液体振とう培養におけるササユリ球根の生育に及ぼす窒素源、リン酸イオンおよび硫酸イオンの影響

春木和久¹・山田員人²・細木高志¹・太田勝巳¹

¹島根大学生物資源科学部 690 島根県松江市西川津町

²島根県農業試験場 693 島根県出雲市芦渡町

Effects of Nitrogen Source, Phosphate and Sulfate in Liquid-Shaking Culture on the Growth of Miniature Bulbs of *Lilium japonicum* Thunb.

Kazuhisa Haruki¹, Kazuto Yamada², Takashi Hosoki¹ and Katsumi Ohta¹

¹Faculty of Life and Environmental Science, Shimane University, Nishikawatsu-cho, Matsue, Shimane 690

²Shimane Agricultural Experiment Station, Ashiwata-cho, Izumo, Shimane 693

Summary

For liquid-shaking culture of bulbs of *Lilium japonicum* Thunb., we analyzed the concentration changes in macro-inorganic ions in the culture media to clarify their relationships with bulb growth.

1. Inorganic ions, SO_4^{2-} , NH_4^+ , and especially H_2PO_4^- were consumed in large quantities by bulbs during culture, whereas the consumption of K^+ , Mg^{2+} , and Ca^{2+} was very slow.

2. The optimum concentration of NH_4^+ for bulb enlargement was 10-20 mM. The application of NO_3^- alone or NH_4^+ higher than 30 mM as nitrogen source retarded the bulb growth. Root elongation was promoted by application of NO_3^- as the sole nitrogen source.

3. Root growth was poor in the medium containing a high ratio of $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$. Application of glutamine instead of NH_4^+ promoted root growth.

4. The in vitro rooted bulbs sprouted and bolted abundantly after planting in the soil. Based on the above results, bulbs should be cultured first in a medium containing NH_4^+ for bulb enlargement and then transferred to a NH_4^+ free medium for root development. These treatments improved shoot growth after transplanting.

5. Although the absorption rate of H_2PO_4^- from the medium with the high concentration of NaH_2PO_4 was higher than that from the medium with the low concentration, bulb enlargement was not promoted.

6. High concentration of SO_4^{2-} in the medium inhibited bulb growth.

緒 言

組織培養において培地組成は生育に影響を及ぼす重要な条件の一つであり、基本培地の選択がその後の生育に及ぼす影響は大きい。Murashige-Skoog (MS) 培地 (Murashige・Skoog, 1962) あるいは B5 培地 (Gamborg ら, 1968) など一般によく用いられているが、これらの培地はタバコカルスやダイズの培養細胞を対象にして考案されたもので、培養する作物ある

いは培養方法によって必ずしも最適とはいえない。ニンジン (Tsuji ら, 1993) あるいはジャガイモ (Kozai ら, 1995) の液体培養などでは、培地成分あるいは培地量と培養物の生育との関係について養分吸収の面から検討され、これらの培地を一部修正する必要があることが示されている。

ササユリの培養に関しては、これまでに多くの報告があり (Fukui ら, 1989; Tanaka ら, 1991; 浅尾ら, 1992; 市川, 1993; 河原林, 1993; 水口ら, 1994; 水口・大川, 1994; Niimi, 1995), ショ糖の添加量, サイ

トカイニンあるいはオーキシンの種類と濃度などについて検討されているが、培地の無機成分の添加濃度あるいは培養中の濃度変化に関する報告はほとんどみられない(河原林, 1992)。筆者らは液体振とう培養では固体培地に比べて短期間でササユリ球根を肥大させることができる可能性を指摘し(春木・山田, 1992)、さらにその培養条件を検討してきた。その中で、培養中に減少量の多い無機多量成分についてその添加量を検討したところ、窒素源の種類およびリン酸濃度が球根の肥大あるいは定植後の生育に影響を及ぼすことが明らかとなったので報告する。

材料および方法

1. 培地中の無機多量成分濃度の変化

鳥根県吉田村で採取したササユリ(*Lilium japonicum* Thunb.) 1個体からりん片繁殖させたクローン'T2-11B'のりん片切片をホルモン無添加MS培地で培養して得られた約1gの小球を材料とした。ショ糖にかえてブドウ糖3.0%を添加し、1N NaOHでpH 5.8に調整した後オートクレーブで滅菌したMS培地(春木・山田, 1992)を150 ml入れた300 ml容三角フラスコ3個に小球を15個ずつ入れ、直径10 mmの除菌フィルター付きのサンキャップシート(岩城硝子)でふたをして20℃暗黒条件、100 rpm(巡回式)で液体振とう培養を行った(培養条件は以下の実験と同様とする)。培養開始時を含めて10日間隔で4回、約1.5 mlの培地を採取し、硝酸イオン(NO_3^-)、硫酸イオン(SO_4^{2-})、リン酸イオン(H_2PO_4^-)、アンモニウムイオン(NH_4^+)、カリウムイオン(K^+)、マグネシウムイオン(Mg^{2+})、カルシウムイオン(Ca^{2+})の濃度を測定した。

2. 窒素源と球根の生育

培地に含まれる NH_4^+ と NO_3^- の比率について検討した。MS培地の NH_4^+ と NO_3^- の濃度をそれぞれ0/60 mM, 10/50 mM, 20/40 mM, 30/30 mMおよび40/20 mMに変更し、ショ糖のかわりにブドウ糖3.0%を添加して用いた。培地成分の調整は硝酸アンモニウム(NH_4NO_3)、硝酸カリウム(KNO_3)、硝酸ナトリウム(NaNO_3)、塩化アンモニウム(NH_4Cl)を用いて行った。培地の無機イオン濃度は、全ての区で浸透ポテンシャルがほぼ等しくなるように塩化ナトリウム(NaCl)を0~20 mM添加して20℃での全無機塩による浸透ポテンシャルが-0.32 MPになるように調整した(吉田, 1972)。また、培地は1N NaOHを用いてpH 5.8に調整し、その後オートクレーブで

滅菌した。

培地は300 ml容三角フラスコに150 mlずつ分注し、りん片培養で得られた0.1~0.2 gの小球(平均約0.15 g)を各フラスコに10個ずつ入れ、振とう培養を行った。各区3フラスコずつ用い、培地の更新は120日目までは30日ごとに、その後は15日間隔で2回行い、合計150日間培養を続けた。培養開始時と培地更新時に球根重量、培地残存量、培地中のブドウ糖、 H_2PO_4^- 、 NH_4^+ および NO_3^- 濃度を測定し、培養中の積算吸収量を計算した。

培地の NH_4^+ をグルタミン(GLN)にかえて実験を行った。GLN、 NH_4^+ および NO_3^- の濃度はそれぞれ10/0/40 mM, 5/0/50 mM, 0/10/50 mMとなるように上記と同様にして調整した。pHは1N NaOHで5.8に調整した後オートクレーブで滅菌した。りん片培養で得られた約0.2 gの小球を、150 mlの培地を入れた300 ml容三角フラスコに10個ずつ入れ、各区3フラスコずつ用いて実験を行った。培地は30日ごとに2回更新し、その後20日間培養を続けた後、球根および根の重量を調査した。

3.0%ブドウ糖を添加したMS培地で約4か月間液体振とう培養して得られた約1.0 gの球根を各フラスコに10個ずつ供試し、GLN、 NH_4^+ および NO_3^- の濃度をそれぞれ10/0/40 mM, 0/0/60 mMおよび0/20/40 mMになるように上記と同様にして調整し、pH 5.8とした培地で培養した。各区3個のフラスコを実験に用い、培養30日後に培地を更新し、さらに20日間培養を続けたのち発根率、球根および根の重量を測定した。また、培養中に10日間隔でGLN、 NH_4^+ および NO_3^- 濃度を測定した。

窒素源の異なる培地で培養した球根の定植後の生育をみるために、約6か月間液体振とう培養して得られた約2 gの球根を、前述と同様にしてGLN、 NH_4^+ および NO_3^- を組み合わせ、pHを5.8に調整した培地(250 mlの培地を入れた500 ml容三角フラスコを各区2個使用)で60日間培養した(15日ごとに培地を更新)。得られた球根はホルモン無添加MS培地(ショ糖3.0%、ジェルライト0.2%で固化)に移植し、5℃暗黒条件で3か月間低温処理したのち、バーミキュライトを入れた直径30 cmの素焼き鉢に定植し、昼温(8時~17時)23℃、夜温17℃になるように調節したガラス室に置いて60日後に発芽状況を調査した。

3. リン酸濃度と球根の生育

約0.25 gの小球を、ブドウ糖3.0%添加のMS培地

(1 倍区) および H_2PO_4^- 濃度を変更した培地で液体振とう培養し、球根の生育状況を比較した。 H_2PO_4^- 濃度は培地にリン酸二水素ナトリウム ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) を 1.25 mM (2 倍区) あるいは 2.5 mM (3 倍区) 添加することによって変更した。 pH は、 H_2PO_4^- 濃度調整後 1N NaOH で 5.8 に調整し、その後オートクレーブで滅菌した。 培地の浸透ポテンシャル調整は、添加する濃度のごくわずかであるのでとくに行わなかった。 培地更新は 30 日間隔で 4 回行い、最後の培養は 15 日で打ち切った。 更新時と培養終了時に球根重量を、また、培養開始時および更新時に培地の量ならびにブドウ糖、 NH_4^+ 、 NO_3^- および H_2PO_4^- の濃度を測定し、培地の更新ごとに各成分の吸収量を計算して積算吸収量を求めた。

さらに、培地更新時に $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ を一括して添加するばかりでなく、培養中に分割して添加していく施用方法について検討した。 添加量は H_2PO_4^- 濃度が前述の 3 倍区と等しくなるように 2.5 mM とし、培養開始時に一括添加区と培養中に 10 日間隔で 1.25 mM ずつ濃度が増加するように分割して添加する区を設けた。 対照として MS 培地を用いる標準区を設けた。 pH は上記と同様にして 5.8 に調整し、培養中に添加するための NaH_2PO_4 溶液は 0.1N NaOH で 5.8 に調整したものをを用いた。 また、培地は 30 日間隔で 5 回更新した。

得られた球根は、バーミキュライトを入れた直径 30 cm 素焼き鉢に定植して 60 日後に生育を調査した。

4. 硫酸イオン濃度と球根の生育

硫酸ナトリウム (Na_2SO_4) を MS 培地に添加して球根の生育を比較した。 添加量は、0、1.6 mM および 3.2 mM とし、浸透ポテンシャル調整はとくに行わなかった。 pH は、培地作成後 1N NaOH で 5.8 に調整し、その後オートクレーブで滅菌した。 培養には約 0.2 g の小球を用いた。 培地更新は培養 30 日後、60 日後および 75 日後に行い、全培養期間は 90 日とした。 また培地更新前後で、培地の残存量、 NH_4^+ 、 NO_3^- 、 H_2PO_4^- 、 SO_4^{2-} およびブドウ糖濃度を測定し、培養中の積算吸収量を算出した。

5. 培地成分の測定法

NH_4^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} および Ca^{2+} はイオンクロマトグラフィー (DX-100, 日本ダイオネックス) を用い、 NO_3^- および SO_4^{2-} はキャピラリー電気泳動装置 (Waters クォンタ 4000, 日本ウォーターズ・リミテッド) を用いて測定した (Jones・Jandik, 1991),

H_2PO_4^- はリン・バナド・モリブデン酸法 (中村・貝沼, 1989) によって測定した。 ブドウ糖は、臨床血液検査用試薬グルコース CII テストワコー (和光純薬) を用いて測定した。

GLN 濃度は HPLC を利用し、PICO-TAG 法 (Waters PICO-TAG 法) および桑野ら (1987) の方法を簡易化して測定した。 すなわち、試験管にエタノール 0.7 ml, トリエチルアミン 0.1 ml, チオイソシアン酸フェニル 0.1 ml をいれ、よく混合したのち、試料 (培地) を 0.1 ml 添加混合して 20 分間室温で放置した。 その後、9 ml の希釈液 (5% アセトニトリル - 5 mM リン酸ナトリウム緩衝液, リン酸で pH 7.4 に調整) で希釈し、0.45 μm のフィルターで濾過した試料を HPLC で分析した。 カラムは Wakopak WS5C18 20 cm (和光純薬), 溶離液は PICO-TAG 溶離液 A (和光純薬) を用い、流速 1.0 ml/min とし、254 nm の吸光度で測定して定量した。

結 果

1. 培地中の無機多量成分濃度の変化

培地の pH はオートクレーブ後には 4.7 に低下し、この培地で培養したところ、30 日後には 3.5 まで低下した。

培養開始時の各成分の濃度を 100% とした場合の濃度変化を第 1 図に示した。 30 日の培養期間中に減少した成分は H_2PO_4^- 、 SO_4^{2-} 、 NH_4^+ および NO_3^- であり、なかでも H_2PO_4^- はとくに減少が早かった。 また、窒素源のうち NO_3^- は NH_4^+ より吸収が遅く、調査終了時には 75% 程度残存していた。 K^+ 、 Mg^{2+} および Ca^{2+} は減少率のごくわずかで、培養終了時には培養開始時の 90-95% が残存していた。

2. 窒素源と球根の生育

全窒素量を等しくし、 NH_4^+ と NO_3^- の比率をかえて培養した場合の球根重量の変化を第 2 図に示した。 球根重量の増加は、20/40 mM 区および 10/50 mM 区で大きく、培養終了時には他の区に対して有意差が認められた。 NH_4^+ を含まない 0/60 mM 区および NH_4^+ の最も多い 40/20 mM 区では他の区に比べて球根の生育は劣った。 一部の区で培地の pH を測定したところ、オートクレーブ後 (培養開始時) は、20/40 区、0/60 区とも 4.8 で培地更新時にはそれぞれ 3.4 と 4.2 まで低下していた。

培地成分の積算吸収量を第 1 表に示した。 ブドウ糖および H_2PO_4^- の吸収量は球根重量の増加にはほぼ対応し、20/40 mM 区および 10/50 mM 区で多く、他の区

Fig. 1. Changes of inorganic ion concentrations in MS (glucose 3%) liquid-shaking culture medium on culturing bulbs of *Lilium japonicum*. The concentrations were analyzed every ten days. The values were ratio of measured concentrations to initial concentration.

Fig. 2. Effects of the $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ ratio (0/60, 10/50, 20/40, 30/30, 40/20 mM) in liquid-shaking culture medium on increasing in fresh bulb weight of *Lilium japonicum*. The medium was renewed at the time of the measurement of bulb weight. Different letters indicate significant differences by Duncan's multiple range test (5% level).

Table 1. Effects of the $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ ratio in liquid-shaking culture medium of *Lilium japonicum* on cumulative absorption of glucose, H_2PO_4^- , NH_4^+ and NO_3^- per bulb.

NH_4^+ (mM)	NO_3^- (mM)	Glucose ² (g)	H_2PO_4^- (mmol)	NH_4^+ (mmol)	NO_3^- (mmol)
0	60	0.35 c ^y	0.041 b	—	0.30 c
10	50	0.82 a	0.060 a	0.62 a	0.52 a
20	40 ^x	0.87 a	0.063 a	0.59 a	0.40 ab
30	30	0.64 b	0.044 b	0.60 a	0.32 bc
40	20	0.33 c	0.021 c	0.27 b	0.14 d

² The values were calculated based on the medium volume and concentration of each component in culture flasks.

^y Different letters within columns indicate significant differences by Duncan's multiple range test (5% level).

^x NH_4^+ and NO_3^- concentrations were nearly equal to MS medium.

に対して有意差があった。窒素源のうち NO_3^- の吸収量は球根重量の増加とはほぼ同様な傾向を示し、 $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ 比の影響がみられたが、 NH_4^+ の吸収量は 10/50 mM, 20/40 mM および 30/30 mM 区でほとんど差がなかった。40/20 mM 区では NH_4^+ および NO_3^- のいずれも吸収量が大幅に低下した。

第3図に培養終了時の球根の状態を示した。 NH_4^+ を 20 mM 以上含む区では、1 mm 程度の突起状の根がみられたが、褐変して伸長していなかった。これに対して、10/50 mM 区では太い根が 2~3 cm に伸びており、0/60 mM 区では球根肥大は劣るものの、根が長く伸長し、フラスコ内に充満した。

NH_4^+ のかわりに GLN を添加して培養した結果を第2表に示した。 NH_4^+ を添加した区に比べて GLN を 5 mM 添加した区では重量が小さく、逆に GLN を 10 mM 添加した区では大きくなった。また、GLN 添加区では全ての球根で根が伸長し、フラスコ内に充満した。球根重量に占める根の割合 (RW/BW) も GLN 添加区で大きかった。

液体振とう培養で約 1 g に生育したものの根が伸長していない球根を窒素源の異なる培地で培養した結果を第3表に示した。培養終了時の球根重量はいずれの区も有意差がなかったが、 NH_4^+ 添加区では根の伸長した球根はわずかであったのに対して、 NO_3^- のみ、あるいは GLN 添加区ではすべての球根で根が伸長した。

第4図に培地中の GLN, NH_4^+ および NO_3^- の濃度変化を示した。 NO_3^- はいずれの区でも培養中に 5~10 mM 程度の濃度低下がみられたが、培地更新時に

Fig. 3. Effects of the $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ ratio in liquid-shaking culture medium on bulb enlargement and root elongation of *Lilium japonicum* after 150-day culture. A: Bulbs cultured in the medium containing 60 mM NO_3^- (1), 10 mM $\text{NH}_4^+ / 50$ mM NO_3^- (2), 20 mM $\text{NH}_4^+ / 40$ mM NO_3^- (3), 30 mM $\text{NH}_4^+ / 30$ mM NO_3^- (4), 40 mM $\text{NH}_4^+ / 20$ mM NO_3^- (5), respectively. B: Bulbs cultured five months in the flasks containing 60 mM NO_3^- (left) and 20 mM $\text{NH}_4^+ / 40$ mM NO_3^- (right).

Table 2. Effects of glutamine (GLN) in liquid-shaking culture medium of *Lilium japonicum* on bulb weight and root elongation.

GLN (mM)	NH_4^+ (mM)	NO_3^- (mM)	Bulb weight (g)	Bulbs with elongated roots (%)	$\text{RW}^z / \text{BW}^y$ (%)
10	0	40	1.30 a ^x	100	45
5	0	50	0.79 c	100	37
0	10	50	1.01 b	40	12

^z Root weight.

^y Bulb weight.

^x Different letters within columns indicate significant differences by Duncan's multiple range test at 5 % level.

Table 3. Effects of glutamine (GLN) and NH_4^+ in liquid - shaking culture medium of *Lilium japonicum* on bulb weight and root elongation.

GLN (mM)	NH_4^+ (mM)	NO_3^- (mM)	Bulb weight (g)	Bulbs with elongated roots (%)	$\text{RW}^z / \text{BW}^y$ (%)
10	0	40	2.32	100	5
0	0	60	1.94	100	12
0	20	40 ^w	2.11	17	2
			NS		

^z Bulbs without elongated roots, which had been cultured in MS medium with 3 % glucose for 120 days, were tested.

^y Root weight.

^x Bulb weight.

^w NH_4^+ and NO_3^- concentrations were nearly equal to MS medium.

^{ns} Nonsignificant by Duncan's multiple range test at 5 % level.

多量に残存していた。 NH_4^+ 添加区においては、 NH_4^+ は NO_3^- に比べて吸収量が多く、15～20 mM の濃度低下となり、培地更新時の残存量は 10 mM 前後であった。GLN は培養開始とともに急速に吸収され、培地

更新時にはほとんどすべてが吸収された。

第 4 表に窒素源の異なる培地で培養した球根の定植後の生育状況を示した。定植時の球根重量には有意差はなく、GLN 添加区および NO_3^- のみ添加区ではほと

Fig. 4. Changes of glutamine, NH_4^+ and NO_3^- concentrations in the liquid-shaking culture medium on culturing bulbs of *Lilium japonicum*. The concentrations were analyzed every 10 days after culture initiation. The medium was renewed at one month after culture initiation.

Table 4. Effects of glutamine (GLN), NH_4^+ and NO_3^- in the liquid-shaking culture medium on the bulb growth of *Lilium japonicum* in vitro and postplanting performance in the soil.

Treatment ^z			60 days after culture		60 days after planting in the soil			
GLN (mM)	NH_4^+ (mM)	NO_3^- (mM)	Bulb weight (g)	Bulbs with elongated roots (%)	Sprouting (%)	Bolting (%)	Leaf count per bulbs	Leaf count on boltig bulbs
10 -	0 -	40	4.39	90	80	60	4.0a ^y	5.5
0 -	0 -	60	4.79	85	95	70	4.5 a	5.6
0 -	20 -	40 ^x	4.28	0	60	10	1.4 b	5.0
		NS						NS

^z Bulbs without elongated roots, which had been cultured in MS medium with 3% glucose for 180 days, were transferred into the three tested media.

^y Different letters within columns indicate significant differences by Duncan's multiple range test at 5% level.

^x NH_4^+ and NO_3^- concentrations were nearly equal to MS medium.

^{ns} Nonsignificant at 5% level.

んどすべての球根で発根していたのに対して、標準区では発根個体は全くなかった。定植後の発芽率、抽だい率および平均葉数は発根した球根で高かった。抽だいたした個体の葉数はいずれの区も差がなかった。

3. リン酸イオン濃度と球根の生育

H_2PO_4^- 添加量と球根重量についての結果を第5表に示した。いずれの区でも球根重量に有意な差はなく、ブドウ糖、 NH_4^+ 、 NO_3^- および SO_4^{2-} の積算吸収量に差はなかった。しかし、 H_2PO_4^- 吸収量は培地への添加濃度にほぼ比例して増加した。培地更新時に古い培地の H_2PO_4^- 濃度を測定した結果を第6表に示した。

標準区および2倍区では第2回培地更新以降は、培地更新時に H_2PO_4^- はほとんど残存していなかった。

H_2PO_4^- を培地に追加した場合には、オートクレーブ後に培地が濁る現象がみられ、とくに3倍区で顕著であった。そこで、培養途中での H_2PO_4^- 追加を検討し、その結果を第7表に示した。球根重量およびブドウ糖の積算吸収量には有意差がなかったが、 H_2PO_4^- は3倍量培養開始時全量添加区で多く、次いで3倍量培養中追加区、標準区の順になった。培養開始時のpHは、3倍量培養開始時全量添加区では5.0、無添加区では4.6であり、培地更新時にはそれぞれ3.7、

3.2まで低下した。また、培養中追加区では3.8に低下した。

定植後の生育に関しては、高濃度区で発芽率および抽だい率が高い傾向にあった(第6表, 第7表)。

4. 硫酸イオン濃度と球根の生育

第8表に SO_4^{2-} 添加量と球根重量を示した。有意な差はみられないものの、標準区で重量が最も大きく、 SO_4^{2-} 添加量が大きくなるにしたがって重量が小さくなる傾向を示した。また、ブドウ糖、 NH_4^+ 、 NO_3^-

Table 5. Effects of H_2PO_4^- concentrations in the liquid-shaking culture medium of *Lilium japonicum* in vitro on the bulb growth and cumulative absorption of glucose, H_2PO_4^- , NH_4^+ , NO_3^- , SO_4^{2-} per bulb and postplanting performance in the soil.

H_2PO_4^- concentrations in MS medium (mM) Level	Bulb weight (g)	Cumulative absorption per bulb from the culture medium					60 days after planting in the soil	
		Glucose (g)	H_2PO_4^- (mmol)	NH_4^+ (mmol)	NO_3^- (mmol)	SO_4^{2-} (mmol)	Sprouting (%)	Bolting (%)
1.25 × 1	2.4	0.71	0.042c ^z	0.56	0.50	0.044	81.7	30.0
2.50 × 2	2.6	1.71	0.081 b	0.58	0.53	0.046	87.1	32.3
3.75 × 3	2.4	1.76	0.107 a	0.57	0.53	0.046	90.0	48.3
	NS	NS		NS	NS	NS		

^z Different letters within columns indicate significant differences by Duncan's multiple range test at 5 % level.

NS Nonsignificant at 5 % level.

Table 6. H_2PO_4^- concentrations in MS medium at the terminations of the initial culture and subcultures.

H_2PO_4^- concentrations in MS medium ^z (mM) Level	Initial culture ^y (mM)	Subculture ^y			
		First (mM)	Second (mM)	Third (mM)	Fourth (mM)
1.25 × 1	0.65 ± 0.01	0.13 ± 0.03	0.05 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.02 ± 0.01
2.50 × 2	1.07 ± 0.08	0.66 ± 0.08	0.13 ± 0.04	0.05 ± 0.00	0.05 ± 0.02
3.75 × 3	2.95 ± 0.04	1.56 ± 0.07	0.71 ± 0.15	0.12 ± 0.07	0.45 ± 0.12

^z Resective amount of H_2PO_4^- was added at the start of culture.

^y Values indicate mean H_2PO_4^- concentration ± standard error in the medium at the termination of initial culture and subculture (3 replications).

Table 7. Effects of Different H_2PO_4^- concentrations and its application methods in liquid-shaking culture medium of *Lilium japonicum* on bulb growth and cumulative absorption of glucose and H_2PO_4^- per bulb and postplanting performance in the soil.

Total H_2PO_4^- amount added to MS medium (mM) Level	Application method ^z	Bulb weight (g)	Cumulative absorption from the culture medium		60 days after planting in the soil	
			H_2PO_4^- (mmol)	Glucose (g)	Sprouting (%)	Bolting (%)
1.25 × 1	One time	3.1	0.078c ^y	1.06	83	10
3.75 × 3	One time	3.2	0.158 a	1.05	97	13
3.75 × 3	Three times	3.5	0.123 b	1.23	93	17
		NS		NS		

^z One time : One time application at culture initiation. Three times : Three times split application by equal amount at 10 day-interval.

^y Different letters within columns indicate significant differences by Duncan's multiple range test at 5 % level.

NS Nonsignificant at 5 % level.

Table 8. Effects of SO_4^{2-} concentrations in the liquid-shaking culture medium of the *Lilium japonicum* on bulb weight and cumulative absorption of glucose, H_2PO_4^- , NH_4^+ , NO_3^- , and SO_4^{2-} per bulb.

H ₂ PO ₄ ⁻ concentrations in MS medium (mM) Level	Bulb weight (g)	Cumulative absorption per bulb from the culture medium				
		Glucose (g)	H ₂ PO ₄ ⁻ (mmol)	NH ₄ ⁺ (mmol)	NO ₃ ⁻ (mmol)	SO ₄ ²⁻ (mmol)
1.25 × 1	2.4	0.71	0.042c ^z	0.56	0.50	0.044
2.50 × 2	2.6	1.71	0.081 b	0.58	0.53	0.046
3.75 × 3	2.4	1.76	0.107 a	0.57	0.53	0.046
	NS	NS		NS	NS	NS

^z Different letters within columns indicate significant differences by Duncan's multiple range test at 5 % level.

NS Nonsignificant at 5 % level.

および H_2PO_4^- の積算吸収量は球根重量と同様な傾向がみられ、標準区が最も大きかった。一方 SO_4^{2-} の吸収量に有意差はなかった。

考 察

ササユリの液体培養における養分吸収については液体通気培養で調査されており、 H_2PO_4^- が最も早く吸収され、次いで NH_4^+ 、 NO_3^- 、 K^+ の順であることが示されている (河原林, 1992)。これに対して液体振とう培養においては H_2PO_4^- 、 SO_4^{2-} および NH_4^+ の吸収が多く、 K^+ 、 Mg^{2+} および Ca^{2+} はごくわずかであった。液体振とう培養では球根肥大はするものの、根および葉の発生がほとんどみられなかったことから、核酸やタンパク質の合成に必要な $\text{H}_2\text{PO}_4^{3-}$ 、 SO_4^{2-} および NH_4^+ は多量に吸収されたのに対して、葉に多量に含まれる K^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} (吉田, 1972; 山崎, 1982) は少なかったものと考えられる。

NO_3^- あるいは NH_4^+ の吸収は培地の pH の影響を受けることが知られており、培養組織 (庄野, 1972) や根 (平田, 1975) においては pH が酸性側に傾くと NH_4^+ の吸収が低下し、 NO_3^- の吸収は増加するとされている。しかし、本実験ではササユリ球根を培養することによって pH が 4.7 から 3.5 に低下したが、このような pH 条件下でも NH_4^+ は NO_3^- に比べて減少率が大きく、吸収が低下しているとはいえなかった。また、減少率の多いイオンの中で H_2PO_4^- はとくに急速に減少しており、培養後期には不足する可能性が考えられる。 H_2PO_4^- の減少はジャガイモの液体培養 (Kozai ら, 1995) あるいはニンジン不定胚の培養 (Tsuji ら, 1993) において指摘されている。そこで、ササユリの液体振とう培養において吸収量の多いことが明らかとなった H_2PO_4^- 、 SO_4^{2-} 、 NH_4^+ および

NO_3^- について添加量と球根肥大の関係について詳しく検討した。

ストックを用いた実験では、 NH_4^+ は NO_3^- に対して相対的に低濃度で生長に促進的に働く可能性が示されている (溝添ら, 1992)。ササユリ球根の液体振とう培養においても、 NH_4^+ は低濃度では球根肥大を促進し、30 mM 以上の高濃度になると肥大を阻害する傾向がみられ (第 2 図)、本実験の濃度範囲ではストックの場合とほぼ同様な結果が得られた。また、培地からの NO_3^- 吸収量は NH_4^+ 吸収量に比べて培地の $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ 比の影響が大きかったが (第 1 表)、 $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ 比の異なる培地では培養中の pH 低下に差ができるために NO_3^- 吸収量に違いが生じた可能性が考えられる。

一方、第 3 図に示したように窒素源として NO_3^- のみを用いた場合、根の著しい伸長が観察された。また、10/50 mM 区では根が 2~3 cm に伸長した。これは、 NH_4^+ が NO_3^- よりも早く吸収されるため、10/50 mM 区では培養後期になると培養液中の NH_4^+ がなくなり、 NH_4^+ 無添加区とほぼ同じ条件になったためと考えられる。これに対して、 NH_4^+ 濃度が 20 mM 以上の区では根の伸長は全くみられなかった。Ichihashi (1979a, 1979b) はシランの実生について $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ 比が生育に大きな影響を及ぼすことを示し、その値が 1 以下の時生育が良好で、 NH_4^+ 濃度が低いときに根の生育がまさをことを明らかにしており、本実験とはほぼ同様な結果が得られている。

細胞内に取り込まれた NO_3^- は NO_2^- 、 NH_4^+ 、GLN と変化して利用されることが知られている (榊原ら, 1992)。そこで、窒素源として NH_4^+ のかわりに GLN を与えて培養したところ、 NO_3^- のみを窒素源として

培養した場合と同様に根が伸長した (第2表). また, 約1gになるまでMS培地で根を伸長させずに液体振とう培養し, その後 NH_4^+ をGLNに置き換えた培地で培養した場合にも根の伸長がみられた (第3表). これらの実験から NH_4^+ が根の発生あるいは伸長阻害に関与していることが示唆される. また, 高濃度の NH_4^+ を含むために根の伸長がみられない区の球根でも1mm程度の突起状の褐変した根が観察されることから, NH_4^+ は根の発生よりもむしろ伸長を阻害しているものと考えられる.

さらに, 根の伸長した球根は定植後の生育が良好になることが明らかとなった (第4表). 液体振とう培養を行う場合, 根が伸長すると移植などの操作が煩雑になるので, 培養中に発根させずに球根を肥大させた後, NH_4^+ を含まない培地あるいは NH_4^+ をGLNに置き換えた培地で培養して根の伸長を促すことは, 液体振とう培養による球根肥大促進法の実用化のために有効な手段になるものと考えられる.

ササユリの開花については, 河原林 (1995) は25~600 mgの培養球を圃場で1作栽培して球周6cm以上になった球根で80%以上の開花率を得ている. 水口・大川 (1995) は45 mgの培養球を栽培し, 3年目に約40%の開花率を得ており, その際球周は約5cmであったと報告している. また, Niimi (1995) は試験管内で400 mg~700 mg程度に生育した球根が開花するまでには少なくとも2年間の圃場での栽培が必要であるとしている. 我々は液体振とう培養によって重量2g~3g, 球周6cm程度の球根を得ており, 定植後の生育がよければ早期開花が望めるものと考えられる.

H_2PO_4^- 濃度をかえた場合には, 球根重量, ブドウ糖, NH_4^+ , NO_3^- および SO_4^{2-} の吸収量にはほとんど差がないのに対して, H_2PO_4^- の吸収量には, 1球当たり40~60 μmol と微量であるが, 大きな違いがみられた. また, H_2PO_4^- を培養中に追加した場合にも, H_2PO_4^- 吸収量が増加したが, 球根重量には差はなかった. ニンジン幼植物の培養においては, H_2PO_4^- が培養後期に激減するため, H_2PO_4^- を添加したところ草丈の伸長速度と乾物重が増加したことが示されている (Tsujiら, 1993). ササユリにおいても, H_2PO_4^- の添加あるいは培養中の追加により H_2PO_4^- 濃度を高く維持した場合, 定植後の生育が良好になる傾向がみられた. したがって, 球根内に蓄積された H_2PO_4^- が定植後の生育に対してなんらかの影響を与えたものと

考えられる. なお, 培養液中の H_2PO_4^- 濃度をMS培地の3倍にした場合, オートクレーブにかけた後に培地が濁る現象がみられたが, この影響については今後検討する必要がある.

高濃度 SO_4^{2-} は, 球根の重量増加および養分吸収を抑える傾向がみられた (第8表). Na_2SO_4 の添加量は最高3.2 mMでMS培地の全塩類濃度に比べてごくわずかであり, 浸透ポテンシャルの増加が球根肥大に影響したとは考えにくい. また, $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ 比あるいは H_2PO_4^- 濃度に関する実験において, 培地中の Na^+ 濃度の増加 (2.5~20 mM) による養分吸収の低下はみられていないことから, 添加した Na_2SO_4 の濃度範囲では Na^+ による影響も考えにくい. しかし, Na_2SO_4 添加の影響は, NH_4^+ に比べて H_2PO_4^- と NO_3^- に対して大きい傾向がみられることから, SO_4^{2-} による拮抗的吸収阻害が発生している可能性も考えられ, 今後さらに検討する必要がある.

MS培地は他の培地に比べて塩類濃度が高く, 窒素成分中の NH_4^+ の比率が高い (庄野, 1972). 本実験では NH_4^+ と NO_3^- が20/40 mMの時に球根肥大がよいことを示したが, これはMS培地における窒素成分の比率とほぼ等しい. しかし, 培養中に H_2PO_4^- が急速に減少することが明らかになったので, ササユリの球根肥大用の培地は, MS培地に $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ を2.5 mM添加したものをを用いるかあるいは培養中に分割して添加するとよいものと考えられる. さらに, 肥大した球根は, 発根促進用培地, すなわちMS培地の NH_4NO_3 のかわりに NaNO_3 を40 mM添加して NH_4^+ をすべて NO_3^- に置き換えた培地に移植するとよいものと考えられる.

摘 要

ササユリの液体振とう培養において, 培養液の無機多量要素の濃度変化を調査し, 減少率の多いものについて, その濃度と球根の生育について検討した.

1. 培養中に減少率の多いものは, H_2PO_4^- , SO_4^{2-} および NH_4^+ であり, 特に H_2PO_4^- は急速に減少した. これに対して, K^+ , Mg^{2+} および Ca^{2+} は減少率はごくわずかであった.

2. NH_4^+ 濃度は, NO_3^- 濃度が40~50 mMの場合, 20~10 mMが適当であり, NO_3^- のみあるいは NH_4^+ 30 mM以上では球根の肥大が劣った. NO_3^- のみの培地では根の伸長がみられた.

3. NH_4^+ のかわりにグルタミン (GLN) を添加した場合にも根の伸長がみられたことから, NH_4^+ には

根の伸長を阻害する作用があるものと考えられる。

4. 発根した球根は定植後の発芽率および抽だい率が高かった。したがって、球根肥大をさせた後、 NO_3^- のみの培地で発根させ定植するとよいことが明らかとなった。

5. H_2PO_4^- は高濃度に添加しても、球根肥大には影響しなかったが、培地からの吸収量は高濃度で培養した場合に多くなった。また、定植後の発芽率も H_2PO_4^- 高濃度培地で高く、吸収された H_2PO_4^- の影響が認められた。

6. SO_4^{2-} を高濃度で添加した場合には球根肥大が劣った。

引用文献

- 浅尾浩史・松谷幸子・田中恵子・荒井 滋. 1992. りん片培養によるササユリの大量増殖. 奈良農試研報 23: 1-6.
- Fukui, H., N. Adachi, T. Hara and M. Nakamura. 1989. In vitro growth and rapid multiplication of *Lilium japonicum* Thunb. Plant Tissue Cult. Lett. 6(3): 119-124.
- Gamborg, O. L., R. A. Miller and K. Ojima. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell Research 50: 151-158.
- 春木和久・山田員人. 1992. 液体培養によるササユリ (*Lilium japonicum* Thunb.) 球根の生育促進. 平成四年度園学中四国支部要旨 31: 64.
- 平田 熙. 1975. 根における無機イオンの吸収. p. 153-194. 古谷雅樹・宮地重遠・玖村敦彦編著. 物質の交換と輸送. 朝倉書店. 東京.
- 市川 健. 1993. 長期間無継代培養によるササユリ (*Lilium japonicum* Thunb.) りん茎の増殖. 静岡農試研報. 37: 103-111.
- Ichihashi, S. 1979a. Studies on the media for orchid seed germination. III. The effects of total ionic concentration, cation/anion ratio. $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ ratio, and minor elements on the growth. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 47: 524-536.
- Ichihashi, S. 1979b. Studies on the media for orchid seed germination. IV. Influence of the characteristics of some culture media on the growth of orchid seedlings. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 48: 345-352.
- Jones, W. R. and P. Jandik. 1991. Controlled changes of selectivity in the separation of ions by capillary electrophoresis. J. Chromatogr. 546: 445-458.
- 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及び簡易培養槽による培養のスケールアップ. 園学雑誌 61 (別1): 446-447.
- 河原林和一郎. 1993. 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の影響. 園学雑誌. 62: 197-205.
- 河原林和一郎. 1995. 簡易液体通気培養で増殖したササユリ球根の開花促進. 園学雑誌. 64: 401-410.
- Kozai, T., B. R. Jeong, C. Kubota and Y. Murai. 1995. Effects of volume and initial strength of medium on the growth, photosynthesis and ion uptake of potato (*Solanum tuberosum* L.) plantlet in vitro. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 64: 63-71.
- 桑野和民・酒巻千波・三田村敏男. 1987. HPLCによるアミノ酸の高速分析—PITCによるプレカラム誘導体化の利用—. 農芸化学会誌. 61 (1): 53-55.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497.
- 溝添素子・稲垣 昇・岡野光生・金地通生・前川 進. 1992. ストックの in vitro 器官形成に及ぼす外植体前歴ならびに培地内窒素組成の影響. 園学雑誌. 61: 625-633.
- 水口 茂・大川勝徳・池川哲郎. 1994. ササユリの母リン片由来カルスの生長とそのカルスからの子球形成に及ぼすナフタレン酢酸とベンジルアデニンの影響. 園学雑誌. 63: 131-137.
- 水口 茂・大川勝徳. 1994. ササユリの母リン片白色カルス由来の子球の発育に及ぼすナフタレン酢酸とベンジルアデニンの影響. 園学雑誌. 63: 429-437.
- 水口 茂・大川勝徳. 1995. ササユリのりん片培養による再生子球由来の球根の発育に関する研究. 生物環境調節. 33: 23-29.
- 中村道徳・貝沼圭二. 1989. 澱粉・関連糖質実験法. p. 32-33. 学会出版センター. 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.
- 榊原 均・鈴木石根・杉山達夫. 1992. 窒素による植物遺伝子の発現制御. 蛋白質核酸酵素. 37: 1214-1221.
- 庄野邦彦. 1972. 培地の組成と作り方. p. 41-85. 竹内正幸・石原愛也・古谷力編著. 植物組織培養. 朝倉書店. 東京.
- Tanaka, A., Y. Hoshi, K. Kondo and K. Taniguchi. 1991. Induction and rapid propagation of shoot primordia from shoot apices of *Lilium japonicum*. Plant Tissue Cult. Lett. 8: 206-208.
- Tsuji, K., M. Nagaoka and H. Ito. 1993. Growth promotion of carrot plantlets in vitro by adding supplements of phosphate to MS medium. Environ. Control in Biol. 31: 155-160.
- 山崎肯哉. 1982. 養液栽培全編. p. 64-81. 博友社. 東京.
- 吉田文武. 1972. 栄養生理研究への利用. p. 298-316. 竹内正幸・石原愛也・古谷力編著. 植物組織培養. 朝倉書店. 東京.