組織培養におけるヤマユリ子球の分化生育に及ぼす 培地当り移植リン片数と培養系統の影響

高山真策・奥山和彦

東海大学開工学部生物工学科 410-03 静岡県沼津市西野 317

Effects of the Number of Inoculated Bulbscales and the Culture Strain on
Differentiation and Growth of *Lilium auratum* in Tissue Culture

Shinsaku TAKAYAMA and Kazuhiko OKUYAMA

Department of Biological Science and Technology, Tokai University
317 Nishino, Numazu, Shizuoka 410-03, Japan

Abstract

The effects of the number of inoculated bulbscales and the culture strain on differentiation and growth of newly formed bulblets of *Lilium auratum* Lindl. in tissue culture were investigated.

The bulbscales dissected from tissue cultured bulblets were transferred successively to 300 ml flask containing 150 ml modified MS liquid medium, 5, 10, 15, 20, 25 and 30 bulbscales per flask, and cultured for 3 months. Fresh weight of bulblets increased with the decrease in the number of inoculated bulbscales.

Regeneration and growth of bulblets were also affected by the culture strain. Established strain collected in Fukushima town, Hokkaido Pref. tended to form multiple bulblets and to show callus induction, but not the strains collected in Mishima city, Shizuoka Pref.

諸 言

ヤマユリの効率的な増殖方法として、液体振とう培養あるいはジャーファーマンター培養が有効であることについては高山ら^{2,7-9)}によってすでに報告されており、ジャーファーマンターによって大量の子球を効率良く形成できることが明らかにされている。妻木、高山⁹⁾によると、形成された子球の42%が0.5g以上に生育し、最大重量は4.5gに達した。しかし、このことは58%は0.5g以下の子球ということであり、大型の子球が形成される反面、小型の子球が多数形成される特性を有していることを示している。このような小型の子球には、土壤移植後の活着率が低いことや、開花までの年限が長いなどの問題がある⁶⁾。そこで、これらの問題点を解決するために、本実験では培地の容量当りのリン片移植数を種々変更して効率的な子球の形成条件について調べた。一方、北海道・福島町産のヤマユリから無菌化した培養の中に、形成された子球が多芽状になったり、子球形成の抑制とカルス化などが発生する事例が観察された。このような

1996年5月21日受付

1996年6月5日受理

現象は大量培養における子球の効率的な生産を行う上で特に問題である。従来、ヤマユリの培養では多芽化やカルス化は起こりにくい³⁾とされており、その原因の解明が必要になった。種々検討する中で、産地の異なるヤマユリを同一培地、同一環境で培養したところ、多芽化やカルス化の発生は全く観察されないことがわかった。これらの背景から、北海道福島町産と静岡県三島市産という2つの異なる産地のヤマユリを材料に培養を行い、両者の特性を詳細に比較した。その結果についても報告する。

材料および方法

北海道福島町で採集したヤマユリ (*Lilium auratum*) のリン茎から、Takayama and Misawa (1974)³⁾ の方法を用いてムラシゲ・スクーゲ寒天培地¹⁾ (以下 MS 培地) で無菌培養を確立し、継代培養して増殖した子球を材料として用いた。これらの子球のリン片を、MS 改変培地⁹⁾ (MS 培地の成分のうち NH_4NO_3 , KNO_3 , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ を 1/2 に減量したもの) に NAA 0.1 mg/ℓ およびシュクロース 60 g/ℓ を添加し、オートクレーブ前の pH を 5.7 に調整した液体培地 150 ml を含む 300 ml 容のフラスコにフラスコ当り 10 枚移植し、23°C 暗黒条件下、毎分 120 回転で液体振とう培養を行い子球を無菌的に増殖した。このようにして増殖した子球のリン片を、150 ml の MS 改変培地⁹⁾ を含む 300 ml 容のフラスコにそれぞれ 5 から 30 枚移植し、前述と同様な条件下で 3 ヶ月生育させ、子球の分化生育を測定した。

また、培養系統が分化生育に及ぼす影響については、静岡県三島市および北海道福島町からそれぞれ採集したリン茎から Takayama and Misawa (1979)³⁾ の方法で確立し継代培養した無菌培養株を、MS 寒天培地¹⁾ 10 ml を含む 25φ×125mm の試験管に移植して 23°C 暗黒下で 2 ヶ月毎に 3 代継代培養した後、同一組成の寒天培地 10 ml を含む 25φ×125mm の試験管に各系統 20 本ずつを継代し、23°C 暗黒下で 2 ヶ月間培養して測定した。なお、培養系統とは、同一の親株(リン茎)由来の培養株を意味し、これらを 1 つの培養系統として取り扱った。

結果および考察

1. 培地に移植したリン片数の違いが子球の分化生育に及ぼす影響

リン片をフラスコ当り 5 から 30 枚移植し、培養 3 ヶ月後に子球の分化生育を測定した結果を Fig. 1 に示す。形成された子球の新鮮重はフラスコ当りのリン片移植数が 5 枚のときフラスコ当り約 21 g であり、移植リン片数が多くなるに従い重量が増加して移植リン片数が 25 枚の時にはフラスコ当り約 32 g になった (Fig. 1 A) 形成された子球 1 球当りの重量は、移植リン片数が少ないほど大きくなり、移植リン片数が増加するのに伴って子球重量はほぼ直線的に低下した (Fig. 1 B)。形成された子球の乾物比率は移植リン片数が 5 枚の時に 0.21 と最も高く、移植リン片数が 25 枚では 0.157 と低下する傾向があった (Fig. 1 C)。フラスコ当りに形成された子球数は、移植リン片数の増加に伴って顕著に増加した (Fig. 1 D)。移植したリン片 1 枚当りに形成された子球数は、移植リン片数が 5 枚の時に 11.5 球と最も高く、移植リン片数が増加するのにもなって低下し、移植リン片数 25 枚では 4.7 球となった (Fig. 1 E)。本実験では、液体培養における移植したリン片 1 枚当りに形成された子球数が数枚から 11.5 球となり、同じく液体培養を用いた著者らの従来の報告の 2 球と比較して多くなっているが、これは、後述する北海道福島町産のヤマユリの特性によるものと考えられる。

Fig. 1 Effect of the number of inoculated bulb scales on differentiation and growth of newly formed bulblets in *Lilium auratum* Lindl. in tissue culture. Each data points are means of 20 replicates ± SE.

A: weight of bulblet per flask, B: weight of bulblet, C: DW/FW ratio, D: number of bulblets/flask, E: number of bulblets/bulbscale.

以上の結果から、フラスコ当りのリン片移植数を減少させることによって、形成された子球 1 球当りの生育を促進することができた (Fig. 1 B). しかも、これらの子球は、DW/FW 比が高まる傾向を有する (Fig. 1 C) ことから、より充実度の高い子球であると判断することができる。これらのことから、土壌移植のための子球の形成段階では移植量を少なくして十分に充実、肥大した子球を形成させる方法が良いと判断される。

2. 培養系統が子球の分化生育に及ぼす影響

液体培養によるヤマユリの子球の増殖条件を検討する過程で、液体培地中で形成された子球が多芽化したり、子球の形成が顕著に阻害されてカルス状の未分化組織が発生するなどの現象が観察される場合があった。しかも、これらの現象は培地条件を変えたり、カルスの発生が増加する 2 ヶ月を超える長期間の培養⁴⁾を避けるために、実験材料の子球の培養期間を 2 ヶ月で揃えて培養しても改善が困難であった。一方、静岡県三島市で採集して同一培地、同一条件で継代培養を続けていた培養株にはこのような現象は見られなかった。一般にヤマユリの培養では、子球形成は培養リン片 1 枚当り約 2 球ほどが形成されることが多く、多芽化したりカルス化することはない³⁾。しかも、カルスの発生は MS 培地の塩類濃度を 2 倍にしてシュクロースを 120 g/l の濃度で添加した場合、あるいは培養期間が 2 ヶ月を越えた子球のリン片を材料に用いた場合に観察され、通常は観察されない⁴⁾ことから、培養特性が異なる系統の存在が考えられた。そこで、静岡県三島市産 (m-1, m-2) と、北海道福島町産 (f-1~f-10) の自生ユリを MS 培地で無菌継代培養し、培養リン片からの子球の形成状況を比較した。その結果、子球数は三島産のヤマユリは

Fig. 2 Effect of the culture strain on differentiation and growth of newly formed bulblets in *Lilium auratum* Lindl. in tissue culture.

Culture strains established were collected in the wild from: f-1~f-10=Fukushima town, Hokkaido Pref., m-1 and m-2=Mishima city, Shizuoka Pref. Each data points are means of 20 replicates $\pm$ SE.

A: number of bulblets/bulbscale, B: maximum number of bulblet, C: root number/bulbscale, D: maximum root length, E: root number/bulb, F: callus percentage.

Fig. 3 Relationship between bulb height and bulb weight. Cultures were the same as Fig. 2. Number of data points are 75 bulblets.

ン片当り約2球(Fig. 2 A)となり、著者らの従来³⁻⁵⁾と同様の結果となったが、福島町産の10株から継代増殖した系統は、1リン片当り約4球から6球ほどが形成され、f-6系統のみが三島市産のヤマユリと同様であったにすぎなかった。子球生育の指標として、子球の高さを調べた結果、三島産のヤマユリは約1.3cmであったのに対して、福島町産のヤマユリは10系統のうち7系統が1.0cm前後であり、残り3系統も三島産より小さかった(Fig. 2 B)。子球の高さの測定値は子球の生育を示す良い指標であり、Fig. 3に示すように子球の高さと子球重との間には、相関係数 $r^2=0.952$ の高い指数関数的相関が認められた。リン片当りの根数は、ばらつきが大きく、約3本程度の系統から約20本の系統まであり、三島産の系統数が少ないため比較が困難であった(Fig. 2 C)が、子球1個当りの根数は、三島産が約7本程度で2系統ともほぼ同一であったのに対し、福島町産は1~6.3本まで系統によってばらつきが見られた(Fig. 2 E)。最大根長は、実験に供したすべての系統で大きな差は認められなかった(Fig. 2 D)。カルス化について調べた結果、三島産では全くカルスの発生が認められなかったが、福島町産ではf-2系統を除き、他の9系統ではすべてカルスの発生が観察され、特にf-3, f-6, f-7, f-9は30%~50%に至る高いカルス化傾向が見られた。

以上の結果から、三島産は、2系統共にほぼ同様な性質であり、従来³⁾に合致する生育特性であったのに対し、福島町産は、形成された子球が多芽化して子球の生育が抑制される傾向を有する他、発根不良やカルス化しやすい特性を有し、系統によって特性に差があると考えられた。

本実験では、事前に培地と培養ステージを揃えて特性比較を行っているので、ここで得られた特性の差は、三島産と福島町産とが大きく異なった特性を有していることを示している。また、

福島町産のヤマユリでも系統によって特性が異なることが推察された。

福島町産のヤマユリの原生地では、一般のヤマユリと比較して広葉の個体が多いが、このことと、培養特性との関係については不明である。系統の差による培養特性の差は、他のユリでも生じる可能性があり、ユリ類の大量増殖の基礎事項として遺伝的、生理的解析を行うと共に、子球の肥大促進とカルス化の抑制条件を明らかにすることが必要であろう。

まとめ

液体培養におけるヤマユリの大量増殖を効率化するため、リン片の移植条件について検討した結果、移植リン片数が少ない条件で子球の生育が促進され、より充実度の高い子球が形成された。また、静岡県三島市産と北海道福島町産のヤマユリのいくつかの系統における培養特性を比較した結果、大きな差があった。すなわち、福島町産のヤマユリには多芽化とカルス化の傾向が顕著であった。また、福島町産のヤマユリには、明らかに培養系統間における子球形成の差が認められた。

謝 辞

本実験の遂行にあたって、協力を戴いた石川島播磨重工業(株)技術研究所の茂田潤一、中山衛両氏ならびに元東海大学開発工学部・滝沢直子氏に感謝の意を表する。

引用文献

- 1) Murashige, T. and Skoog, F., A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture, *Physiol. Plant.* 15: 473~497(1962)
- 2) Takayama, S.: Mass propagation of plants through shake- and bioreactor-culture techniques, In: Bajaj, Y. P. S.(Ed.), *Biotechnology in Forestry and Agriculture Vol. 17. Hightech and Micropropagation*, Springer Verlag, Berlin, pp. 495~515(1991)
- 3) Takayama, S. and Misawa, M.: Differentiation in *Lilium* bulb scales grown in vitro. Effect of various culture conditions, *Physiol. Plant.* 46: 184~190(1979)
- 4) Takayama, S. and Misawa, M.: Differentiation in *Lilium* bulb scales grown in vitro. Effects of activated charcoal, physiological age of bulbs and sucrose concentrations on differentiation and scale leaf formation in vitro. *Physiol. Plant.* 48: 121~125(1980)
- 5) Takayama, S. and Misawa, M.: Regulation of organ formation by cytokinin and auxin in *Lilium* bulb scales grown in vitro. *Plant and Cell Physiol.* 23: 67~74(1982)
- 6) Takayama, S. and Ohkawa, K.: Growth and flowering in vitro-propagated *Lilium auratum* bulbs in soil., *Plant Tissue Culture Letters*, 7: 187~192(1990)
- 7) Takayama, S. and Takizawa, N.: Efficient mass propagation of *Lilium longiflorum* bulblets through shake and bioreactor-culture techniques., *Abst. XXIVth Internat. Hort. Congress.*, pp. 122(1994)
- 8) Takayama, S., Swedlund, B. and Miwa, Y.: Automated propagation of microbulbs of lilies, In: Vasil, I. K.(Ed.), *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, Vol. 8. Scale up and automation in plant tissue culture., Academic Press, New York, pp. 111~131(1991)
- 9) 妻木直子・高山真策: 液体振とうおよびジャーファーマンターによるヤマユリの簡易大量増殖に関する研究, *植物工場学会誌* 3: 124~128(1992)