

ヒメサユリの成球生産に関する研究 試験管内で増殖した子球の生長改善

新美芳二・斉藤 勲

新潟大学農学部 950-21 新潟市五十嵐2の町

Production of Bulbs of *Lilium rubellum* Baker An Attempt to Improve *in Vitro* Growth of Bulblets Regenerated from Cultured Bulb Scales

Yoshiji NIIMI and Isao SAITO

Faculty of Agriculture, Niigata University, Niigata 950-21

Summary

A technique for improving *in vitro* growth of bulblets of *Lilium rubellum* Baker was developed. When bulb scales were cultured in a modified Murashige and Skoog's basal medium (3) for 8, 12, 16 and 20 weeks, there were scarcely any differences in the number of bulblets developed, except for those cultured for 20 weeks. At 20 weeks, the number of bulblets per cultured explant was largest and the average weight was heaviest compared to other three durations. Bulblets grew slowly as long as they were cultured on the original explants. However, growth of bulblets was improved when they were isolated from the original explants and recultured. A liquid basal medium enhanced growth but the bulblets grown in it were more apt to rot than were those grown on agar when stored at 4°C for 22 weeks or transplanted to soil.

緒 言

筆者らはヒメサユリの増殖について、成球の形質が異なる実生法よりも同一形質のりん茎増殖が可能な栄養繁殖法がすぐれていると考え、組織培養法による大量増殖法を検討してきた(4)。その結果、無菌子球から得たりん片外植体を8～12週間培養したときに得られる子球は50 mg前後のものが多くなることが明らかになった(4)。この組織培養によるヒメサユリの増殖法を実用的な成球生産技術とするには、大量増殖法の確立とともにこの方法により従来の実生繁殖法と比べ短期間で成球生産が可能となることが重要であろう。本研究は、りん片培養で形成された子球の生長を促進することにより、試験管内での子球増殖からほ場での成球生産までに必要な期間を短縮する方法を確立する研究の一環として行った。

材料及び方法

1. 材 料

りん片培養に用いたりん片は次の方法で得た。すなわち、すでに報告した方法(3)で葉切片培養を行い、その外植体に形成された子球を培養12週間後に無菌的に分離した。そしてこれらの子球を本研究で用いた基本培地と同一組成の培地で暗条件、24±1℃で8～12週間培養した。そのあとこれらの子球からりん片をピンセットとナイフを用いて分離し、得られたりん片の中から大きさがほぼ均一のものを選り、りん片培養の外植体とした。

固形培地及び液体培地を用いた子球の生長に関する実験では上述と同一の方法でりん片培養を行い、りん片上に発達した子球をピンセットとナイフで分離して、子球重量がほぼ均一のものを選り、根が形成されている場合には根を切除して子球培養の外植体とした。

2. 基本培地

基本培地は Murashige・Skoog 培地の無機塩(2)、100 mg/liter ミオイノシトール、0.5 mg/liter ニコチン

1990年1月19日 受理。本報告の概要は、園芸学会昭和62年及び63年秋季大会で発表した。また、本研究の一部は文部省科学研究費補助金(61560029)によって行われた。

酸, 0.5 mg/liter ピリドキシン, 0.1 mg/liter チアミン, 2 mg/liter グリシン, 0.1 mg/liter NAA (α -Naphthalenacetic acid), 0.001 mg/liter BA (6-Benzyl-aminopurine) を再蒸留水に溶かし, 50 g ショ糖を加えて 1 liter とした。そして 0.1 N NaCl と HCl で pH 5.6~5.7 に調整したあと 0.8% 寒天を加え, 湯せん内で培地を溶解した。液体培地を作成するときはこの基本培地から寒天を除いた。

培地はいずれの実験においても 100 ml 三角フラスコに約 40 ml ずつ分注した。分注後, 口をアルミ箔で閉じ, 1.2 kg/cm², 121°C で 10 分間, オートクレーブで殺菌した。

3. りん片培養と分離した子球のそれぞれの培養期間

りん片培養及びそのあと引き続き行った子球培養はすべて固形の基本培地を約 40 ml ずつ分注した三角フラスコで行った。りん片培養及び子球培養はともに暗条件, 24 \pm 1°C として, 双方を組み合わせた全培養期間を 20 週間とした。りん片培養及びそのあとに行なった子球培養はいずれも 12 反復とした。

1) りん片培養: りん片は 1 フラスコに 10 りん片ずつ背軸面が培地に接するように置床した。8, 12, 16 及び 20 週間培養したあと, 無菌条件下で子球形成率, りん片当たりの子球数を調べ, 子球の生体重を測定した。子球生体重の測定は子球が根を形成している場合には根をその基部で切除したのちに行なった。

2) 子球培養: りん片培養期間が 8, 12 及び 16 週間の場合には, 分離した子球の中から任意に子球を選んで, 新しく作成した固形の基本培地に 1 フラスコに 10 子球ずつ置床した。そしてりん片培養とこの子球培養の全期間が 20 週間となるように, 子球をそれぞれ 12, 8, 及び 4 週間培養した。子球培養が終了したあとりん片培養で用いた同一の方法で子球の生体重を測定した。

4. 固形培地と液体培地での子球培養

1) 液体培地のショ糖濃度: 子球の生長に適した液体培地のショ糖濃度を決定するため, 寒天を除いた基本培地のショ糖濃度を 3, 5 及び 7% にして, 各液体培地を 40 ml ずつ含む 100 ml フラスコで重さ約 50~150 mg の子球を 1 フラスコ 20 子球ずつ, 8 週間, 約 60 rpm で振とう培養した。各区 5 反復とした。

2) 固形及び液体培地での子球の培養: 固形培地及び液体培地を 40 ml ずつ含む 100 ml フラスコを用いて, 約 30 mg の子球を 1 フラスコ 10 子球ずつ培養し

た。液体培地では子球は約 60 rpm で振とう培養した。そして培養 4 週間後から一定期間ごとに子球の生長を調査し, 各区 6 反復とした。また, 任意に選んだ一部の子球を 105°C で 30 分, 60°C で 48 時間乾燥させたあと乾物重を測定して, (乾物重/生体重) \times 100 で子球の乾物率の変化を調べた。

5. 培養子球の移植

固形及び液体培地で 4 週間培養した子球を用いては場への移植実験を行った。すでに報告した方法(5)に従って 22 週間, 4 \pm 1°C で低温貯蔵し, 貯蔵後の腐敗子球数を調べたあと, 残った健全子球を腐葉土: 田土: 砂 = 2: 1: 1 の割合で混合した土の入った育苗箱に植えて露地条件下, 無肥料で 12 週間栽培した。そして栽培中に腐敗した子球数及び健全子球の生体重を調査した。子球生体重は根及び地上部のりん片葉を切除したあと測定した。

結果及び考察

1. りん片培養及び子球培養の期間が子球の生長に及ぼす影響

りん片培養 8, 12, 16 及び 20 週間後の子球形成率, りん片当たりの子球数, 平均子球重及び形成された子球の重量別割合を第 1 表に示した。りん片の子球形成率はりん片の培養期間が長くなるとともにわずかながら増加したが有意な差はなく, りん片当たりの子球数は 8 週間と 20 週間培養区の間でのみ有意差があった。これはりん片に分化する子球数は培養開始後比較的早い時期に決まることを示している(第 1 表)。一方, りん片上に形成された子球の平均生体重はりん片培養の期間が長くなるにつれてやや増加した。しかしながら, それぞれのりん片培養で得られた子球の重量別の分布割合を調べたところ, 100 mg 未満の子球がりん片培養 8 週間では全子球数の 86%, 20 週間培養においても約 59% あり, 後者においては 200 mg 以上の比較的大きい子球はわずか 10% しかなく, りん片培養期間の長さとりん片上の子球の生長との間にはっきりとした相関は見られなかった(第 1 表)。

一方, りん片外植体に形成された子球を分離して再び培養するとそれらの生長は促進された。りん片培養 8 週間のあと 12 週間の子球培養を行った場合の子球の最終重量は約 320 \pm 27 mg となり, りん片培養のみ 20 週間の子球と比べ約 3 倍となり, 分離した子球の培養期間が 4 週間及び 8 週間の場合でも子球の生長はそれらの培養期間の長さにはほぼ比例することがわかった(第 1 図)。

Table 1. Regeneration and development of bulblets in bulbscales cultured for 8, 12, 16 and 20 weeks, respectively.

Culture duration (weeks)	Explants forming bulblets (%)	Number of bulblets per cultured explant	Number of bulblets per regenerated explant	Mean fresh weight of bulblets (mg)	Weight classes of bulblets (%)					
					10~49 mg	50~99 mg	100~149 mg	150~199 mg	200~249 mg	more than 250 mg
8	73 a	1.7 a	2.3 a	62 a	53	33	10	3	1	0
12	76 a	1.9 ab	2.5 a	76 ab	41	35	15	7	1	1
16	83 a	2.2 ab	2.7 a	88 b	36	32	18	8	4	2
20	85 a	2.3 b	2.7 a	106 c	28	31	18	13	6	4

Mean separation within columns by Duncan's multiple range test, 5% level.

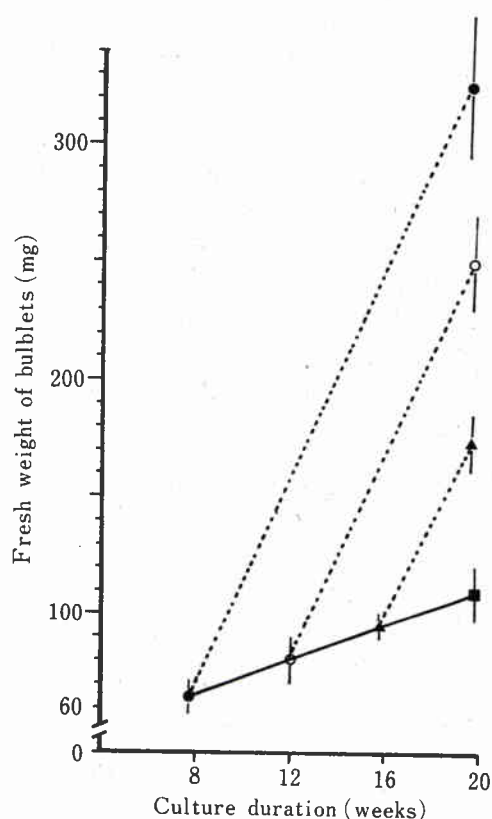


Fig. 1. Growth of isolated bulblets. After bulb scales were cultured in a solid basal medium for 8, 12 and 16 weeks, bulblets were excised and cultured in a fresh solid basal medium for 12, 8 and 4 weeks, respectively. Bars indicate standard error of the mean.

りん片外植体から分離して再び培養した子球の生長が促進された理由として、りん片から分離して培養した子球は養分を培地から直接利用することが可能となり、一方、りん片上に着生したままの子球の養分の利用はりん片外植体を経由した間接的なものであり、このことが子球の生長の差となって現れたと思われる。しかしながら、りん片から分離した子球を再び培養する場合には培地を更新しており、そのために子球の生

長が促進された可能性もあり、この点については今後調べる必要があろう。

以上のことから、ヒメサユリの子球の生長を促進するためには、りん片上に形成された子球をそのまま培養するよりも分離が比較的容易になる培養8週間後ころに子球を外植体から分離して再び培養するほうがよく、この方法は試験管内での子球の増殖を行う場合に有効な手段と思われる。

2. 固形培地及び液体培地での子球の生長

ヤマユリ子球の生長は固形培地よりも液体培地で促進されることが報告(8)されており、ヒメサユリでもこの方法が子球の生長促進に適しているかどうか調べた。

まず、液体培地のショ糖濃度の影響を調べたところ、ショ糖濃度は子球の生長に大きく影響し、3、5及び7%ショ糖を添加した培地での子球の平均子球重はそれぞれ209、285、260 mgで、液体培地においても基本培地に用いている5%ショ糖濃度が子球の生長に好適であることがわかった(第2図)。

ヤマユリ及びカノコユリでは本研究に用いたとほぼ同一組成のMurashige・Skoogの固形培地に9%のショ糖を添加したとき子球の生長が最も促進されたと報告されている(7)。一方、ヒメサユリの葉切片培養ではショ糖4%を添加した培地で子球がよく形成され(3)、テッポウユリやその他数種類のユリの茎頂培養においても4%のショ糖でりん片形成が促進され、8%では子球の発達は抑制されることが明らかになっている(1)。また、タバコ細胞培養では塩類濃度の浸透圧を3.6 π (atm)と一定にしてショ糖濃度を上げた場合、3%ショ糖すなわち浸透圧2.2 atm、全体の浸透圧が5.8 atmを越えると生長割合が低下する(9)。本研究の基本培地であるMurashige・Skoog培地に3、5及び7%ショ糖を添加すると、各培地の浸透圧はそれぞれ約-4.47、-5.87及び-7.37 barとなり、タバコ細胞培養(9)の場合

と類似した結果となったこと、また、ほとんどの植物の組織及び器官培養でショ糖濃度は1~5%(6)であることを考えあわせて、ヒメサユリのりん片や子球の培養では5%ショ糖濃度をその上限と考えた。しかしながら、すでに述べたように、ヤマユリやカノコユリの子球生長は9%ショ糖濃度で最も促進されるという報告(7)があることから、各ユリの子球生長のための好適濃度の違いの原因を浸透圧との関連も含めて今後調べてみる必要があろう。

上述の結果にもとづき、固形及び液体培地のショ糖濃度を5%として、両培地での子球の生長を比較した。培養開始時に約30 mgであった両培地の子球は培養4週間のうちに急速に生長してそれぞれ約132 mgと155 mgとなった。そして8週間後には前者の子球は約157 mg、後者は256 mgとなり、両者間の子球の生長にはっきりとした差が生じ、この差はやや大きくなりながら培養16週間後まで続いた(第3図)。このような両培地、とりわけ液体培地での子球の急速な生長は乾物重の増加を伴ったものかどうかを調べたところ、子球

の乾物率はいずれの時期も約20%前後とほぼ一定であり、液体培地の子球は水膨れ的な生長ではなく、固形培地の子球と同様に乾物重の増加を伴った生長であることがわかった(第3図)。

固形培地と液体培地で培養した子球のこのような生長の差は子球の重量別分布を調べることによって一層はっきりした(第2表)。培養4週間後の固形培地の子球の重量別の割合は100 mg未満のものが40%を占めていたが、逆に液体培地では100 mg以上の子球が83%を占めていた。そして培養8週間後の200 mg以上の子球は固形培地と液体培地ではそれぞれ24と64%であり、液体培地での子球の生長がよいことが明らかになった。そして液体培地では12週間後には300 mg以上の子球が43%となったが、その後子球はあまり生長せず、16週間後の子球重量別の割合は12週間の場合とほぼ同じであった(第2表)。このことから、液体培地での子球の培養期間はおよそ12週間为好と思われる。

液体培地でユリ子球の生長が促進されることはヤマユリ(8)で報告されており、液体培地で培養したヒメサ

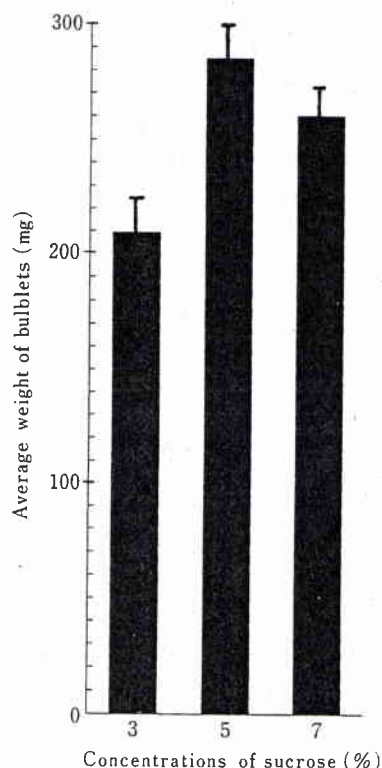


Fig. 2. Effect of concentrations of sucrose on the growth of isolated bulblets. Each bulblet, weighing about 50 to 150 mg, was cultured in a liquid basal medium without 0.8% agar for 8 weeks. Five replicates of a 100 ml Erlenmeyer flask, each containing 20 bulblets, were used for each treatment. Bars indicate standard error of the mean.

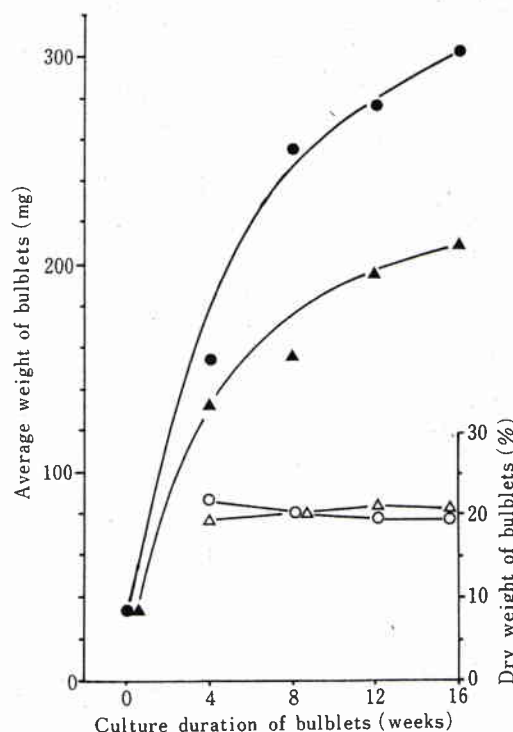


Fig. 3. Growth of isolated bulblets, initially weighing about 30 mg, cultured in a solid basal medium (▲—▲) and a liquid one (●—●), and the dry weight of the bulblets cultured in the former medium (△—△) and the latter one (○—○). Six replicates of a 100 ml Erlenmeyer flask, each containing 10 bulblets, were used for each treatment.

ユリの子球の生長が促進されたのも固形培地では養分の吸収利用は培地に接する部分あるいは根からであるが、液体培地では外植体のあらゆる面からの養分の利用が可能となり、これが子球の生長に有効に働いたと思われ、りん片培養で形成された子球をりん片から分離して培養するとそれらの生長が促進されたこと(第1表, 第2表)と類似している。

3. 低温貯蔵及びほ場栽培での子球の腐敗と移植後の子球生長

両培地で4週間培養した子球を各々60子球供試した(第3表)。固形培地で培養した子球は低温貯蔵中に腐敗しなかったが、液体培地の子球は12個腐敗した。一方、液体培地で培養した個球はほ場へ移植したあとも固形培地で培養した子球と比べ生長がよく、移植時のほぼ2倍の303 mgとなったが、固形培地のものと比べほ場栽培でもやや腐敗しやすいことがわかった(第3表)。

液体培地で培養した子球が固形培地のものと比べ腐敗しやすかったのは、子球のりん片組織、特にりん片表皮などの発達が固形培地で培養した子球と比べ不十分となり、子球が全体的に軟弱となっているためと思われるが、この原因については子球の腐敗を防ぐ方法を確立するために今後詳しく調べる予定である。

以上の結果から、試験管内でのヒメサユリの子球の生長を促すにはりん片外植体に形成された子球をほぼ8週間後に分離し、そのあと液体培地で8~12週間くらい再び培養する方法がよいと思われる。これはりん

片培養を20週間継続した場合は200 mg以上の子球はわずかに10%であったが(第1表)、りん片培養と液体培地での子球培養を組み合わせた上述の方法によればりん片培養で得られる子球の約70%が培養20週間後には200 mg以上となったこと(第2表)から明らかであり、今後培養した子球をほ場へ移植したあとの栽培条件を明らかにすれば、りん片培養により増殖した子球をほぼ3年で成球に仕上げることも可能となろう。しかしながら、液体培地で培養した子球は低温貯蔵中及び移植後に固形培地で培養したものと比べやや腐敗しやすいので、液体培地で子球を培養した場合は低温処理前やほ場へ移植する前になんらかの順化操作が必要と思われ、今後この点を検討する必要がある。

摘 要

試験管内でりん片外植体に形成されたヒメサユリ子球の生長はそのまま培養を継続するよりも、分離が容易な30 mg前後の大きさになったときにいったんりん片外植体から分離して新鮮な固形培地で再び培養すると、子球の生長が促進された。

分離した子球の生長は固形培地よりも5%のショ糖を含む液体培地で一層促進され、約12週間培養するとよいことがわかった。

液体培地で培養した子球は長期にわたる低温貯蔵やほ場での栽培で、固形培地で培養したものよりやや腐敗しやすい傾向があった。

Table 2. Percentage of each class of the weight of bulblets cultured *in vitro* for 4, 8, 12 and 16 weeks on a solid medium and in a liquid one.

Culture duration (weeks)	Solid medium				Liquid medium			
	less than 100 mg	100~199 mg	200~299 mg	more than 300 mg	less than 100 mg	100~199 mg	200~299 mg	more than 300 mg
4	40	47	13	0	17	65	17	1
8	28	48	20	4	4	32	30	34
12	10	52	23	15	4	23	30	43
16	9	50	25	16	0	25	33	42

Table 3. Number of bulblets cultured on solid or liquid medium for 4 weeks which a) rotted during storage at 4°C for 22 weeks or after transplanting and b) weight gains of survivors.

Culture medium	Number of bulblets stored	Number of bulblets rotted during storage	Number of bulblets rotted after transplanting	Average weight of bulblets		
				At storage (mg)	12 weeks after transplanting (mg)	Gain in weight (%)
Solid	60	0	5	132 ± 8	208 ± 11	158
Liquid	60	12	10	155 ± 8	303 ± 29	195

± indicates standard error of the mean.

引用文献

1. 河原林一郎・浅平 端. 1988. ユリ茎頂部組織の生育に及ぼす培地組成及び培養条件の影響. 園学雑. 57: 258-268.
2. MURASHIGE, T. and F. SKOOG. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
3. NIIMI, Y. and T. ONOZAWA. 1979. *In vitro* bulblet formation from leaf segments of lilies, especially *Lilium rubellum* Baker. *Scientia Hortic.* 11: 379-389.
4. NIIMI, Y. 1985. Factors affecting the regeneration and growth of bulblets in bulb-scale cultures of *Lilium rubellum* Baker. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 54: 82-86.
5. 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 GA_3 処理の効果. 園学雑. 57: 250-257.
6. PIERIK, R. L. M. 1987. In "In vitro culture of higher plants". p.60-63. Martinus Nijhoff publishers. Dordrecht, Boston, Lancaster (ISBN 90-247-3531-9).
7. TAKAYAMA, S. and M. MISAWA. 1979. Differentiation in *Lilium* bulb scales grown *in vitro*. Effect of various cultural conditions. *Physiol. Plant.* 46: 184-190.
8. 高山眞策. 1984. 液体振とう培養による種苗生産の効率化. 植物組織培養 1: 8-13.
9. YOSHIDA, F., T. KOBAYASHI and T. YOSHIDA. 1973. The mineral nutrition of cultured chlorophyllous cells of tobacco. I. Effect of π salts, π sucrose, Ca, Cl and chlorophyll contents and mineral absorption of cell. *Plant & Cell Physiol.* 14: 329-339.