，stage 2 において 25℃ で温度処理した場合，子球は鱗片葉および普通葉を最も多く形成した（第 12 表）．stage 2 において 8℃ で温度処理すると累積葉数は減少した．4.4 μM BA を含む培地の子球は 0.044 μM BA を含む培地の子球と比べて多くの葉を形成した．

実験 2 ヒメサユリ *in vitro* 子球の発達と花芽形成との関係

茎伸長した子球と茎伸長しなかった子球の形態的違い

30 個の鱗片から 70 個の子球が生じ，培養終了時（培養開始から 300 日後）までに 19 個（27%）が茎伸長し，51 個（73%）は茎伸長しなかった（第 13-a 表）．茎伸長しなかった子球は全く花芽形成せず，一方，茎伸長した子球の 53% が花芽を形成した（第 13-a 表）．多くの花芽はほとんど発達せずに枯死したが，一部の花芽は大きく発達した（第 14 図 A，B）．茎伸長子球のうち花芽を形成しなかった子球の中には止め葉を形成したものもあった（第 14 図 C）．茎伸長子球は，茎伸長しなかった子球と比べて鱗片葉数が少なく，普通葉を多く形成したが，両者の間で累積葉数に有意な差はなかった（第 13-b 表）．一方，低温処理終了時

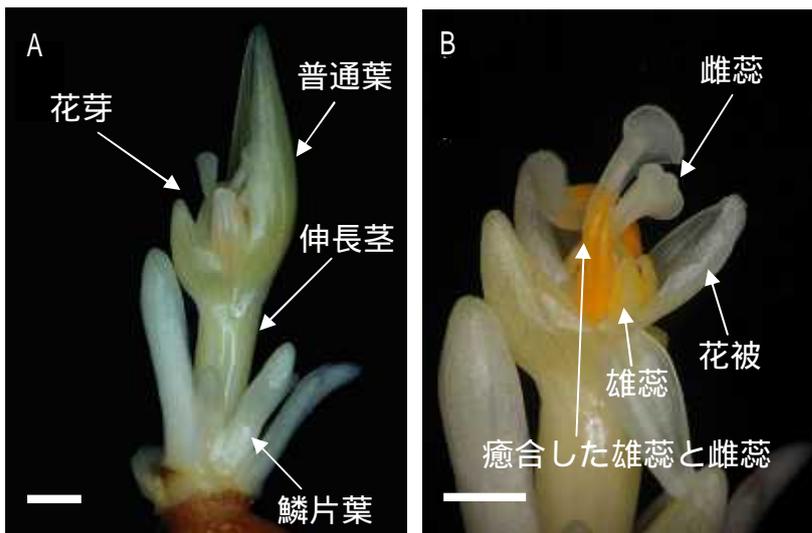
第11表 N⁶-Benzyladenine (BA)とstage 2の温度が、鱗片から生じた子球、茎伸長子球の累積数および花芽形成子球の累積数と割合(%)に及ぼす影響^z

BA (μM)	stage 2の温度(°C)	(A)子球数 / 鱗片	(B)茎伸長子球数 / 鱗片	茎伸長子球の割合 (B/A × 100)	(C)花芽形成子球数 / 鱗片	花芽形成子球の割合 (%) (C/A × 100)
0.044	25	2.7 ± 0.7 ^y	0.1 ± 0.1	5 ± 5	0.0 ± 0.0	0 ± 0
	8	2.8 ± 0.2	0.0 ± 0.0	0 ± 0	0.0 ± 0.0	0 ± 0
4.4	25	1.9 ± 0.1	1.2 ± 0.2	61 ± 12	0.0 ± 0.0	0 ± 0
	8	2.8 ± 0.7	0.9 ± 0.5	28 ± 10	0.8 ± 0.4	24 ± 9
有意差						
BA濃度(a)		NS	**	**	NS	*
stage 2の温度(t)		NS	NS	*	NS	*
a × t		NS	NS	NS	NS	NS

** , P ≤ 0.01 で , * , P ≤ 0.05 で有意差あり ; NS , 有意差なし

^z データはstage 3終了時(培養開始から300日後)に計測した

^y 数値は平均値 ± 標準誤差 (n = 4)を示す



第 13 図 stage 3 の 30 日目(鱗片培養開始から 240 日後)
 の子球で形成された花芽 . 花芽の外観 (A) と花器官の形
 態 (B) . バーの長さは , 1 mm を示す .

第12表 N⁶-Benzyladenine (BA)とstage 2の温度が子球の鱗片葉数, 普通葉数および累積葉数(鱗片葉数 + 普通葉数)に及ぼす影響^z

BA (μ M)	stage 2 の温度()	鱗片葉数 / 子球	普通葉数 / 子球	累積葉数 / 子球
0.044	25	9.2 \pm 0.2 ^y	0.2 \pm 0.2	9.4 \pm 0.3
	8	8.5 \pm 0.6	0.0 \pm 0.0	8.5 \pm 0.6
4.4	25	14.5 \pm 0.7	9.7 \pm 1.9	24.2 \pm 1.2
	8	10.4 \pm 0.9	2.5 \pm 0.8	13.0 \pm 0.8
有意差				
BA濃度 (a)		**	**	**
stage 2の温度(t)		**	**	**
a \times t		*	**	**

** , P \leq 0.01で , * , P \leq 0.05で有意差あり

^z データはstage 3終了時(培養開始から300日後)に計測した

^y 数値は平均値 \pm 標準誤差 (n = 4)を示す

第13-a表 30個の鱗片（6フラスコ）から生じて茎伸長した子球（BES）と茎伸長しなかった子球（BNES）の数，およびBESとBNESのうち花芽形成した子球の数および割合（%）^z

子球の分類	(A) 子球の数	(B) 花芽形成子球の数	花芽形成子球の割合(%) ^y
BES	19	10	53
BNES	51	0	0

^z データはstage 3終了時（培養開始から300日後）に計測した

^y 花芽形成子球の割合 = (B/A) × 100

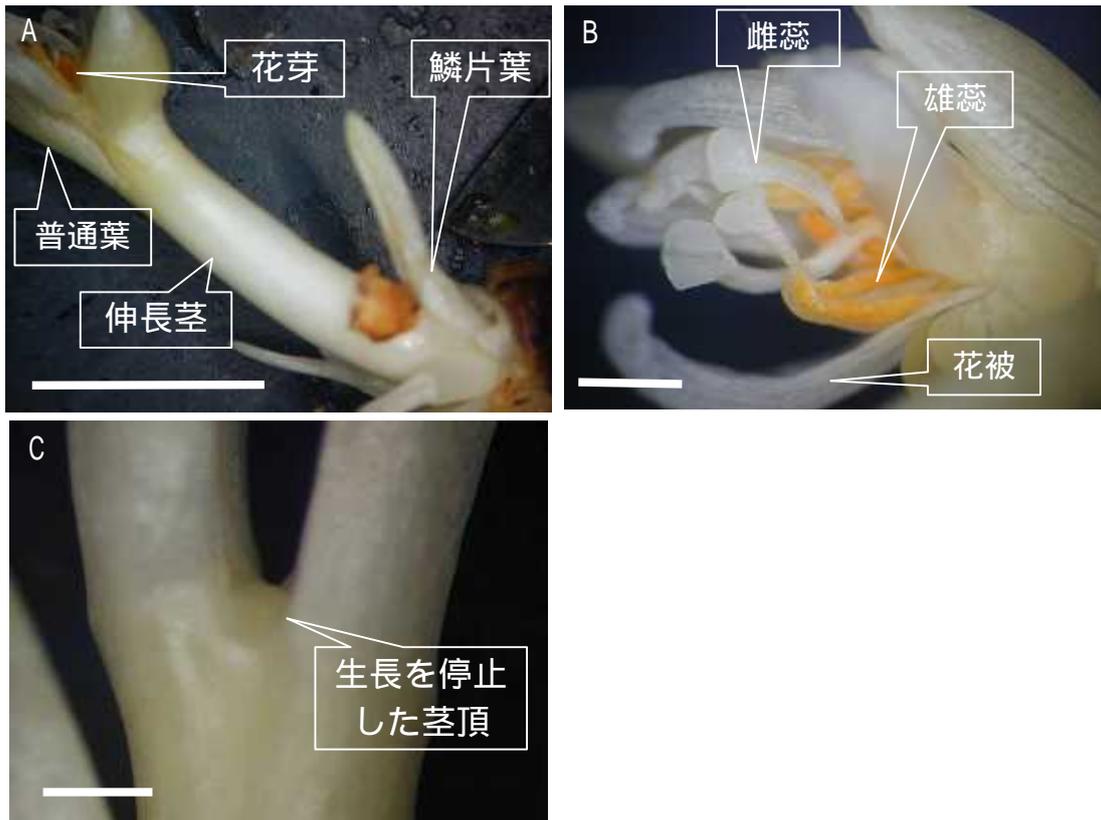
第13-b表 茎伸長した子球（BES）および茎伸長しなかった子球（BNES）の鱗片葉数，普通葉数および累積葉数（鱗片葉数 + 普通葉数）^z

子球の分類	調査子球数	鱗片葉数 / 子球	普通葉数 / 子球	累積葉数 / 子球
BES	19	7.6 ± 0.6 ^y b	9.2 ± 0.4b	16.7 ± 0.7a
BNES	51	15.2 ± 0.7a	0.0 ± 0.0a	15.7 ± 0.7a

同じ列の異なるアルファベットは，2標本T-検定でP≤0.01で有意差があることを示す

^z データはstage 3終了時（培養開始から300日後）に計測した

^y 数値は平均値 ± 標準誤差を示す



第 14 図 stage 3 の開始から 30 日後（培養開始から 240 日後）の鱗片上に発達した茎伸長子球．花芽形成した子球（A）と花器官の形態（B）および止め葉を形成した子球の茎頂部（C）．バーの長さは，10 mm（A），1 mm（B，C）を示す．

(培養開始から 210 日目)までに茎伸長した子球と茎伸長しなかった子球の茎頂および茎の形態を比較すると,前者の子球では,茎の柔細胞のセルロース微繊維の結晶が茎の軸に対して横方向に偏って配向し(第 15 図 D, F),後者の子球に比べて茎頂の表層と髄状分裂組織の細胞が活発に分裂していた(第 15 図 A, B).一方,後者の子球では,茎の柔細胞のセルロース微繊維の結晶が縦方向に偏って配向していた(第 15 図 C, E).

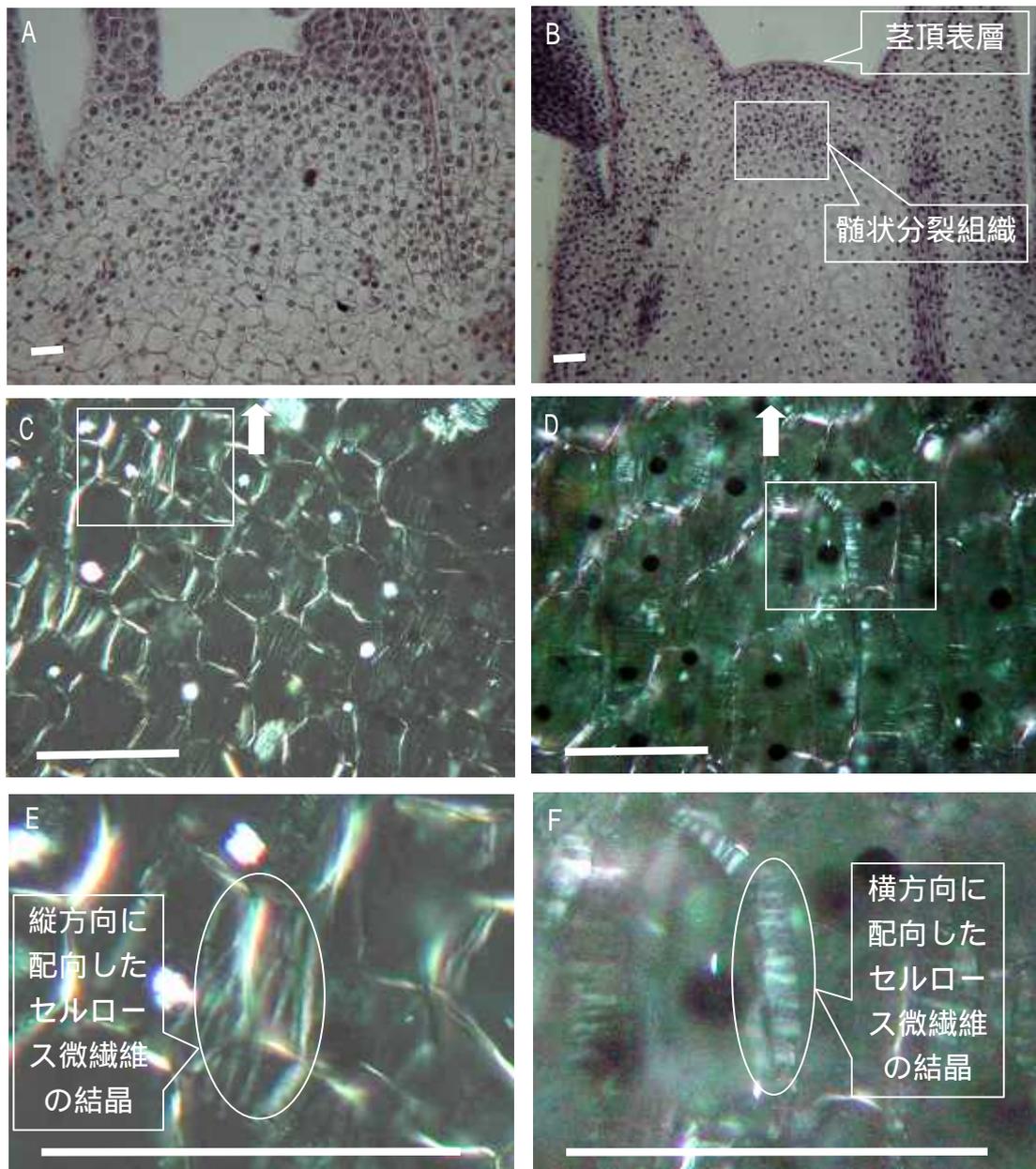
花芽形成した茎伸長子球と花芽形成しなかった茎伸長子球との形態的違い

花芽形成した茎伸長子球と花芽形成しなかった茎伸長子球との間で,茎の長さ,鱗片葉数,普通葉数,累積葉数(鱗片葉数+普通葉数)について統計的に有意な差はなかったが,茎の直径は前者の子球で大きかった(第 14 表).

考察

BA 濃度の増加はヒメサユリ子球の葉形成および茎伸長を促進し,低温(8)はそれらを抑制した(第 11, 12 表).この結果は,ヒメサユリ子球の幼若相から花熟相への移行,すなわち幼若相の完了は BA 濃度の増加によって促進されることを示しており,シンテツポウユリでの結果(第 2 章第 1 節; Ishimori・Niimi, 2003; Ishimori ら, 2007)と一致した.一方で,低温は幼若相の完了を遅延させることを示し,この点は,シンテツポウユリでの結果(第 2 章第 1 節および第 2 節; Ishimori・Niimi, 2003; Ishimori・Niimi, 2005; Ishimori ら, 2007)と異なっていた.葉分化速度は植物発育相の移行と関係しており(Atherton ら, 1998),シンテツポウユリ子球では BA 濃度が葉分化速度への影響を介して茎の前形成層の配列と茎伸長に影響すると考えられる(第 2 章第 1 節)ことから,低温(8)によるヒメサユリ子球の茎伸長の抑制(第 11 表)は葉分化速度の低下(第 12 表)と関連していると思われる.

stage 2 において 25 で温度処理した子球は花芽を形成せず,8 低温で温度処理した子球のみが花芽を形成した(第 11 表).このことはヒメサユリが花芽形成に低温を必要とする春化型のユリであることを示唆している.自然条件下で生育したヒメサユリでは,娘球が鱗茎の内部で 4 月ごろに形成し始め(新美, 1995),同じ年の 8 または 9 月ごろに花芽形成を開始する(清水, 1971; 新美・小田, 1988; 大川, 1989)ことから,ヒメサユリの花成は,冬の低温による春化を必要とせずに自律的に起こると考えられてきた.従って,今回の結果はこの考えと矛盾する.この矛盾を説明するために,2つの可能性が考えられる.1つ目として,ヒメサユリの娘球の形成時期は肉眼で子球を観察することによって調査したものであるため正確ではなく,同じユリ科のチューリップでは娘球



第 15 図 鱗片上に発達した子球の stage 2 終了時（培養開始から 210 日後）の茎頂部の縦断面（A-D）. 茎伸長しなかった子球の茎頂（A）と茎の柔細胞のセルロース微繊維の結晶の配向（C）, および茎伸長した子球の茎頂（B）と茎の柔細胞のセルロース微繊維の結晶の配向（D）. C, D は茎頂先端部から約 500 μm 下に位置する茎の柔細胞の写真で，写真中の矢印は茎の軸に平行で茎頂の方向を示す . E および F は，それぞれ C および D の四角で囲まれた部分の拡大図 . バーの長さは，100 μm を示す .

第14表 茎伸長子球 (BES) のうち、花芽形成した子球 (BES-形成) と花芽形成しなかった子球 (BES-未形成) の発達比較^z

子球の分類	調査子球数	茎の長さ (mm)	茎の直径 (mm)	鱗片葉数 / 子球	普通葉数 / 子球	累積葉数 ^y / 子球
BES-形成	9	8.8 ± 0.9 ^a	2.9 ± 0.2a	7.2 ± 0.9a	9.6 ± 0.6a	16.8 ± 0.8a
BES-未形成	9	9.5 ± 0.3a	2.1 ± 0.1b	8.2 ± 0.9a	9.1 ± 0.5a	17.3 ± 1.2a

同じ列の異なるアルファベットは、2標本T-検定で $P \leq 0.01$ の水準で有意差があることを示す

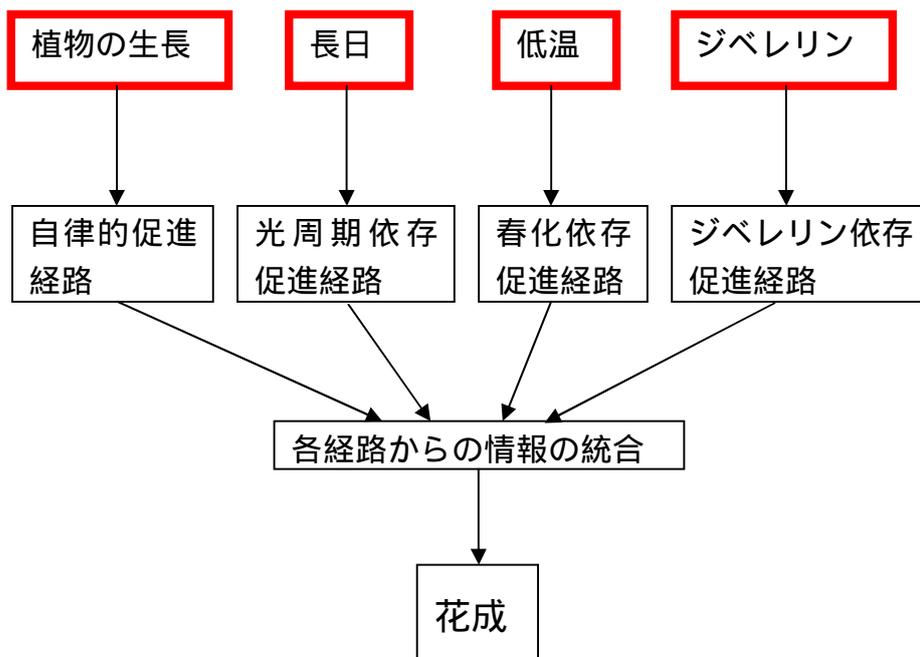
^z データは培養終了時 (培養300日後) に計測した

^y 累積葉数 = 鱗片葉数 + 普通葉数

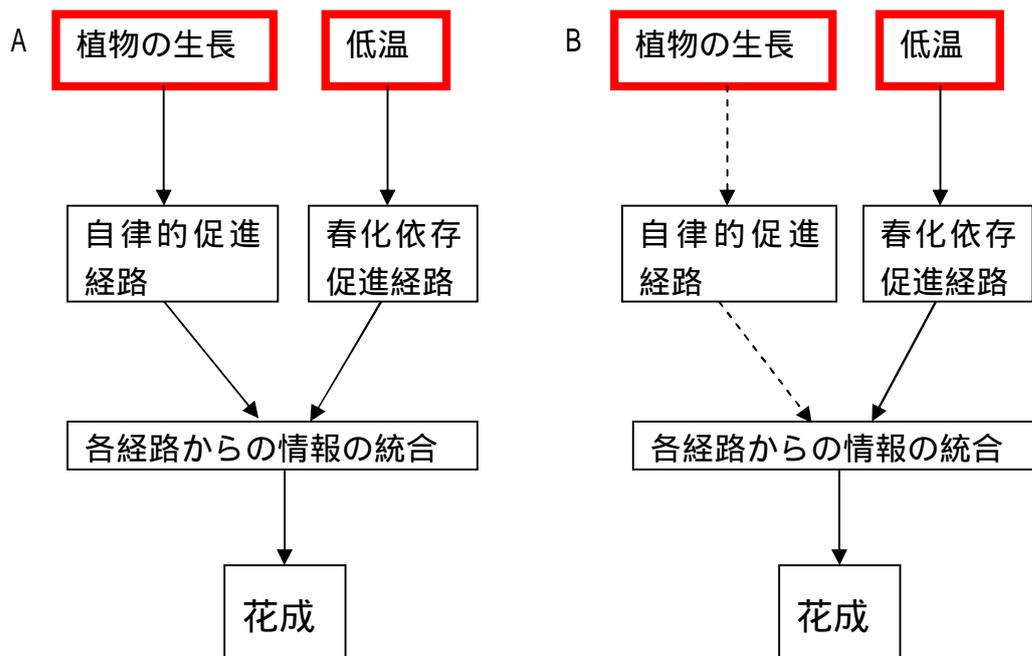
^x 数値は平均値 ± 標準誤差を示す

が植え付け時期の秋に鱗茎内部ですでに形成されている (Rees, 1992) ことから, ヒメサユリの娘球が実際には 4 月より前に形成され, 冬の低温を経験して春化を完了している可能性がある. 2 つ目として, シロイヌナズナでは 4 つの主要な花成促進経路, すなわち光周期依存促進経路, 自律的促進経路, 春化依存促進経路およびジベレリン依存促進経路がある (第 16-a 図)(倉田ら, 2001) ことから, ヒメサユリも自律的促進経路と春化依存促進経路の両方をもち (第 16-b 図), 子球の生長や環境条件に応じて異なる経路を介して花芽形成を促進している可能性がある. すなわち, 十分に生長したヒメサユリの鱗茎内部で形成された娘球の花成は自律的経路が働くため (第 16-b 図 A) 従来の考えの通り春化による促進を必要としないが, 本実験で調査した培養子球の花成は, 子球の生長が十分でなく自律的経路が働かないため (第 16-b 図 B), 春化を必要としたのかもしれない. 本実験では 8 での低温処理期間を 150 日間としたが, ヒメサユリ子球の花芽形成相への移行に必要な低温期間はもっと短期間で十分である可能性があることから, 最適な低温処理期間を今後検討する必要があるだろう.

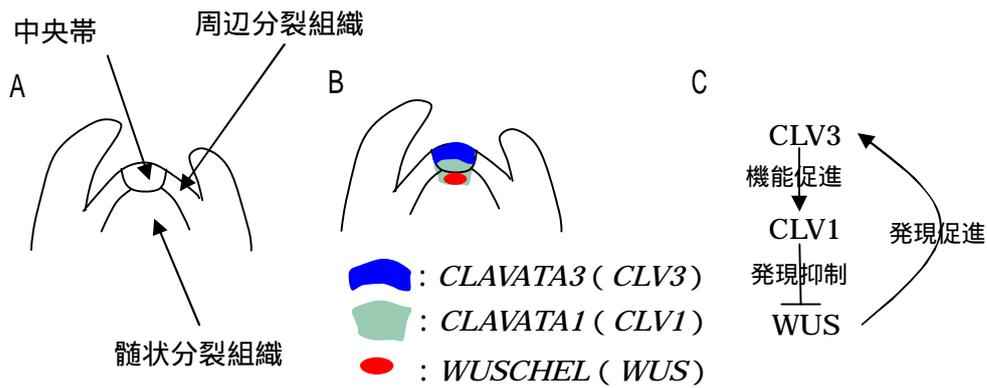
実験 2 において茎伸長した子球は, 茎伸長しなかった子球と比較して, 髄状分裂組織と茎頂の表層の細胞が活発に分裂していた (第 15 図 A, B). 前者の子球の 53% が花芽形成したが, 後者の子球は全く花芽形成しなかった (第 13-a 表). 茎伸長子球には花芽を形成せず, 止め葉を形成したのものもあった (第 14 図 C). 髄状分裂組織からは茎の髄になる細胞が作られる (原, 1994) ことから, 茎伸長した子球では, 茎伸長しなかった子球に比べて髄状分裂組織の細胞分裂活性が高かったため (第 15 図 A, B), 茎の伸長が促されたと考えられる (第 17-b 図 A, B). 一方, 維管束植物では, 中央帯 (第 17-a 図 A) の細胞の分裂活性が増加すると, 茎頂分裂組織は一連の発生段階を経て最終的に花芽やとげなど完全に分化したものに変わる (Steeves・Sussex, 1972) ことから, 茎伸長子球では, 中央帯の細胞の活発な分裂が起こり (第 15 図 B), 結果として, 花芽または止め葉が形成したといえよう. シロイヌナズナ茎頂分裂組織の構造の維持には CLAVATA (CLV) - WUSCHEL (WUS) フィードバックループ (第 17-a 図 B, C) が関わっており (Charles・Fletcher, 2003), WUS と CLV は互いに相互作用することから, 髄状分裂組織の生理状態と中央帯の生理状態は互いに影響していると考えられる. 同様のメカニズムがユリでも存在するならば, 髄状分裂組織の分裂活性の増加と領域の拡大が茎伸長を促すと共に中央帯の生理状態に影響を及ぼし (第 17-b 図 A, B), その結果, 中央体の細胞分裂が活性化して (第 17-b 図 C) 花芽または止め葉が形成されたのかもしれない. 花芽形成は茎伸長した子球でのみ起こり, 茎伸長しなかった子球では決して起こらなかった (第 13-a 表) ことはこの可能性を支持するものといえる.



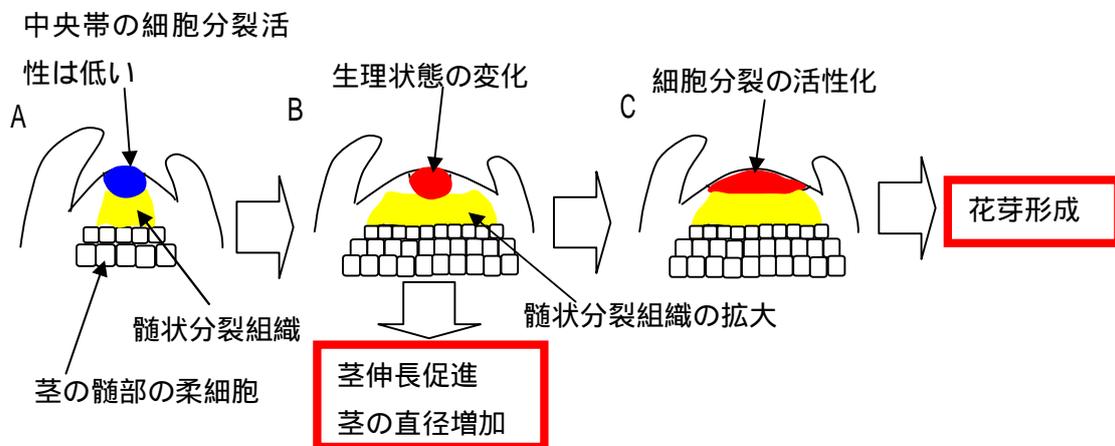
第 16-a 図 シロイヌナズナの花成を制御する 4 つの主要な経路．それぞれの経路を介して花成を促進する要因は，赤い枠内に示した．



第 16-b 図 ヒメサユリの花成を制御していると推測される経路．十分に生長したユリ鱗茎 (A) および生長が十分でない *in vitro* 子球 (B) の経路．それぞれの経路を介して花成を促進する要因は，赤い枠内に示した．



第 17-a 図 シロイヌナズナ茎頂分裂組織構造の維持機構．茎頂の細胞組織体 (A), *CLAVATA* および *WUSCHEL* 遺伝子の発現場所 (B) および *CLAVATA*-*WUSCHEL* フィードバックループ (C)．



第 17-b 図 茎頂の髄状分裂組織の細胞分裂活性の促進および領域の拡大が茎伸長・肥大および花芽形成に及ぼす影響についての仮説．髄状分裂組織の細胞分裂活性が低く領域が狭い子球 (A) および髄状分裂組織の細胞分裂活性が高く領域が拡大した子球 (B, C)．

実験 2 の stage 3 終了時までには茎伸長して花芽形成した子球は、花芽形成しなかった子球に比べて茎の直径が太かった(第 14 表)。この結果は、茎の肥大生長と花芽形成が関係していることを示しており、上述した茎伸長の生起と花芽形成との関係同様、髄状分裂組織の細胞分裂活性増加および領域の拡大が花芽形成を促す可能性(第 17-b 図)を支持する。

摘要

実験 1 N^6 -Benzyladenine と温度が *in vitro* 子球の幼若相期間と花芽形成に及ぼす影響

ヒメサユリ子球から剥がした鱗片を 0.044 または 4.4 μM N^6 -Benzyladenine(BA)を含む MS 培地に置床して 300 日間暗黒下で培養した。培養期間を、stage 1 (0 から 60 日目)、stage 2 (61 から 210 日目)および stage 3 (211 から 300 日目)に区分した。鱗片は、stage 1 で 25℃、stage 2 で 25℃ または 8℃ (温度処理)、stage 3 で 20℃ で培養した。

- 1) 0.044 または 4.4 μM BA を含む培地に鱗片を置床して培養し、stage 2 において 25℃ で温度処理した場合、鱗片から茎伸長した子球としなかった子球が生じた。stage 2 において 8℃ で温度処理すると茎伸長子球の割合は減少した。4.4 μM BA を含む培地で培養すると、0.044 μM BA を含む培地で培養した場合に比べて茎伸長子球の数および割合が著しく増加した。
- 2) 4.4 μM BA を含む培地で培養し、stage 2 において 8℃ で温度処理した場合にのみ、子球は花芽を形成し、他の条件下では花芽を形成しなかった。
- 3) 4.4 μM BA を含む培地で培養し、stage 2 において 25℃ で温度処理した場合、他の条件下に比べて、子球は鱗片葉および普通葉を最も多く形成した。stage 2 において 8℃ で温度処理すると子球の累積葉数(鱗片葉数 + 普通葉数)は減少した。4.4 μM BA を含む培地で培養した場合、0.044 μM BA を含む培地で培養した場合に比べて子球の累積葉数は増加した。

実験 2 *in vitro* 子球の発達と花芽形成との関係

ヒメサユリ子球から剥がした鱗片を 4.4 または 44 μM BA を含む MS 培地に置床し、暗黒下で 300 日間培養した。培養期間を、stage 1 (0 から 60 日目)、stage 2 (61 から 210 日目) および stage 3 (211 から 300 日目)に区分した。鱗片は、stage 1 において 44 μM BA を含む培地に置床して 25℃ で培養後、4.4 μM BA を含む培地に移し、stage 2 で 8℃、stage 3 において 20℃ で培養した。

- 1) stage 2 終了時，鱗片上で茎伸長した子球と茎伸長しなかった子球が観察され，前者の子球は後者の子球に比べて茎頂の表層と髄状分裂組織の細胞が活発に分裂していた．茎の柔細胞のセルロース微繊維の結晶は，茎伸長した子球では茎の軸に対して横方向に，茎伸長しなかった子球では縦方向に偏って配向した．
- 2) 茎伸長子球には花芽を形成した子球としなかった子球が観察され，前者の子球の茎の直径は後者の子球のそれに比べて大きかった．

第2節 光線および硝酸アンモニウム濃度が *in vitro* で茎伸長した シンテッポウユリ ‘ホワイト阿賀’ の子球の花芽形成に及ぼす影響

緒言

自然条件下で生育しているタカサゴユリ，テッポウユリ，ウケユリ，タモトユリ，ヤマユリ，サクユリ，コオニユリ，スゲユリ，カノコユリ，クルマユリ，八カタユリ，三宅島自生のイワトユリ，トサヒメユリ，オニユリ，キカノコユリは，鱗茎から外に茎を伸長した後，すなわち，伸長茎と普通葉が日光に曝された後に，その茎の頂部で花芽分化を開始する（清水，1971；大川，1989）こと，花熟相に移行したシンテッポウユリ ‘ホワイト阿賀’ の *in vitro* 子球は連続照明下で培養することで花芽を形成した（第2章第1節）ことなどから，光線はこれらのユリの花芽形成を調節する因子の1つである可能性がある．一方，テッポウユリの花芽形成は，低温による春化を必要とするが，低温の効果は長日によって代替される（大川，1995）．しかし，光線とユリの花芽形成との関係の背景にある生理的メカニズムは明らかとなっていない．

植物の花成は窒素（N）と炭素（C）の相対比（C/N）に影響され，窒素源は花成を抑制し，炭素源は花成を促進すると考えられている（池田ら，2003）．実際，培地中の硝酸アンモニウム（ NH_4NO_3 ）濃度の低下はアオウキクサ，トレニアおよびエンドウの *in vitro* 植物体の花芽形成を促進することが報告されている（Tanaka ら，1991；Tanimoto・Harada，1981；Franklin ら，2000）．これらのことから，光線は，光合成を促し，C/Nを増加させることによってユリ子球の花芽形成を促進する可能性がある．

そこで，本節ではシンテッポウユリ ‘ホワイト阿賀’ の鱗片から誘導した茎伸長子球を硝酸アンモニウムを含むまたは含まないMS培地で連続照明下または連続暗黒下で培養し，光線およびC/Nの増加が子球の生長と花芽形成に及ぼす影響について調査した．

材料および方法

培養に用いた茎伸長子球の準備

第2章第1節で述べたシンテッポウユリ ‘ホワイト阿賀’ の鱗茎から剥がした鱗片を材料として用い，鱗片の殺菌および基本培地（MSSA 培地）の作製と滅菌は第2章第1節に述べた方法に従った．鱗片を，約 1cm^2 の断片に切って $0.54\ \mu\text{M}$ 1-Naphthaleneacetic acid (NAA) および $0.044\ \mu\text{M}$ N^6 -Benzyladenine (BA) を添加した MSSA 培地に置床し，25℃ 暗黒下で8から12週間培養して *in vitro* 子

球を得た (G-1 子球と呼ぶ) . 0.54 μM NAA および 44 μM BA を含む 30 ml の MSSA 培地を入れた 100 ml 三角フラスコに 200 から 400 mg の G-1 子球の鱗片を 10 個ずつ置床し , 25 °C で 30 日間培養した (stage 1) . 4.4 μM BA を含む MSSA 培地を入れたフラスコに stage 1 で子球を形成した鱗片を 5 個ずつ置床し , 8 °C (低温処理) で 60 日間培養した (stage 2) . その後同じ培地で 25 °C で 30 日間培養 (stage 3) して茎伸長子球を得た . 茎伸長子球は , 鱗片葉とともに底盤部を切除して以下の実験に用いた .

茎伸長子球の培養条件

茎伸長子球は , 4.4 μM BA と硝酸アンモニウム (1650 mg/l NH_4NO_3) を含む MSSA 培地 (MSSAB 培地と呼ぶ) または 4.4 μM BA を含み硝酸アンモニウムを全く含まない修正 MSSA 培地 (修正 MSSAB 培地と呼ぶ) を 100 ml 入れた円筒形の培養容器 (高さ 13.2 cm , 直径 7.35 cm) に 5 個ずつ移植し , 25 °C , 連続暗黒下または連続照明下 (20,000 lx , 光量子束密度 150 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) で 90 日間培養した (この培養期間を stage 4 と呼ぶ) . stage 4 の培養期間を stage 4-1 (stage 4 の 0 から 30 日目) , stage 4-2 (stage 4 の 31 から 60 日目) , stage 4-3 (stage 4 の 61 から 90 日目) に細分し , 硝酸アンモニウム濃度条件の異なる以下の 3 つの処理区を設けた .

硝酸アンモニウム濃度処理 1

・ stage 4-1 , 4-2 および 4-3 において MSSAB 培地 (1650 mg/l NH_4NO_3) で培養 .

硝酸アンモニウム濃度処理 2

・ stage 4-1 において修正 MSSAB 培地 (0 mg/l NH_4NO_3) , stage 4-2 および 4-3 において MSSAB 培地 (1650 mg/l NH_4NO_3) で培養 .

硝酸アンモニウム濃度処理 3

・ stage 4-1 , 4-2 および 4-3 において修正 MSSAB 培地 (0 mg/l NH_4NO_3) で培養 .

継代培養は 30 日ごとに行い , 茎伸長子球の伸長茎の基部に形成されたカルスおよび腋芽は基部末端 2 mm の部位とともに切除した . stage 4 の終了時 (stage 4 の開始から 90 日後) に , 枯死しなかった茎伸長子球数 (生存子球数) , 花芽形成子球の累積数 , 子球の茎の長さおよび直径と鱗片葉および普通葉の数を計測した . 本研究における鱗片葉と普通葉の定義については第 2 章第 1 節の材料および方法(2)に述べた . なお , 茎の長さは茎伸長子球の基部から茎頂までの長さを , 茎の直径は伸長茎の最も太い部分の直径を測定した . データは , stage 4 の光条件 (連続暗黒または連続照明) および培地の硝酸アンモニウム濃度条件についての 2 元配置分散分析によって統計分析した .

茎伸長子球の組織学的観察

stage 4 終了時に、枯死した茎伸長子球を除いた生存茎伸長子球の茎頂 7 個を採取し、第 2 章第 1 節の(4)と同じ方法で 25 μm の切片にした後、デラフィールド・ヘマトキシリンで染色し、明視野顕微鏡下で観察した。

結果

子球の普通葉数および累積葉数（鱗片葉数 + 普通葉数）は、硝酸アンモニウム濃度に影響された（第 15 表）。stage 4 の全期間（90 日間）を通して MSSAB 培地（1650 mg/l NH_4NO_3 ）で培養した子球に比べて、修正 MSSAB 培地（0 mg/l NH_4NO_3 ）で 30 日間または 90 日間培養した子球では普通葉の形成が抑制され、累積葉数が減少した（第 15 表）。

子球の茎の長さおよび茎の直径は、光条件（連続照明または連続暗黒）および硝酸アンモニウム濃度条件の両方に影響された（第 15 表）。連続照明下で培養した子球は、連続暗黒下の子球に比べて茎の長さは 6.3 から 27.7 mm 短縮し、茎の直径は 1.3 から 1.8 mm 増加した（第 15 表）。一方、修正 MSSAB 培地（0 mg/l NH_4NO_3 ）での培養期間の違いによって、子球の茎の長さは 1.6 から 23.0 mm、茎の直径が 0.1 から 0.9 mm の幅で変動した（第 15 表）。

茎の横断面の髄部の広さおよび細胞数は光条件に影響され、stage 4 の全期間（90 日間）MSSAB 培地（1650 mg/l NH_4NO_3 ）で培養した場合、連続照明下の子球の茎の髄部の横断面は、連続暗黒下の子球のそれと比べて広く、細胞数が増加していた（第 18 図）。

花芽形成子球の数とその割合は光条件に有意に影響され、連続暗黒下で培養した茎伸長子球は全く花芽形成しなかったのに対し、連続照明下では、子球の 10~20% が花芽形成した（第 16 表、第 19 図）。一方、硝酸アンモニウム濃度条件は花芽形成に影響しなかった（第 16 表）。

考察

硝酸アンモニウム濃度は葉数に影響し、修正 MSSAB 培地（0 mg/l NH_4NO_3 ）での培養期間が長くなるほど普通葉数および累積葉数（鱗片葉数 + 普通葉数）が減少した（第 15 表）。この結果は、窒素の減少がユリ（*Lilium* sp.）の子球の栄養成長を抑制して葉数を減少させたという以前の報告（Varshney ら、2001）と一致し、C/N の増加がユリの栄養成長を抑制することを示唆している。

子球の茎の長さおよび直径および茎の横断面の髄部の細胞数は光線の有無に影響され、連続照明下の子球では、連続暗黒下の子球に比べて茎の長さは減少し、

第15表 stage 4の光条件（連続暗黒または連続照明）および硝酸アンモニウム濃度条件が茎伸長子球の発達に及ぼす影響^z

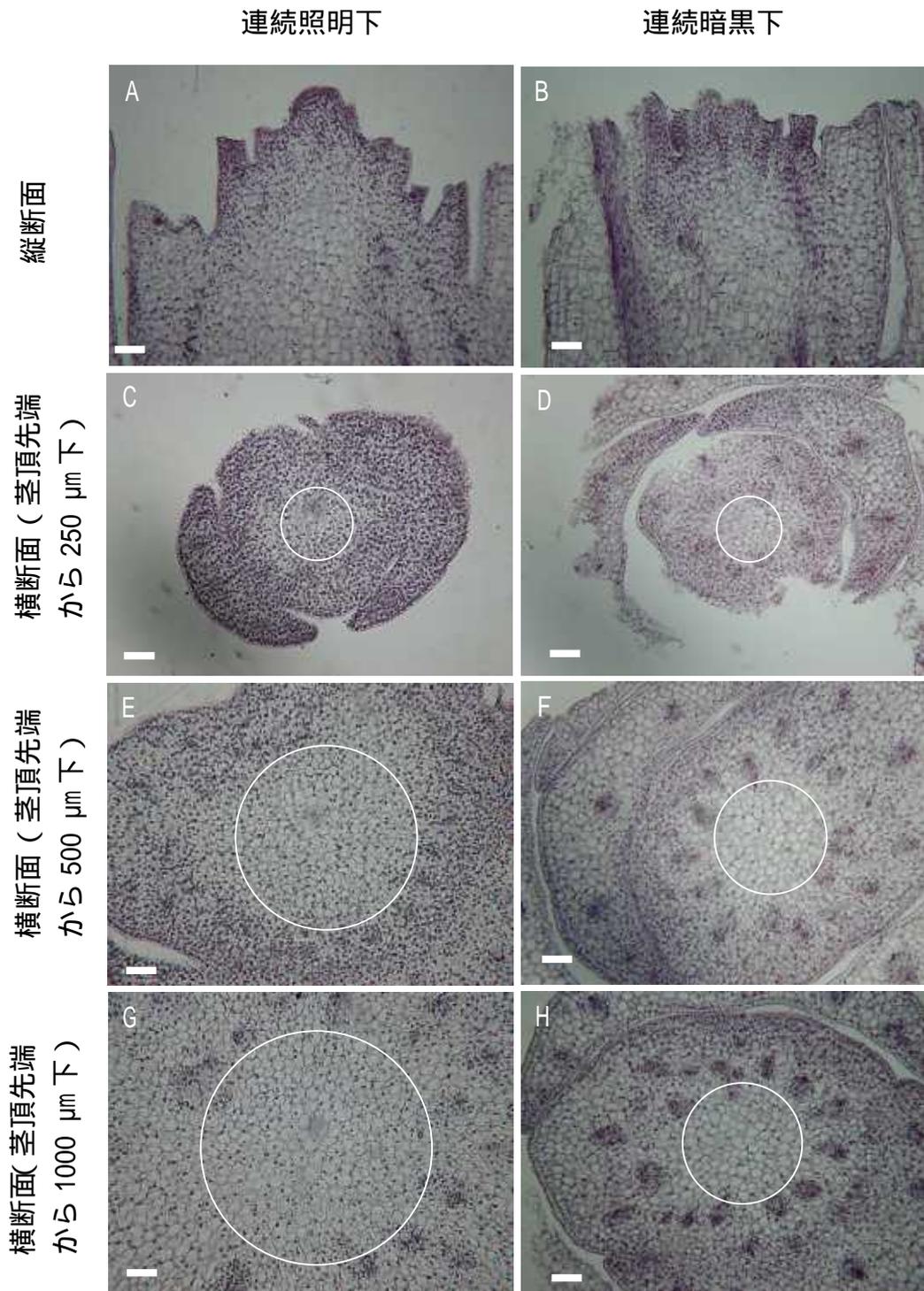
光条件	硝酸アンモニウム濃度 (mg/l)			培養 子球数 / 反復	生存 子球数	茎の長さ (mm)	茎の直径 (mm)	鱗片葉数 / 子球	普通葉数 / 子球	累積葉数 ^y / 子球
	4-1	4-2	4-3							
連続暗黒	1650	1650	1650	5	4.2 ± 0.2 ^x	49.8 ± 6.3	3.7 ± 0.2	3.3 ± 0.7	27.5 ± 1.9	30.8 ± 2.6
	0	1650	1650	5	3.5 ± 0.5	26.8 ± 3.5	3.8 ± 0.2	3.3 ± 0.3	24.6 ± 1.1	27.8 ± 1.2
	0	0	0	5	4.0 ± 0.5	30.0 ± 3.3	3.3 ± 0.1	2.4 ± 0.4	21.7 ± 1.7	24.2 ± 1.9
連続照明	1650	1650	1650	5	4.0 ± 0.5	22.1 ± 2.6	5.5 ± 0.1	3.0 ± 0.5	31.7 ± 1.0	34.7 ± 1.4
	0	1650	1650	5	4.5 ± 0.2	20.5 ± 3.7	5.5 ± 0.4	3.2 ± 0.8	26.2 ± 1.6	31.6 ± 2.5
	0	0	0	5	4.3 ± 0.2	18.1 ± 3.9	4.6 ± 0.2	4.7 ± 2.0	20.3 ± 1.5	25.5 ± 3.2
有意差										
光条件 (L)					NS	**	**	NS	NS	NS
硝酸アンモニウム濃度条件 (N)					NS	**	**	NS	**	**
L × N					NS	*	NS	NS	NS	NS

** , * , それぞれ有意水準 $P \leq 0.01$ または $P \leq 0.05$ で有意差あり; NS, 有意差なし

^z データは, stage 4 終了時 (stage 4 の開始から 90 日後) に生存子球について計測した

^y 累積葉数 = 鱗片葉数 + 普通葉数

^x 数値は6反復の平均値 ± 標準誤差を示す



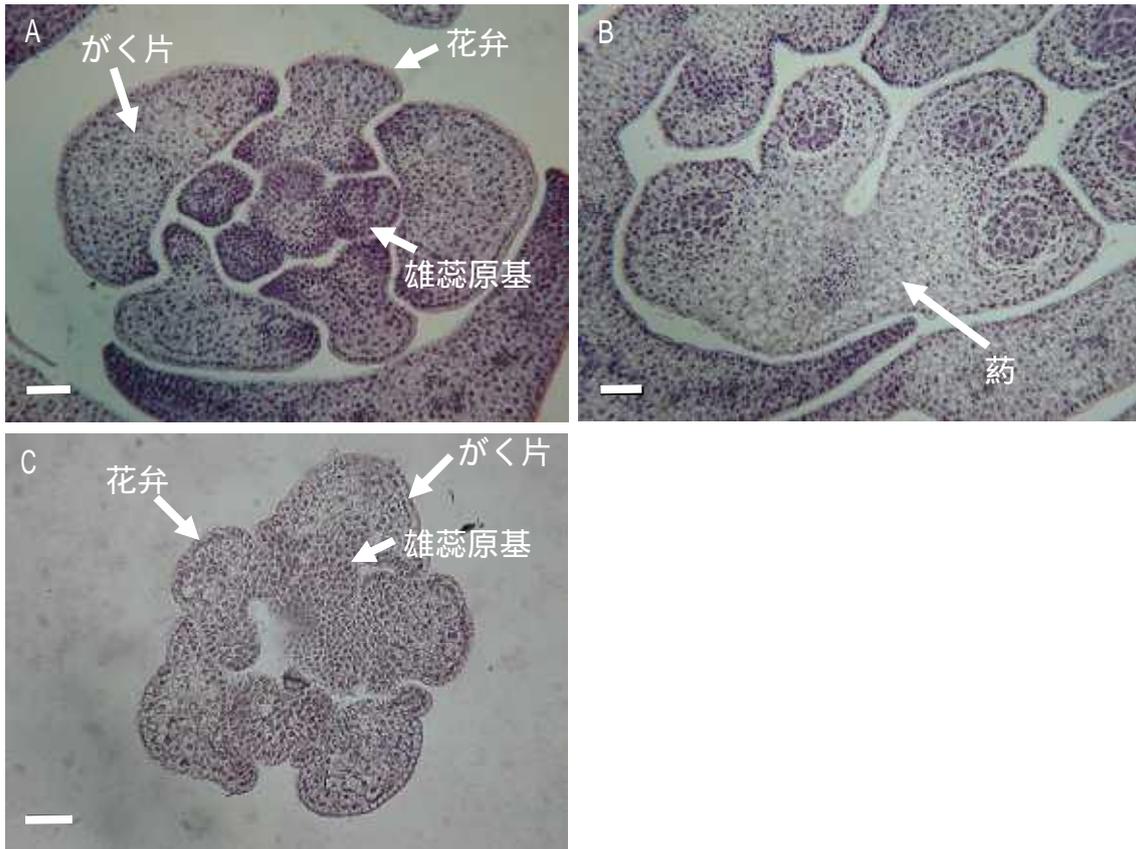
第 18 図 stage 4 において MSSAB 培地 (1650 mg/l NH_4NO_3) で 90 日間培養した茎伸長子球の茎頂の縦断面および茎の横断面。連続照明下で培養した茎伸長子球の茎頂 (A) と茎 (C, E, G) および連続暗黒下で培養した茎伸長子球の茎頂 (B) と茎 (D, F, H)。円は茎の髓の領域を示す。バーの長さは 100 μm を示す。

第16表 stage 4の光条件（連続暗黒または連続照明）および硝酸アンモニウム濃度条件が生存子球数および花芽形成子球の累積数と割合に及ぼす影響

光条件	硝酸アンモニウム濃度 (mg/l)			(A) 培養子球数 / 反復	生存子球数	(B) 花芽形成子球の累積数	花芽形成子球の割合 (B/A × 100)
	4-1	4-2	4-3				
連続暗黒	1650	1650	1650	5	4.2 ± 0.2 ^z	0.0 ± 0.0	0 ± 0
	0	1650	1650	5	3.5 ± 0.5	0.0 ± 0.0	0 ± 0
	0	0	0	5	4.0 ± 0.5	0.0 ± 0.0	0 ± 0
連続照明	1650	1650	1650	5	4.0 ± 0.5	1.0 ± 0.3	20 ± 5
	0	1650	1650	5	4.5 ± 0.2	0.8 ± 0.3	17 ± 6
	0	0	0	5	4.3 ± 0.2	0.5 ± 0.3	10 ± 7
有意差							
光条件 (L)					NS	**	**
硝酸アンモニウム濃度条件 (N)					NS	NS	NS
L × N					NS	NS	NS

** , 有意水準 $P \leq 0.01$ で有意差あり; NS , 有意差なし

^z 数値は6反復の平均値 ± 標準誤差を示す



第 19 図 連続照明下で培養した茎伸長子球で形成された花芽または花器官の横断面。stage 4 で、MSSAB 培地 (1650 mg/l NH_4NO_3) で 90 日間培養 (A), 修正 MSSAB 培地 (0 mg/l NH_4NO_3) で 30 日間培養後に MSSAB 培地 (1650 mg/l NH_4NO_3) で 60 日間培養 (B), 修正 MSSAB 培地 (0 mg/l NH_4NO_3) で 90 日間培養 (C)。バーの長さは 100 μm を示す。

茎の直径は 1.3 から 1.8 mm 増加した(第 15 表)。さらに、前者の子球の茎の髓部の細胞数は、後者の子球のそれに比べて増加していた(第 18 図)。一方、光条件の影響と比較して硝酸アンモニウム濃度の違いによる子球の茎の直径の増減は少なく、わずか 0.1 から 0.9 mm であった(第 15 表)。これらの結果は、光線は茎の細胞数増加を促進する作用をもち、その効果は C/N 栄養バランスの変化に比べて高いことを示唆する。サイトカインは植物細胞の分裂を促進する作用(Skoog・Miller, 1957)とマメの胚軸の伸長を阻害し(Vanderhoef ら, 1973)、茎の肥大を促進(Hashimoto, 1961; Katsumi, 1962)する作用を合わせもつ。一方、シロイヌナズナの分子生物学的な研究で光シグナルがサイトカニンシグナルと相互作用することが示唆されており(Fankhauser, 2002)、本実験で観察された茎の長さや直径および髓部の細胞数に対する光の照射効果は、光シグナルがサイトカニンシグナルに影響した結果であるかもしれない。

茎伸長子球の花芽形成は、光線の有無に影響され、連続暗黒下で培養した茎伸長子球は全く花芽形成しなかったが、連続照明下で培養した茎伸長子球は、10 から 20%が花芽形成した(第 16 表)。一方、硝酸アンモニウム濃度は花成に影響しなかった(第 16 表)。このことは、シンテッポウユリの子球が花熟相から花芽形成相へ移行するためには伸長茎または普通葉が受光する必要があること、光線は C/N の増加とは別の生理的メカニズムによって花成を促したことを示唆している。茎の太さの増加と花芽形成が同じ条件下で促進されたことから、ヒメサユリと同様に髓状分裂組織の領域の拡大が茎の発達と花芽形成に影響している可能性があり(第 3 章第 1 節第 17 - b 図参照)、光線は髓状分裂組織の細胞分裂活性の増加と領域の拡大を促すことで花芽形成を促進したのかもしれない。

摘要

シンテッポウユリ‘ホワイト阿賀’の茎伸長子球を、1650 mg/l 硝酸アンモニウム (NH_4NO_3)を含む MS 培地または硝酸アンモニウムを全く含まない修正 MS 培地に移植し、連続暗黒下または連続照明下、25℃ で 90 日間培養した。培養期間を、stage 4-1 (0 から 30 日目)、stage 4-2 (31 から 60 日目)および stage 4-3 (61 から 90 日目)に区分した。茎伸長子球を以下の 3 種類の培地条件で培養した。(1) stage 4-1、4-2 および 4-3 において MS 培地 (1650 mg/l NH_4NO_3) で培養、(2) stage 4-1 において修正 MS 培地 (0 mg/l NH_4NO_3)、stage 4-2 および 4-3 において MS 培地 (1650 mg/l NH_4NO_3) で培養、(3) stage 4-1、4-2 および 4-3 において修正 MS 培地 (0 mg/l NH_4NO_3) で培養。

1) stage 4-1、4-2 および 4-3 を通して MS 培地 (1650 mg/l NH_4NO_3) で培養し

た場合，stage 4-1，4-2 または 4-3 において修正 MS 培地（0 mg/l NH_4NO_3 ）で培養した場合に比べて，子球は多くの普通葉を形成した．

2) 連続照明下で培養した場合，連続暗黒下で培養した場合に比べて子球の茎の直径が増加した stage 4-1 4-2 および 4-3 を通して MS 培地（1650 mg/l NH_4NO_3 ）で培養した場合，連続照明下の子球の茎髓部の横断面の柔細胞数と面積は，連続暗黒下の子球のそれらに比べて増加していた．

3) 連続照明下で培養した場合，いくつかの子球が花芽形成したが，連続暗黒下で培養した場合，子球は全く花芽を形成しなかった．

第4章 総合考察

好適な濃度の BA は，タイプ A (第1章緒言参照) のシンテッポウユリ‘ホワイト阿賀’およびタイプ B (第1章緒言参照) のヒメサユリの培養子球が茎伸長を開始するため，すなわち，幼若相から花熟相へ移行するために絶対的に必要な条件であった(第2章第1および第3章第1節). BA を含む培地で，8 週で一定期間培養した‘アカプルコ’，‘カサブランカ’，アカカノコユリ，‘コネチカットキング’の子球の幼若相期間は，自然条件下で栽培した場合に比べて短縮された(第2章第3節). これらの結果は，好適な濃度のサイトカイニンの存在がユリの幼若相から花熟相への移行の本質的な条件になっていること，ユリの幼若相期間を決定するメカニズムにはサイトカイニンが関わっていることを示唆する. 多くの植物において，根はサイトカイニン合成の場である(Latham・Palni, 1983) ことから，根の形成・発達や生理的状态の変化に伴うサイトカイニンレベルの増減が幼若相から花熟相への移行の調節に関わっているのかもしれない. 従って，タイプ A とタイプ B のユリで幼若相期間が異なる原因を解明するためには，それぞれのユリにおいて，根の内生サイトカイニンの合成活性や子球のサイトカイニン濃度を調査し，それらと幼若相期間との関係を明らかにする必要がある.

低温は茎の柔細胞の表層微小管およびセルロース微繊維の横方向への配向を促し，シンテッポウユリ子球の茎伸長の生起を促進した(第2章第1節). しかしながら，低温がユリの茎伸長の開始を促進する効果は絶対的なものではなく，低温遭遇せずに茎伸長した子球があり(第2章第1節)，ヒメサユリでは低温が茎伸長を抑制した(第3章第1節). 一方，低温の効果は，微小管破壊剤であるコルヒチン処理により代替された(第2章第2節). これらの結果は，低温が，微小管の重合阻害または脱重合促進作用(Heppler・Palevitz, 1974; Hogetsu, 1986; Kerr・Carter, 1990) を介して，茎の柔細胞の表層微小管およびセルロース微繊維の横方向への配向を促すという可能性を支持している. 一方で，本結果は，低温の効果はユリの種類や発達段階による子球の生理的状态の違いに影響されることも示唆しており，これには表層微小管およびセルロース微繊維の配向に影響することが示されている植物ホルモン(柴岡, 2003) の内生レベルと関連しているかもしれない. 従って，茎伸長における低温の役割を明らかにするためには，(1)微小管の重合阻害および脱重合促進(2)子球の生理的状态(3)植物ホルモンの3因子が茎の柔細胞の表層微小管の配向に及ぼす複合的な影響および低温が(1)，(2)，(3)に及ぼす影響を解明する必要がある.

タイプ 1 (第1章緒言参照) に属するシンテッポウユリ‘ホワイト阿賀’の茎伸長子球の花芽形成は光線を必要とし，低温遭遇後に連続照明下で培養した後

に起こり（第3章の第2節）、タイプ2（第1章緒言参照）のヒメサユリの茎伸長子球の花芽形成は光線を必要とせず、低温遭遇後に高温（20℃）で培養した後に起こった（第3章第1節）。この結果は、ユリの種類によって花熟相から花芽形成相に移行するための条件が異なり、低温を経験して春化を完了した後、シンテッポウユリの子球では伸長茎および普通葉への光の照射が、ヒメサユリの子球では低温から高温への温度変化が引き金となって花芽形成が開始することを示している。従って、タイプ1に分類されるユリでは光の変化が、タイプ2のユリでは花芽形成に適した温度への温度変化が花熟相から花芽形成相への移行の条件になっている可能性を本結果は支持する。タイプ1のユリは鱗茎の外に茎が伸長して普通葉が受光した後に花芽を形成する、一方、タイプ2のユリは茎が鱗茎の外に現れる前に花芽形成する（清水，1971；大川，1989）というそれぞれのユリの生活環と照らし合わせてみてもこの可能性は高いと思われる。開花調節の観点から、今後この可能性を検証する必要があるだろう。一方、ササユリ、エゾスカシユリやヒメサユリなどのタイプ2のユリは、夏から秋の間に、すなわち冬の低温を受ける前に花芽形成を開始する（大川，1989）ことから春化を必要としないと考えられていたが、本研究においてヒメサユリ *in vitro* 子球の花芽形成は春化を必要とした（第3章第1節）。この矛盾を説明するためには、タイプ2のユリの鱗茎内部で娘球が形成される時期の詳細な調査や十分に生長した鱗茎と生長の不十分な子球における花成促進経路（第3章第1節の第16-b図参照）の解明が必要かもしれない。

シンテッポウユリ‘ホワイト阿賀’では、光線は茎の直径の増加と花芽形成を共に促進し（第3章第2節）、ヒメサユリでは、花芽形成した子球はしなかった子球と比べて茎の直径が大きかった（第3章第1節）。一方、花芽を形成した子球と止め葉を形成した子球が同一培養条件下で観察された（第2章第1節；第3章第1節）。これらの結果は茎の直径の増加とユリ子球の花芽形成が関係していることを示唆し、それらは共に髄状分裂組織の領域の拡大によって促進されるのかもしれない（第3章第1節第17-b図参照）。一方、茎頂の中央帯の細胞分裂活性の増加は茎頂分裂組織を花芽やとげなど完全に分化したものに変える（Steeves・Sussex，1972）ことから、同一培養条件下の子球で観察された止め葉と花芽は共に、中央帯の細胞分裂が活性化した後の茎頂の最終的な分化形態であると推察される。しかし、茎頂が最終的に花芽になるのか止め葉になるのかを決定する要因は不明である。以上のことから、ユリの花熟相から花芽形成相への移行のメカニズムを明らかにするためには、髄状分裂組織の領域拡大と中央帯の細胞分裂の活性化との関係および中央帯の細胞分裂が活性化した後の茎頂の最終的な分化形態を決定する要因を明らかにする必要があるだろう。

引用文献

- Atherton J.G., Yeh D.M., Craigon J. & Tucker G.A. 1998. Leaf initiation and shoot apical diameter in relation to phase transition in cineraria. *J. Hort. Sci. Biotech.* 73: 45-51.
- Carles, C.C. and Fletcher, J.C. 2003. Shoot apical meristem maintenance: the art of dynamic balance. *Trends Plant Sci.* 8: 394-401.
- Chu B., Xin Z., Carter J.V. 1992. Depolymerization of cortical microtubules is not a primary cause of chilling injury in corn (*Zea mays* L. cv Black Mexican Sweet) suspension culture cells. *Plant Cell Environ.* 15: 307-312.
- Fankhauser, C. 2002. Light perception in plants: cytokinins and red light join forces to keep phytochrome B active. *Trends Plant Sci.* 7: 143-145.
- Franklin, G., Pius, P. K. and Ignacimuthu, S. 2000. Factors affecting in vitro flowering and fruiting of green pea (*Pisum sativum* L.). *Euphytica* 115: 65-73.
- Fujioka S. and Sakurai A. 1992. Effect of L-pipecolic acid on flowering in *Lemna paucicostata* and *Lemna gibba*. *Plant Cell Physiol.* 33: 419-426.
- Gupta S. and Maheshwari S.C. 1969. Induction of flowering by cytokinins in a short-day plant, *Lemna paucicostata*. *Plant Cell Physiol.*, 10: 231-233.
- Han S.S., Halevy A.H., Sachs R.M. and Reid M.S. 1991. Flowering and corm yield of *Brodiaea* in response to temperature, photoperiod, corm size and planting depth. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 116: 19-22.
- 原襄. 1994. 植物形態学. p.110-157. 朝倉書店. 東京.
- Hashimoto, T. 1961. Synergistic effect of indoleacetic acid and kinetin on the primary thickening of pea stem segments. *Bot. Mag. (Tokyo)* 74: 110-117.
- Hepler P.K. and Palevitz B.A. 1974. Microtubules and Microfilaments. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 25: 309-362.
- Hogetsu T. 1986. Re-formation of microtubules in *Closterium ehrenbergii* Meneghini after cold-induced depolymerization. *Planta* 167: 437-443.
- 池田亮・園田裕・山口淳二. 2003. 炭素源分配の制御機構 - C/Nバランスによる制御を中心として . 蛋白質核酸酵素. 48: 2103-2112.
- Ishimori T. and Niimi Y. 2003. N⁶-Benzyladenine and low temperature affecting shoot types and stem elongation on in vitro cultured

- bulb-scales of *Lilium × formolongi* 'White Aga'. Jour. Japan. Soc. Hort. Sci. 72 (Suppl. 1): 276.
- Ishimori T. and Niimi Y. 2005. Similar effects of colchicine and low temperature on initiation and elongation of stems in bulblets developed on scales of 'White Aga' (*Lilium × formolongi*) cultured in vitro. Acta Hort. 673: 395-400.
- Ishimori T., Niimi Y. and Han D.S. 2007. Benzyladenine and low temperature promote phase transition from juvenile to vegetative adult in bulblets of *Lilium × formolongi* 'White Aga' cultured in vitro. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 88: 313-318.
- Kamenetsky R., Zemah H., Ranwala A. P., Vergeldt F., Ranwala N.K., Miller W. B., Van As H. and Bendel P. 2003. Water status and carbohydrate pools in tulip bulbs during dormancy release. *New Phytologist* 158: 109-118.
- Kaneta T., Kakimoto T. and Shibaoka H. 1993. Actinomycin D inhibits the GA₃-induced elongation of Azuki Bean Epicotyls and the reorientation of cortical microtubules. Plant Cell Physiol. 34: 1125-1132.
- Katsumi, M. 1962. Physiological effects of kinetin-effect on the thickening of etiolated pea stem sections. Physiol. Plant. 15: 115-121.
- Kerr G.P. and Carter J.V. 1990. Relationship between freezing tolerance of root-tip cells and cold stability of microtubules in rye (*Secale cereale* L. cv Puma), Plant Physiol. 93: 77-82.
- 倉田哲也・中川繭・米田好文・荒木崇. 2001. 花-性と生殖の分子生物学. p.25-40. 学会出版センター. 東京.
- Langens-Gerrits M., De Klerk G.J. and Croes A. 2003. Phase change in lily bulblets regenerated in vitro. Physiol. Plant. 119: 590-597
- Letham D.S. and Palni L.M.S. 1983. The biosynthesis and metabolism of cytokinins. Annu. Rev. Plant Physiol. 34: 163-197.
- Matsuo E. and Arisumi K. 1978. Studies on the leaf development of the scale bulblet in the Easter lily (*Lilium longiflorum* Thunb.). 2. Relationship between the size of the parent bulb or the parent scale and the type of leaf development (plant type). Bull. Fac. Agr. Kagoshima Univ. no. 28: 1-8.
- 松尾英輔. 1986. オランダと日本のテッポウユリ生産. p.51 - 57. 春苑堂書店. 鹿児島.
- Morejohn L.C. and Fosket D.E. 1991. The biochemistry of compounds with anti-microtubule activity in plant cells. Pharmacol. Ther. 51: 217-230.
- Murashige T. and Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and

- bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- 新美芳二・遠藤由紀夫・有坂英一 . 1988 . ヒメサユリ培養子球の休眠打破に及ぼす低温及び GA₃ 処理の効果 . *園学雑* . 57: 250-257 .
- 新美芳二・小田正之 . 1988 . ヒメサユリの花芽分化と発達 . *農耕と園芸* . 43: 52-53 .
- 新美芳二 . 1995 . 農業技術体系 . 花卉編 10 . p.575-582 . 農山漁村文化協会 . 東京 .
- Niimi Y. 1995. In vitro propagation and post-in vitro establishment of bulblets of *Lilium japonicum* Thunb. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 63: 843-852.
- 大川清 . 1989 . 日本自生ユリの花芽分化期について . *園学雑* . 57: 655-661 .
- 大川清 . 1995 . 花卉園芸総論 . p.114-123 . 養賢堂 . 東京 .
- Rebers M., Vermeer E., Knecht E., Shelton C.J. and van der Plas H.W. 1995. Gibberellin levels and cold-induced floral stalk elongation in tulip. *Physiol. Plant.* 94: 687-691.
- Rees A.R. 1992. Ornamental bulbs, corms and tubers. p.50. C.A.B. International, Wallingford, Oxon, UK.
- Sakiyama-Sogo M. and Shibaoka H. 1993. Gibberellin A₃ and abscisic acid cause the reorientation of cortical microtubules in epicotyl cells of the decapitated dwarf pea. *Plant Cell Physiol.* 34: 431-437.
- Sakoda M., Hasegawa K. and Ishizuka K. 1992. Mode of action of natural growth inhibitors in radish hypocotyl elongation-influence of raphanusanin on auxin-mediated microtubule orientation. *Physiol. Plant.* 84: 509-513.
- Shibaoka H. 1994. Plant hormone-induced changes in the orientation of cortical microtubules: alteration in the cross-linking between microtubules and the plasma membrane. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45: 527-544.
- 柴岡弘郎 . 2003 . 植物は形を変える 生存の戦略のミクロを探る . p.58-137 . 共立出版 . 東京 .
- 清水基夫 . 1971 . 日本のユリ . p.78-350 . 誠文堂新光社 . 東京 .
- Skoog F. and Miller C. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 11: 118-131.
- Steeves T.A. and Sussex I.M. 1972. *Patterns in Plant Development* . p.37-216 . Prentice-Hall, Englewood Cliffs.
- Steen, D.A. and Chadwick, A.V. 1981. Ethylene effects in pea stem tissue: Evidence of microtubule mediation. *Plant Physiol.* 67: 460-466.

- Suttle J.C. and Banowitz G.M. 2000. Changes in *cis*-zeatin and *cis*-zeatin riboside levels and biological activity during potato tuber dormancy. *Physiol. Plant.* 109: 68-74.
- Takayama T., Toyomasu T., Yamane H., Murofushi N. and Yajima H. 1993. Identification of gibberellins and abscisic acid in bulbs of *Lilium elegans* Thumb. and their quantitative changes during cold treatment and the subsequent cultivation. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 62: 189-196.
- Tanaka O., Yamamoto T., Nakayama Y., Ozaki T. and Takeba G. 1991. Flowering induced by nitrogen deficiency in *Lemna paucicostata* 151. *Plant Cell Physiol.* 32: 1173-1177.
- Tanimoto S. and Harada H. 1981. Effects of IAA, zeatin, ammonium nitrate and sucrose on the initiation and development of floral buds in *Torenia* stem segments cultured in vitro. *Plant Cell Physiol.* 22: 1553-1560.
- Vanderhoef L.N., Stahl C., Siegel N.R. and Zeigler R. 1973. The inhibition by cytokinin of auxin-promoted elongation in excised soybean hypocotyl. *Physiol. Plant.* 29: 22-27.
- Varshney A., Srivastava P.S. and Dhawan V. 2001. Effect of doses of nitrogen, phosphorus and potassium on the performance of *in vitro* propagated bulblets of *Lilium* sp. (Asiatic hybrids). *Current Science* 81: 1296-1298.
- Werner T., Motyka V., Strnad M. & Schmülling T. 2001. Regulation of plant growth by cytokinin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 10487-10492.

Summary

Effect of cytokinin and temperature on phase transition from juvenile to vegetative adult in bulblets of *Lilium* spp.

1. Effect of N⁶-Benzyladenine and temperature on phase transition from juvenile to vegetative adult in bulblets of *Lilium* × *formolongi* ‘White Aga’ cultured *in vitro*

Phase transition from juvenile to vegetative adult in bulblets was marked by stem elongation. Scales excised from bulblets of *Lilium* × *formolongi* ‘White Aga’ were cultured on MS medium supplemented with 0.044 or 4.4 μM N⁶-Benzyladenine(BA) in the dark for 180 days. The culture period was divided into stage 1 (day 0 to 30), stage 2 (day 31 to 90) and stage 3 (day 91 to 180). The scales were cultured at 25 °C at stage 1, 25 °C or 8 °C at stage 2, and 25 °C at stage 3.

- 1) When the scales were cultured on medium with 4.4 μM BA at 25 °C at stage 2, bulblets with and without an elongated stem were produced. The percentage of bulblets with an elongated stem was greatly increased when the scales had been cultured at 8 °C at stage 2. On medium with 0.044 μM BA, only bulblets without an elongated stem were produced.
- 2) More leaves produced in bulblets cultured on medium with 4.4 μM BA than the one with 0.044 μM BA. More leaves were attached to basal plate of bulblets at 25 °C at stage 2, but they were attached to an elongated stem of bulblets at 8 °C at stage 2. All leaves were attached to basal plate in the bulblets cultured on medium with 0.044 μM BA.
- 3) The diameter of shoot primordia significantly increased in bulblets produced on medium with 4.4 μM BA at 8 °C at stage 2 and no such enlargement occurred under the other conditions.
- 4) Nearly square parenchyma cells were observed in the non-elongated shoot primordia of bulblets produced on medium with 4.4 μM BA at 8 °C at stage 2 but not in those of bulblets grown under the other conditions. These cells changed into longitudinally rectangular ones in the internode of elongated stems.
- 5) Procambium was arranged almost parallel to the shoot axis in the stem of bulblets cultured on medium with 4.4 μM BA, but not in the medium with 0.044 μM BA.
- 6) On medium with 4.4 μM BA, microtubules and cellulose microfibrils oriented transversely to shoot axis were frequently observed in parenchyma cells of stem in bulblets cultured at 8 °C at stage 2. Such orientations were almost unnoticeable when

bulblets were cultured at 25 °C at stage 2.

2. Effect of colchicine on stem elongation of bulblets of *Lilium × formolongi* ‘White Aga’ cultured *in vitro*

Scales excised from bulblets of *Lilium × formolongi* ‘White Aga’ were cultured on MS medium in the dark for 180 days. The scales were treated with colchicine or low temperature. In control experiment and colchicine treatment, culture period was divided into stage 1 (day 0 to 30), stage 2 (day 31 to 60), stage 3 (day 61 to 180), and stage 1 (day 0 to 30), stage 2 (day 31 to 90), stage 3 (day 91 to 180) in the low temperature (8 °C) treatment. In the control experiment, the scales were cultured at 25 °C on medium supplemented with 4.4 or 44 µM N⁶-Benzyladenine (BA) at stage 1, and on medium with 4.4 µM BA at stage 2 and stage 3. In the colchicine treatment, scales were cultured at 25 °C on medium with the same concentration of BA as in the control experiment, and cultured on medium with 1 or 10 µM colchicine at stage 2. In the low temperature treatment, scales were cultured on medium with same concentration of BA added in the control experiment at 25 °C at stage 1, at 8 °C at stage 2, and at 25 °C at stage 3.

1) When scales were cultured on medium with 44 µM BA at stage 1, elongated stems were frequently produced from bulblets developed on the scales treated with low temperature (8°C) or treated with 1 or 10 µM colchicine than bulblets in the control experiment. Moreover, external morphology of bulblets with an elongated stem produced on scales treated with 1 µM colchicine was very similar to those produced on scales treated with low temperature.

3. Effect of N⁶-Benzyladenine on period of juvenile phase of bulblets of *Lilium* spp.

Scales excised from bulblets of *Lilium* spp. were cultured on MS medium in the dark for whole period of culture. Scales were cultured on medium with 44 µM BA at 25 °C at stage 1, on medium with 4.4 µM BA at 8 °C at stage 2, on medium with 4.4 µM BA at 25 °C at stage 3. In *Lilium* Oriental Hybrid ‘Acapulco’ and ‘Casablanca’, period of stage 1, 2, and 3 were day 0 to 30, 31 to 120 and 120 to 210, respectively; In *Lilium* Asiatic Hybrid ‘Connecticut King’, day 0 to 30, day 31 to 210 and day 211 to 300; In *Lilium speciosum rubrum*, day 0 to 30, day 31 to 150 and day 151 to 240; In *Lilium rubellum*, day 0 to 30, day 31 to 150 and day 151 to 240 or day 0 to 60, day 61 to 150 and day 151 to 240.

1) Bulblets with an elongated stem produced on scales. The total number of bulblets with an elongated stem rapidly increased within days 90 to 120 of scale culture in 'Acapulco' and 'Casablanca'. In 'Connecticut King', *Lilium speciosum rubrum* and *Lilium rubellum*, that increase occurred within days 120 to 150 of scale culture. In these Lilies, 0.17 to 0.96 bulblets with an elongated stem were formed after the culture per scale.

2) In *Lilium rubellum*, bulblets with an elongated stem were produced more frequently from scale had been cultured for 60 days in stage 1 than those cultured for 30 days in stage 1.

Factors affect flower bud formation in bulblets of *Lilium* spp. cultured *in vitro*

1. Effect of N⁶-Benzyladenine and low temperature on period of juvenile phase and on flower bud formation and relationship between shoot development and flower bud formation in bulblets of *Lilium rubellum* cultured *in vitro*

1-1. Effect of N⁶-Benzyladenine and low temperature on period of juvenile phase and flower bud formation

Scales excised from bulblets of *Lilium rubellum* were cultured on MS medium supplemented with 0.044 or 4.4 μ M BA in the dark for 300 days. The culture period was divided into stage 1 (day 0 to 60), stage 2 (day 61 to 210) and stage 3 (day 211 to 300). The scales were cultured at 25 °C at stage 1, 25 °C or 8 °C at stage 2, and 20 °C at stage 3.

1) When scales were cultured on medium with 0.044 or 4.4 μ M BA at 25 °C at stage 2, bulblets with or without an elongated stem were produced. The percentage of bulblets with an elongated stem was decreased when scales had been cultured at 8 °C at stage 2. On the other hand, the number and percentage of bulblets with an elongated stem was greater when cultured on medium with 4.4 μ M BA than when cultured on medium with 0.044 μ M BA.

2) A flower bud formed in bulblets cultured at 8 °C at stage 2 but not in bulblets under other conditions.

3) When the scales were cultured on medium with 4.4 μ M BA at 25 °C at stage 2, bulblets produced the highest number of leaves attached to basal plate and leaves attached to elongated stem. The number of leaves of bulblets was decreased when scales were cultured at 8 °C at stage 2. Bulblets produced more leaves in medium with 4.4 μ M

BA than in medium with 0.044 μM BA.

1-2. Relationship between shoot development and flower bud formation

Scales excised from bulblets of *Lilium rubellum* were cultured in MS medium in the dark for 300 days. The culture period was divided into stage 1 (day 0 to 60), stage 2 (day 61 to 210) and stage 3 (day 211 to 300). Scales were cultured in medium with 44 μM N⁶-Benzyladenine(BA) at 25 °C in stage 1, in medium with 4.4 μM BA at 8 °C in stage 2, and at 20 °C in stage 3.

- 1) Bulblets with and without an elongated stem were produced on scales at the end of stage 2. Cell proliferation on the surface of shoot apex and in rib meristem was higher in bulblets with an elongated stem compared to the one observed in bulblets without stem. Cellulose microfibrils in parenchyma cells of stems were oriented predominantly transverse to shoot axis in the former bulblets but longitudinal to shoot axis in the latter.
- 2) Bulblets with an elongated stem developed into bulblets with or without a flower bud. The diameter of stem was larger in the bulblets with flower bud.

2. Effect of light and concentration of ammonium nitrate on flower bud formation of bulblets of *Lilium* \times *formolongi* ‘White Aga’ with an elongated stem cultured *in vitro*

Bulblets of *Lilium* \times *formolongi* ‘White Aga’ with an elongated stem were cultured at 25 °C in MS medium containing 1650 mg/l ammonium nitrate or revised-MS medium containing 0 mg/l NH_4NO_3 under continuous dark or continuous light conditions for 90 days. The culture period was divided into stage 4-1 (day 0 to 30), stage 4-2 (day 31 to 60) and stage 4-3 (day 61 to 90). Bulblets with an elongated stem were cultured in MS medium (1650 mg/l NH_4NO_3) at stage 4-1, 4-2 and 4-3; or at revised-MS medium (0 mg/l NH_4NO_3) at stage 4-1, and MS medium (1650mg/l NH_4NO_3) at stage 4-2 and 4-3; or in revised-MS medium (0mg/l NH_4NO_3) at stage 4-1, 4-2 and 4-3.

- 1) Larger number of foliage leaves were formed on elongated stem of bulblets cultured in MS medium (1650 mg/l NH_4NO_3) at stage 4-1, 4-2 and 4-3, compared to the number of leaves observed on bulblets cultured in revised-MS medium (0 mg/l NH_4NO_3) at stage 4-1, 4-2, or 4-3.
- 2) Stem diameter was larger in bulblets grown under continuous light condition rather than in bulblets grown under continuous dark condition. When bulblets were cultured in MS medium (1650 mg/l NH_4NO_3) at stage 4-1, 4-2 and 4-3, the number of cells and the

area in transverse section of pith of stem were greater in bulblets grown under continuous light condition rather than in bulblets grown under continuous dark condition.

3) Flower buds were produced only in bulblets grown under continuous light condition, but not in bulblets grown under continuous dark condition.

謝辞

本研究の遂行ならびに本論文を作成するに当たり終始懇篤なるご指導，ご鞭撻を賜りました新潟大学農学部農業生産科学科教授 新美 芳二博士に深甚なる謝意を表します．また，本論文校閲の労をとられた新潟大学自然科学研究科教授 児島 清秀博士，新潟大学理学部生物学科教授 和田 清俊博士，新潟大学農業生産科学科教授 池田 武博士および助手 韓東生博士に謹んで感謝の意を表します．

本研究の遂行ならびに本論文を作成するに当たり，終始惜しみないご協力をいただいた新潟大学農学部農業生産科学科園芸学研究室の学生各位に心から感謝いたします．