ササユリ球根の *in vitro* における増殖に及ぼす 液体通気培養条件の影響

河原林和一郎

和歌山県農業協同組合連合会 640 和歌山市美園町

Effects of Several Conditions in Aerated Liquid Culture on
in vitro Multiplication of Bulbs of *Lilium japonicum* Thunb.

Waichiro Kawarabayashi

Wakayama Prefectural Federation of Agricultural Co-operation, Wakayama 640

Summary

To establish a practical *in vitro* mass-production system using bulb scales of *Lilium japonicum*, several cultural methods simplifying the process to enlarge the current system were compared. In addition, the effects of cultural conditions on the differentiation and growth of bulblets in aerated liquid culture were investigated.

1. Four cultural methods : (a) liquid medium culture with polyester fiber support; (b) liquid medium culture with horizontal rotation; (c) liquid medium culture with aeration; and (d) capsule culture were tested. Among them, system (c) appeared to be the most practical.

2. Bulblet differentiation was observed after 3 weeks of culture. The number of bulblets increased significantly 5 to 8 weeks after culture initiation but not thereafter. No increase in diameter of bulblets was observed after the 5th week of culture, indicating that additional nutrients should be supplemented to the medium after 8 weeks of culture for subsequent growth of the bulblets.

3. Bulblet differentiation in aerated liquid culture was enhanced, using the medium with 3/4 strength MS macro-elements and $40 \text{ g} \cdot \text{liter}^{-1}$ sucrose.

4. Addition of NAA to the medium promoted bulblet differentiation and its optimal concentration was $0.01 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$. Addition of kinetin or ABA did not promote bulblet differentiation.

5. Bulblets differentiate efficiently when aerated with ambient air ($20.9\% \text{O}_2$), whereas higher oxygen concentration was ineffective. Effects of temperature and light conditions on bulblet development in aerated liquid culture were similar to those of agar culture.

緒 言

ササユリは日本の中部地方以西に広く自生し、古くから人々に親しまれている。しかし、地下遅発芽種子であるため、開花球になるまでに4~5年を必要とし、栽培に関するデータも少ない(仙頭, 1971)。また、山掘り球根の販売や切り花の山採りなどの乱獲もあり、近年、その数は減少しつつあるといわれている(清水, 1987)。そこで、和歌山県では、県内に自生している優良な形質のササユリを大量に増殖できる技術の開発

をめざして、研究に着手した。

筆者らは、すでに、ユリ茎端部組織の培養によって得られる無ウイルス小球根のりん片を用い、寒天培地上での培養で子球を効率良く増殖・肥大促進させるための諸条件を明らかにしてきた(河原林・浅平, 1988, 1989)。しかし、寒天などを支持材とした固体培地では、外植体のりん片を手作業により培地に置床、また、移植を行うことが必要であり、固体培地で培養球根を省力的に大量生産するには、多くの問題点がある。このようなことから、実用的な大量増殖技術を開発するためには、多数の球根材料から培養に供する切片を大

1992年9月21日受理。本報告の概要は、園芸学会平成3年度春季大会および秋季大会で発表した。

量に得るとともに、培地への植え付け、また、栄養分の補給なども容易にできる簡便な培養方法を確立する必要がある。

本研究では、ササユリ球根の実用的な大量増殖技術の開発を目的として、外植体の植え付けや培地交換などの培養の過程を省力化でき、かつ、培養をスケールアップできる可能性が高いと考えられる液体通気培養におけるりん片切片からの子球の分化と生育に及ぼす条件について検討した。また、他のいくつかの培養方法についても比較検討したので、それらの結果をあわせて報告する。

材料および方法

培養材料のりん片は以下のようにして得た。まず、市販のササユリ球根のりん片を、オスバン（塩化ベンザルコニウム 10% w/v 液）の 10 倍液で 30 分間、さらにアンチホルミン（次亜塩素酸ナトリウム 10% w/v 液）の 10 倍液で 10 分間殺菌した後、23℃、暗黒、寒天培地上で培養し、無菌小球根を分化させた。その後、得られた無菌小球根を、70～90 日間、同じ条件の寒天培地上でのりん片培養によって増殖した。増殖した径 5 mm 程度の小球根のりん片を、上部（先端部）と下部（基部）に分割したものを一対として実験に供試した。

寒天培地には、主要塩類および鉄源として Murashige・Skoog の処方（Murashige・Skoog, 1962）、微量要素および有機物質として Ringe・Nitsch の処方（Ringe・Nitsch, 1968）を用い、ショ糖 40 g・liter⁻¹、寒天 8 g・liter⁻¹、生長調節物質として NAA 0.1 mg・liter⁻¹ あるいは 0.01 mg・liter⁻¹ を添加した後、pH 5.7 に調整したものを用いた。培地 50 ml 当たり 16 切片（8 りん片の各上下切片）を植えつけた。

液体培地としては、上記の寒天培地から寒天を除き、主要塩類濃度のみを MS 処方の標準濃度の 3/4 培としたものを用いた。生長調節物質として、NAA を 0.01 あるいは 0.1 mg・liter⁻¹ の濃度になるように添加した。培養は 23℃、暗条件を基本として、5～15 週間行なった。液体培養の方法は、液体培地 20 ml を含浸させたポリエステル繊維支持材に 10 切片を置床した液体支持材培養、水平旋回（82 rpm）した液体培地 20 ml で 10 切片を培養した液体振盪培養、エアープンプと酸素濃縮機（山陽電子工業製）を単独あるいは組み合わせて得た所定の酸素濃度のガスを毎分約 9.6 ml の速度で液体培地 30 ml 中に通気し、18 切片を培養した液体通気培養の 3 種類とした。

カプセル培養では、滅菌水で湿らせた無菌バーミキュライト上に、切片を包埋した直径 7 mm 程度のカプセルを置床した。カプセルは、りん片切片 1 個、アルギン酸ナトリウム 1.5% と殺菌剤として 8 ヒドロキシキノリン 10 ppm、NAA 0.1 mg・liter⁻¹ を含む上記液体培地を、塩化カルシウム 10% 溶液中に滴下して作成した。培養容器として、寒天培養、液体支持材培養、カプセル培養には 200 ml のガラス製培養サンプルビン、水平旋回型液体振盪培養には 100 ml の三角フラスコ、液体通気培養には 60 ml の円筒ロート型ガラス濾過器（細孔記号 G 4）をそれぞれ使用した。

分化程度の調査は、培養 3, 5, 8 あるいは 13 週後に行なった。りん片から分化したコブ状の組織を突起物、生長点様ドームと葉原基様の葉が認められたものを芽、さらに、分化した葉がりん片様に肥大し、球根の形状が認められたものを子球とした。なお、実験方法の詳細は、結果の各項で述べる。

結 果

1. 培養方法の違いとりん片切片からの子球の増殖

外植体の植え付けや培地交換に必要な労力を削減し、かつ、培養をスケールアップできる可能性が高い培養方法として、液体支持材培養、液体振盪培養、液体通気培養を行なった。また、養分と殺菌剤をカプセル中に含有させることによって、有菌下で植物体を分化させ、そのまま順化育成できる可能性があるカプセル培養法も比較検討した。なお、本実験に用いた培地には、NAA を 0.1 mg・liter⁻¹ の濃度になるように添加した。

第 1 表に示したように、比較したいずれの培養方法でも子球の増殖は認められた。しかし、カプセル培養では、球根の分化が認められるまでに 8 週間程度の培養期間を必要とし、子球の生育も遅かった（第 1 図）。また、カプセル内に包埋した切片の切断部位付近が褐変する傾向がみられた。液体支持材培養では、子球の分化時期は他の液体培養の場合とほぼ同じであったが、子球の生育は劣っていた。なお、支持材と培地を同時にオートクレーブ滅菌しているが、オートクレーブ後の培地 pH を測定したところ、4.8 に低下していた。液体振盪培養では、分化した突起物、芽および子球の総和（以後、分化点数とする）は、りん片当たり 11.2 個となり、試みた培養法の中で最も多くなった。しかし、形成された突起物や芽から、さらに球根を形成する割合が 30% 弱と低いため、得られる子球の数は増加しなかった。液体通気培養での子球の増殖数に

Table 1. Effect of various cultural methods on the differentiation and growth of bulblets in scale culture of *L. japonicum*.

Culture method	Culture period (weeks)	% of survival	No. of protuberance and bud per scale (A)	No. of bulblet per scale (B)	% bulblet formation (B/A+B×100)	Diam. of bulblets (mm)
Liquid medium culture						
Polyester fiber support	8	100	2.8	3.2	53.3	1.6
Horizontal rotation (68 rpm)	8	100	8.0	3.2	28.6	2.4
Aeration by air pump (9.6 ml · min ⁻¹)	8	100	3.4	3.2	48.5	2.4
Capsule culture with culture medium						
Alginate bead (1.5%)	15	76.2	0.6	1.8	75.0	1.6

Culture medium : 3/4 strength of MS macro elements + RN micro elements and organics, NAA 0.1 mg · liter⁻¹, 4% sucrose, pH 5.7.

Culture condition : 23°C, Dark.

Culture materials : The scales of 10~20 mg were taken from bulblets differentiated through *in vitro* scale culture and cut off into two segments horizontally.

Fig. 1. Differentiation and growth of bulblets in capsule culture of scale segments of *L. japonicum* (culture period : 15 weeks). **Fig. 2.** Weekly changes in differentiation and growth of bulblets in aerated liquid scale culture of *L. japonicum*.

For culture medium and aeration treatment : See Table 2.

For cultural condition and materials : See Table 1.

についても、液体振盪培養とはほぼ同様の結果が得られた。なお、本実験では、培養4週を経過した段階で、35°C程度の高温に、1~2日遭遇した。

2. 培養中の子球の分化数と球径の経時変化

液体通気培養において分化する子球の数と分化した子球の平均球径について、それぞれの培養期間中の経時変化を調べた。培地のNAA濃度を0.01 mg · liter⁻¹、通気酸素濃度を20.9% (大気) とした場合、あるいはそれぞれ0.1 mg · liter⁻¹、95%とした場合の2種類の条件で培養した。なお、NAA 0.01 mg · liter⁻¹を添加した寒天培地50 mlに対して18切片を置床した寒天培養も行ない、液体通気培養と比較した。

大気による通気培養および寒天培養における子球の

分化数と球径の培養8週までの経時変化を比較した。子球分化の認められる時期は寒天培養の方が早く、培養5週でのりん片当たりの子球数も、寒天培養で4.0個、液体通気培養で2.2個であった。しかし、培養5週から8週にかけては、通気培養における子球の分化が引き続き盛んであり、培養8週後の観察では、寒天培養でみられた子球の分化とはほぼ同様の結果が得られた。

第2図には、通気酸素濃度95%における培養13週までの経時変化を示している。培養3週から子球の分化が認められるようになり、培養8週まで子球数の増加が順調にすすんだ。しかし、その後の増加数は少なく、培養りん片当たりの子球数は培養8週での8.0個に対して、培養13週においても9.2個であった。一

方、子球の分化が認められるようになるとともに平均球径の増加もみられるようになった。しかし、子球数の増加が著しくなる培養5週から8週にかけて、平均球径はほとんど変化しなかった。この平均球径増加の停滞は、分化する子球の数が少なくなった培養8週以降も続いた。

3. 液体通気培養におけるりん片からの子球の増殖

1) 主要塩類濃度の影響

基本培地中のMS主要塩類組成の濃度を1/2倍、3/4倍、1.0倍（標準濃度）および5/4倍とし、りん片切片からの子球の分化と生育に及ぼす影響について検討した。培地のNAA濃度は $0.01 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ とし、通気ガスの酸素濃度は95%とした。

培養8週後の結果を第2表に示した。主要塩類濃度3/4倍の培地で培養したりん片切片が、最も多くの子球を分化し、分化した子球の肥大も良好であった。一方、この濃度より高くしても、また、低くしても、子球の分化と生育を促進することはなかった。特に、5/4倍まで高めると、培養期間が長くなるにつれて褐変・枯死する切片が増加し、分化子球数も減少した。

2) ショ糖濃度の影響

培地中のショ糖濃度を20, 40, 60 および $80 \text{ g} \cdot \text{liter}^{-1}$ とし、りん片切片からの子球の分化に及ぼす影響を調べた。培地のNAA濃度は $0.01 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ とし、通気ガスの酸素濃度は95%とした。

培養8週後の培養状況を第3図に示した。りん片切片からの子球の分化に適した培地のショ糖濃度は $40 \text{ g} \cdot \text{liter}^{-1}$ であり、1りん片当たり7.6個の子球が得られた。 $60 \text{ g} \cdot \text{liter}^{-1}$ の濃度までは、分化した突起物からの不定芽形成あるいは不定芽の球形形成に大きな変化はなかった。しかし、 $80 \text{ g} \cdot \text{liter}^{-1}$ の濃度まで高め

Fig. 3. Influence of sucrose concentration in the medium on the differentiation and growth of bulblets in aerated liquid scale culture of *L. japonicum* (culture period: 8 weeks).

Culture medium: 3/4 strength of MS macro elements + RN micro elements and organics, NAA $0.01 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$, 4% sucrose, pH 5.7.
For condition of aeration: See Table 2.
For cultural condition and materials: See Table 1.

ると、分化点の数は減少しないものの、子球まで生育するものの割合が少なくなり、1りん片当たり得られる子球の数は1.8個となった。

3) 生長調節物質の影響

基本培地中の生長調節物質の種類と濃度を、NAA $0.01 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$, Kinetin $0.5 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$, ABA 0.02 あるいは $0.1 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ とした。通気ガスの酸素濃度は95%とした。さらに、NAAについては、培地中の濃度を0, 0.001, 0.01, $0.1 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ の4

Table 2. Influence of MS macro-elements strength on the differentiation and growth of bulblets in aerated liquid scale culture of *L. japonicum* (culture period: 8 weeks).

Strength of MS macro elements (×)	% of survival	No. of protuberance and bud per scale (A)	No. of bulblet per scale (B)	% bulblet formation (B/A+B×100)	Diam. of bulblets (mm)
1/2	90.6	3.6	5.0	58.1	2.1
3/4	97.3	3.2	8.4	72.4	2.5
1	83.3	3.4	4.8	58.5	2.1
5/4	44.5	2.2	0.4	15.4	2.0

Culture medium: + RN micro elements and organics, NAA $0.01 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$, 4% sucrose, pH 5.7.
Condition of aeration: 95% O_2 by O_2 Enricher (Sanyo Electronic Industries Co.), $9.6 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.
For cultural condition and materials: See Table 1.

Fig. 4. Influence of growth regulators in the medium on the differentiation and growth of bulblets in aerated liquid scale culture of *L. japonicum* (culture period : 5 weeks).

Culture medium : 3/4 strength of MS macro elements + RN micro elements and organics, 4% sucrose, pH 5.7.

For condition of aeration : See Table 2.

For culture condition and materials : See Table 1.

種類として、子球の分化に対する影響について検討した。

培養5週後の結果を第4図に示した。生長調節物質無添加培地では、培養りん片当たりの分化点の総数は3.6個、そのうち子球にまで生育したものは1.8個となった。これに対し、NAA添加培地では、分化点総数は8.6個、子球数は2.6個と、それぞれ増加し、NAAの添加は、りん片切片からの子球の分化を促進した。一方、Kinetin添加培地では、分化点総数は4.6個とやや増加したものの、子球にまで生育するものの割合が小さく、その数は0.2個と少なくなった。ABA添加培地では、分化した突起物から子球にまで生育するものの割合は、NAA添加培地での結果とほぼ同様であったが、分化点の総数は減少した。培養8週後の観察でも同様の傾向がみられ、培養りん片当たりで得られる子球の数は、生長調節物質無添加培地で3.6個、NAA添加培地で7.6個、Kinetin添加培地で1.8個、ABA 0.02および0.1 mg · liter⁻¹添加培地でそれぞれ3.6個、2.4個であった。

子球の分化を促進したNAAについて、さらに、濃度を変えて子球の増殖に及ぼす影響について調べた結果を第3表に示した。りん片当たりの子球分化数の増加に適したNAAの濃度は0.01から0.1 mg · liter⁻¹であった。しかし、0.1 mg · liter⁻¹の濃度では、同

Table 3. Influence of NAA concentration on the differentiation and growth of bulblets in aerated liquid scale culture of *L. japonicum* (culture period: 8 weeks).

NAA (mg · liter ⁻¹)	No. of root per scale	No. of bulblet per scale	Diam. of bulblets (mm)
0	2.8	3.6	2.2
0.001	1.6	4.0	2.1
0.01	7.2	7.8	2.1
0.1	11.0	8.0	2.0

Culture medium : 3/4 strength of MS macro elements + RN micro elements and organics, 4% sucrose, pH 5.7.

For condition of aeration: See Table 2.

For cultural condition and materials: See Table 1.

時に発根数も11.0本と増加し、培養液中に占める根を含む培養物全体の容積がかなり大きくなった。

4) 通気ガス中の酸素濃度の影響

液体培地への通気ガス中の酸素濃度を、20.9% (大気)、65%および95%とし、りん片切片からの突起物と芽および子球の分化に及ぼす影響について調べた。培地のNAA濃度は0.1 mg · liter⁻¹とした。また、寒天培地50 mlに対して18切片を置床した寒天培養を行ない比較した。

培養8週間での結果を第4表に示した。20.9%の酸素濃度ガスを通気した場合、りん片当たり球径2 mm程度の子球が8.8個分化し、寒天培養よりやや増加する傾向があった。通気ガス中の酸素濃度をさらに高めた場合、分化した子球の生長はやや促進されるが、子球の分化に対する促進効果は認められず、培養切片や分化した根の一部が褐変した。

5) 培養温度の影響

培養容器の外気温を18℃、23℃および28℃とした場合のりん片切片からの突起物、芽、子球の分化に及ぼす影響について調べた。培地のNAA濃度は0.01 mg · liter⁻¹、通気酸素濃度は20.9%とした。

培養5週後の結果を第5図に示した。培養りん片当たりの分化点の総数は、23℃で培養したものが最も多く、次いで18℃、28℃で培養したものの順になった。一方、子球までの生育でみると、18℃でも順調に肥大しており、23℃と比較しても同様の結果が得られた。しかし、28℃では、発根が少なく、切片の切断部位付近から褐変しているものもみられた。培養8週後での観察では、23℃でのりん片当たりの分化

Table 4. Influence of O₂ concentration in the aeration gas on the differentiation and growth of bulblets in liquid scale culture of *L. japonicum* (culture period: 8 weeks).

O ₂ concn. in aeration gas (%)	% of survival	No. of protuberance and bud per scale (A)	No. of bulblet per scale (B)	% bulblet formation (B/A+B×100)	Diam. of bulblets (mm)
Solid medium culture Agar (0.8%)	100.0	3.4	8.2	70.7	2.2
Aerated liquid culture					
20.9	100.0	4.6	8.8	65.7	2.1
65.0	100.0	3.2	9.0	73.8	2.3
95.0	97.3	3.2	8.4	72.4	2.5

Culture medium : 3/4 strength MS macro elements + RN micro elements and organics, NAA 0.01 mg · liter⁻¹, 4% sucrose, pH 5.7.

Condition of aeration : 20.9% O₂ by ambient air, 95% O₂ by O₂ Enricher (Sanyo Electronic Industries Co.), 65% O₂ by mixing of ambient air and 95% O₂, 9.6 ml · min⁻¹.

For cultural condition and materials: See Table 1.

Table 5. Influence of light condition on the differentiation and growth of bulblets in aerated liquid scale culture of *L. japonicum* (culture period: 8 weeks).

Light condition	No. of root per scale	No. of protuberance and bud per scale	No. of bulblet per scale	Diam. of bulblets (mm)	Leaf elongating bulblets (%)	No. of leaves	Leaf length (cm)
Dark	11.8	5.8	8.0	2.3	0	—	—
Light	12.8	4.6	7.8	1.8	6.7	1.4	0.5

Culture medium : 3/4 strength of MS macro elements + RN micro elements and organics, NAA 0.01 mg · liter⁻¹, 4% sucrose, pH 5.7.

Condition of aeration: 20.9% O₂ by ambient air, 9.6 ml · min⁻¹.

Light duration and intensity: 16 hr · day⁻¹ and 3,500 lx.

For cultural condition and materials: See Table 1.

Fig. 5. Influence of temperature on the differentiation and growth of bulblets in aerated liquid scale culture of *L. japonicum* (culture period: 5 weeks).

Culture medium : 3/4 strength of MS macro elements + RN micro elements and organics, NAA 0.01 mg · liter⁻¹, 4% sucrose, pH 5.7.

Condition of aeration : 20.9% O₂ (ambient air), 9.6 ml · min⁻¹.

Light condition : Dark.

For cultural materials : See Table 1.

子球数 8 個に対して, 18 °C で 6 個であり, 分化した突起物からの子球への生育・肥大についても 23 °C の方が適していた。

6) 照明の影響

前項までの実験では, すべて暗条件の下で培養を行ってきた。本項では, 明条件の下で通気培養を行った場合, りん片切片からの子球の分化と生育がどのように影響されるかについて調べた。明条件として, 昼光色蛍光灯により 16 時間日長, 3,500 lx の照明を行ない, 暗条件での培養と比較した。NAA の添加濃度は 0.01 mg · liter⁻¹ とし, 通気ガスの酸素濃度は 20.9% とした。

培養 8 週後の結果を第 5 表に示した。明条件, 暗条件ともに, 子球の増殖および発根は良好であった。暗条件の場合, 葉の伸長が認められなかった。一方, 明条件では, 培養切片から分化した子球の約 7 % が葉を伸長しており, また, 球径がやや小さく, 発根数がやや多くなる傾向があった。

考 察

液体培養法では、培養切片の置床に要する作業が大幅に省力化できる。この液体培養法のうち、通気培養法は静置した培養槽に空気などを吹き込むだけでよい。これに対して、培養槽自体を動かす必要のある振盪培養法では、無菌状態を長期間維持しながら培養できる大型装置の製作に、かなりの経費を必要とするであろう。このことから、通気培養法の方が、よりスケールアップに適していると考えられる。

結果1においては、この液体通気培養による培養8週後の結果が他項の実験結果と比較して劣っていた。この場合、培養4週を経過した時点で、35℃程度の高温に1~2日遭遇している。一方、りん片からの子球分化の経時変化をみた結果2によると、培養3週頃から子球の分化が認められるようになり、5週から8週頃にかけて子球数が増加している。また、結果5で培養温度を28℃一定とした場合、子球の分化が抑制された。このことから、培養4週を経過した時点は、子球が分化・生育しつつある段階にあり、温度その他のストレスを受けやすい時期であった可能性が考えられ、この時期の高温によって子球の増殖が阻害されたのかもしれない。いずれにせよ、この点については、今後、子球の生育段階による温度の影響の違いなどについても検討し、明かにしておく必要がある。

液体支持材培養でも、培地交換や培地の補給が容易であることから培養の効率化がはかれる。しかし、外植体の植え付け作業や培養スペースの利用などについては、固体培養と同程度の効率であると考えられるため、他の液体培養法ほどの省力化は難しいかもしれない。なお、本培養法で、子球の生育がかなり劣っていた。これは、培地を支持材に含浸させた状態でオートクレーブしたため、培地のpHが培養開始時に既にかなり低下していたことが影響を及ぼしていた可能性も考えられる。いずれにせよ、液体支持材培養法では、高照度、炭酸ガス施与、湿度低下などの培養植物の順化に有効な処理が固体培養と同様に行なえるので、このような処理を必要とする植物には適しているであろう。しかし、ササユリのように鉢上げの容易な球根類では、それほど利点がないと考えられる。

カプセル培養でも子球は形成されたが、その分化や生育が遅く、また、切片の切断部位付近が褐変化しやすいので、効率よく球根を増殖することができなかった。しかし、この培養法の場合、有菌下でプラグセルトレイなどに機械的に植えつけたカプセル内で、りん

片切片を短期間培養しながら子球を分化させ、そのまま栽培へと移行し、いわばプラグセル球根といったものを作成できる可能性も考えられる。したがって、切片の生存率の向上、子球の分化・生育の促進をはかるため、カプセル内への酸素透過率の向上などについて検討を試みることも価値があろう。以上の結果を総合的に考慮すると、りん片切片から子球を大量に増殖する実用的な培養法として、液体通気培養法を用いることが、現時点では最も適していると考えられる。

りん片切片からの子球の分化数と分化した子球の平均球径について、液体通気培養13週までの経時変化を調べたところ、子球の分化は3週から8週にかけて急激に増加し、その後少なくなっていた。一方、その平均球径の変化をみると、3週から5週にかけて肥大が認められた後はほぼ同じ数値で推移し、その傾向は子球の分化数が少なくなる8週以降も続いていた。このことから、分化した子球の生長に必要な培地の栄養分は、培養8週頃には既に不足してきていることが推測された。実際、培地組成の経時変化を調べた別の実験では、培養8~10週頃に、子球の肥大に関連が深いと考えられる糖分を含む栄養分が欠乏してくることが示された(河原林, 1992)。したがって、さらに子球を効率よく肥大させるためには、新たな培地栄養分の補給が必要になるであろう。

液体通気培養において、りん片切片から子球を効率よく分化させる培地の主要塩類濃度やシヨ糖濃度は、寒天培地で用いている濃度よりも高くすると、抑制的な効果を示すようであった。やや低濃度にしておくと、子球の分化は早まる傾向がみられた。これは、液体培地では、栄養分などの吸収が寒天培地と比較して、効率よく行なわれることを示唆している。分化する子球数が少なくなってくる培養8週での結果から判断すると、主要塩類組成はMS標準濃度の3/4倍とやや低い濃度が、シヨ糖濃度は寒天培地と同じ4%程度が適していると思われる。

培地中の生長調節物質についてみると、寒天培養と同様、NAAの添加は子球の分化促進に有効で、NAA濃度としては、0.01あるいは $0.1 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ が適していた。また、 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ の濃度では、発根数が低濃度の場合より多かった。液体培養の場合、栄養分は根以外の培地に接触した部位からも吸収可能である。また、球根植物では、鉢上げ後の生育・順化は、発根していない場合でも比較的容易である場合が多い。さらに、培養スペースの利用効率、子球の培養容器か

らの取り出しや切断処理の際の操作性の点でも、根量が少ない方が望ましい。これらのことから、培地のNAA濃度は発根の少ない $0.01 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ の方がより適していると考えられる。

生長調節物質としてKinetinあるいはABAを用いた場合、ヤマユリ(Takayama・Misawa, 1982)やテッポウユリ(高山ら, 1986)などでの報告と異なり、りん片切片からの子球の分化促進効果を示さなかった。供試材料の内生的なホルモンレベルなどの生理状態における差異がKinetinやABAの効果に何らかの影響を及ぼしたことも考えられるが、その正確な原因は不明であり、処理濃度を変えるなど、さらに検討が必要である。

通気ガスとしては酸素濃度20.9%すなわち大気を用いても、りん片切片からの子球の分化は寒天培養の場合とはほぼ同様に認められた。酸素濃度をさらに高めても、子球の分化は特に促進されることはなかった。液体通気培養によるカルス増殖では、通気ガス中の酸素濃度を高めると、その増殖速度が向上することが報告されている(加藤, 1982)。このことは、カルスなどの培養細胞の増殖が好气的であり、しかも対数増殖期にあるような増殖の早い細胞では呼吸活性が大きく、酸素の消費量が增大する(Lamport, 1964)ことと符合する。一方、りん片からの子球の増殖は、分化開始から子球の肥大まで長時間を必要とする現象であり、カルスの対数増殖期のように短時間に活発な細胞分裂が進行するものではない。したがって、呼吸量の急激な増大はみられず、培養期間全体にわたり酸素の消費量も比較的少ないレベルで推移していたことが考えられる。なお、通気ガスとして大気を使用することは、高濃度の酸素ガスを用いる場合と比較して、培養装置を簡易化するうえで有利であり、安全性の面からも望ましいであろう。

培養温度がりん片切片からの子球の分化に及ぼす影響についてみると、 18°C まで温度を低下させても、 23°C の場合と比較して分化子球数はやや少なくなる程度であった。しかし、 28°C に高めると、子球の分化、発根ともに明らかに抑制される傾向が認められた。山岸(1991)もササユリ球根の培養温度の影響について調べ、 20°C で球根の肥大が最もすすむことを報告している。一方、りん片切片の通気培養中における光の影響については、子球の分化に明条件と暗条件とでほとんど差異はみられなかった。しかし、前者の場合、分化した子球からの葉の伸長や発根がやや多くなる傾

向が認められた。テッポウユリりん片の寒天培養でも、明条件で葉の伸長促進が認められている(Stimart・Ascher, 1978)。これらのことを考慮すると、子球の分化と肥大は、 28°C 以上のような高温を避ければ、 23°C からやや低温側を中心とした比較的広い温度範囲で良好であり、また、光の有無による大きな差異は認められないといえる。このことから、ある程度の温度制御ができる部屋を準備できれば、液体通気培養による子球増殖は可能であろう。

本研究の結果から、寒天培養以外の培養方法を用いたササユリ球根の実用的な増殖の可能性が確かめられた。特に、培養をスケールアップすることが比較的容易であると考えられる液体通気培養において、大気を通気するだけで、寒天培養と同程度以上に子球を増殖できることが確かめられた。今後、実用的な増殖技術を確立するために、分化した子球を効率よく肥大させる条件を設定し、培養のスケールアップを簡素化するとともに、液体培養球根の栽培特性や遺伝的変異の可能性を明らかにすることが必要である。

摘 要

ササユリ球根の実用的な大量増殖技術の開発を目的として、りん片培養の過程を省力化でき、かつ、培養をスケールアップできる可能性が高いと考えられるいくつかの培養方法について比較検討するとともに、液体培地中におけるりん片切片からの子球の増殖に及ぼす培養条件の影響について検討した。

1. 液体支持材培養、液体振盪培養、液体通気培養およびカプセル培養を比較・検討した結果、りん片切片から子球を大量に増殖する実用的な培養方法としては、液体通気培養が最も適していると考えられた。

2. りん片切片からの子球の分化は、培養3週から8週にかけて急激に増加し、その後の増加数は少なくなった。平均球径の増加は、3週から5週にかけてみられた後、停滞し、その停滞は子球の分化が少なくなる8週以降も続いた。したがって、子球を効率よく肥大させようとする場合、培養8週頃以降には、新たな培地の補給が必要であると推測された。

3. 液体通気培養において、培地の主要塩類濃度やシヨ糖濃度を、寒天培養における場合と同程度あるいはやや低くすると子球の分化が早まる傾向があった。培養8週での培養結果からみると、主要塩類濃度はMS標準濃度の3/4倍が、シヨ糖濃度は4%程度が適していると考えられた。

4. 液体通気培養における培地中の生長調節物質と

して、NAA が子球の分化促進に有効であった。NAA の濃度は、子球増殖率、培養スペースの有効利用、増殖した子球の取扱いの容易さなどを考慮すると、 $0.01 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ が適していた。Kinetin や ABA の添加は、子球の分化を抑制した。

5. 通気ガス中の酸素濃度としては、20.9% (すなわち大気) が子球の分化に適しており、酸素濃度をさらに高めても子球分化に対する促進効果は認められなかった。培養温度については、子球の分化を抑制するような 28°C 以上の高温を避ければ、 23°C を中心としたやや低温側の広い温度範囲で培養できることがわかった。培養中の光の影響については、明条件と暗条件とで、子球の分化にほとんど差はみられなかったが、前者では、分化した子球からの葉の伸長や発根がやや多くなる傾向が認められた。

引用文献

- 加藤 陽. 1982. タバコ細胞の工業培養生産に関する研究. 醗酵工学 60 : 105-118.
- 河原林和一郎・浅平 端. 1988. ユリ茎端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.
- 河原林和一郎・浅平 端. 1989. ウイルスフリー・ユリ球根の *in vitro* における増殖. 園学雑. 58 : 195-209.
- 河原林和一郎. 1992. ササユリ球根の大量増殖技術の開発. (第3報). 液体培養における培地組成の経時変化, 子球の生長に及ぼす培養温度の影響および簡易培養槽による培養のスケールアップ. 園学雑. 61 (別1) : 446-447.
- Lamport, D. T. A. 1964. Cell suspension cultures of higher plants : Isolation and growth energetics. Exp. Cell Res. 33 : 195-206.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15 : 473-497.
- Ringe, F. and J. P. Nitsch. 1968. Conditions leading to flower formation on excised Begonia fragments cultured *in vitro*. Plant Cell Physiol. 9 : 639-652.
- 仙頭照康. 1971. 四国地方におけるササユリに関する研究. (第2報). 日照制限がササユリの生育に及ぼす影響について. 愛媛大学農学部農場報告 2 : 31-35.
- 清水基夫. 1987. 原種 日本のユリのなかま. ササ (笹) ユリ. p. 53-56. 清水基夫編著. 日本のユリ. 誠文堂新光社. 東京.
- Stimart, D. P. and P. D. Ascher. 1978. Tissue culture of bulb scale sections for asexual propagation of *Lilium longiflorum* Thunb. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 103 : 182-184.
- Takayama, S. and M. Misawa. 1982. Regulation of organ formation by cytokinin and auxin in *Lilium* bulb scales grown *in vitro*. Plant Cell Physiol. 23 : 67-74.
- 高山真策・深野真弓・天羽孝子. 1986. 組織培養によるユリの繁殖に関する研究. (第9報). ABA による球根形成の促進について. 園学要旨. 昭 61 秋 : 336-337.
- 山岸真澄. 1991. 培養温度がササユリ球根の肥大, 形態, 呼吸量, 糖の吸収に及ぼす影響. 園学雑. 60 (別2) : 562-563.