

りん片培養によるササユリの大量増殖

浅尾浩史・松谷幸子*・田中恵子・荒井 滋

Micropropagation of *Lilium japonicum* Thunb. by Scale Culture

Hiroschi ASAO, Sachiko MATUTANI, Keiko TANAKA and Shigeru ARAI

Summary

Micropropagation of *Lilium japonicum* Thunb. was investigated by scale culture, and the growth of cultured bulblets was observed in soil culture.

1. Separate scales of a bulb were planted in vermiculite, after which the experimental material was obtained by meristem cultures of formed bulblets.
2. When individual scales were cultured in MS medium with 6% sucrose and 0.1 mg/ℓ NAA, the bulblets formed well.
3. CO₂ enrichment in culture with a 6% sucrose medium under light was optimal for enlargement of the bulblets.
4. Bulblets in a culture under light formed leaves of scales. All bulblets in excess of 1g in dark culture which sprouted after April 15th developed a stalk, but no plants with stalk development flowered.
5. When bulblets were treated at 4°C for one month, one half of them developed a stalk.

Key words: *Lilium japonicum* Thunb., micropropagation, scale culture

緒 言

材料および方法

ササユリ (*Lilium japonicum* Thunb.) は半日蔭を好み、やや高地の樹陰に自生しており、奈良県においても自生地が点在している。花色は白色から濃ピンク色まで幅広く、芳香もあり清楚な雰囲気を持っている。ところが、最近ササユリの乱獲などにより年々減少傾向にあり、また、自生の球根を掘り上げ平坦部で栽培しても、3~4年で自然消滅することが多く、栽培が困難である。

そこで、著者らは奈良県のササユリを維持、増殖するため、りん片培養による大量増殖に取り組んだ。ササユリの組織培養については、その消毒法⁵⁾や培養方法^{1) 2) 4) 6)}の幾つかの研究例はあるが、培養子球の鉢上げ後の生育に関する詳しい報告はされていない。今回、りん片からの子球形成、子球肥大の培養条件および培養子球の鉢上げ後の生育について、幾つかの知見を得たので報告する。

1989年7月1日に宇陀郡御杖村でササユリの球根を採取し、1,000倍希釈したベンレートTに30分間浸漬した後、パーミキュライトにりん片挿しをして、25°C、暗黒下に置いた。約2カ月後、りん片に形成された子球を次亜塩素酸ナトリウム溶液(有効塩素1%)で10分間殺菌処理し、滅菌水で洗浄した後、茎頂を取り出して無菌培養した。茎頂由来の子球のりん片を培養して得た子球を以下の実験に供試した。

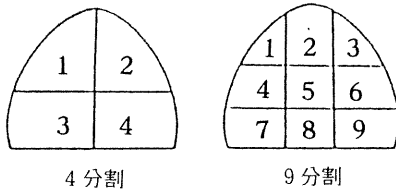
1. 分割したりん片切片の子球形成

第1図に示したように、りん片を4分割および9分割して、ナフタレン酢酸(NAA) 0.1mg/ℓ、ショ糖6%、ゲルライト0.2%を添加したMS培地に置床した。なお、りん片は、それぞれ縦12mm、横5mm(約60mg)および縦15mm、横6mm(約90mg)の大きさのものを用いた。また、

* 現吉野農業改良普及所

アブジジン酸 (ABA) の子球形成に及ぼす影響を検討するため、0.1、1.0mg/l を各々添加して、4分割区で各濃度20切片を、9分割区で各濃度6切片を置床した。

25mlの培地が入った9cmシャーレで25°C、暗黒下で61日間培養した後、各りん片切片における子球の形成数、大きさおよび発根程度を調査した。



第1図 分割したりん片切片のNo.
Fig. 1 No. of pieces of the scale

2. 培養環境およびショ糖濃度が子球の生育に及ぼす影響

培養環境を照明区 (16時間日長、3,000 lux) と暗黒区に分け、それぞれに通気区と密閉区を設け、これにショ糖濃度6%、9%、12%を組み合わせた12処理を比較した。上記試験のABA無添加区で得た約90mgに生育した子球を、100mlのMS培地に入ったマヨネーズビン内に3球ずつ置床し、1試験区12個の子球を供試した。通気区はキャップに通気孔を1つあけミリシールを張り、照明区ではCO₂を施用した。CO₂濃度は、1,000ppmに設定し、赤外線CO₂コントローラーで5分毎にチェックして設定濃度に修正した。いずれの試験区においても培養50日目と100日目に各々同じ培地へ移植した。なお、発根している子球においてはそのままの状態に移植した。

培養50日目、100日目及び150日目に子球の大きさを調査した。発根している子球の重量は正確に測定できないので、予備試験 (n=126) の結果から以下の推定式で求めた。

$$A = 25.16B + 4.44C^2 - 194.28$$

(r = 0.908 **)

- A: 子球重量の推定値 (mg)
- B: 高さ (mm)
- C: 幅 (mm)

また、分球した子球については、最も大きな子球を調査した。

3. 鉢上げ後の培養子球の生育

ショ糖6%の培地で照明下 (L) と暗黒下で肥大させ

た子球をマヨネーズビンに入れたまま第1表に示した試験区で供試し、1991年3月1日に鉢上げした。用土は5号プラスチック鉢に半分日向土を入れ、その上に水ごけで包んだ子球をのせ、上から日向土とバーミキュライトと水ごけを1:1:1に混合した土を入れた。また、タフベル (カネボウ) で70~75%遮光して栽培した。なお、試験区I~IVの網室搬入から鉢上げまでの期間および試験区V・VIの低温 (4°C) 処理期間は暗黒下に置いた。

各試験区における子球の出葉時期および茎葉形成を1991年4月~7月に、茎が伸長した個体の生育を7月19日に調査した。

第1表 試験区条件の設定
Table 1. Test condition

試験区	網室搬入日	低温 (4°C) 処理期間	鉢上げ日
I	10月15日	—	3月1日
II	11月1日	—	同上
III	11月15日	—	同上
IV	12月1日	—	同上
V	—	2月15日~28日	同上
VI	—	2月1日~28日	同上
VII	—	—	同上
L	照明下 (16時間日長、3,000 lux) で培養		

結 果

1. 分割したりん片切片の子球形成

ABA無添加MS培地において、分割したりん片切片の子球形成について検討した。4分割区の1りん片当りに形成された子球数は、平均8個で無分割区 (2.7個) の約3倍あり、しかも子球の大きさは同程度であった。一方、9分割区の1りん片当りに形成された子球数は、平均22.5個で無分割区 (2.9個) の約8倍だったが、その大きさはほぼ半分であった。また、りん片切片の位置の違いによる子球形成については、4分割区において、りん片上部の切片 (No. 1、2) は下部の切片 (No. 3、4) と比較して約70%の大きさの子球が約1.4倍形成された。一方、9分割区においては、りん片上部の切片 (No. 1、2、3) は中部の切片 (No. 4、5、6) や下部の切片 (No. 7、8、9) と比較してやや小さい子球が多めに形成されたが、部位ごとのばらつきが大きく、顕著な差は認められなかった。また、子球の発根度については、4分割区は無分割区と同程度であったが、9分割区は発根

第2表 4分割したりん片の子球形成に及ぼすABAの影響

Table 2. Effect of ABA on bulblets formation divided the scale into four pieces

りん片 切片No.	ABA 0 mg/ℓ			ABA 0.1mg/ℓ			ABA 1.0mg/ℓ		
	子球数	大きさ ^{a)}	発根度 ^{b)}	子球数	大きさ	発根度	子球数	大きさ	発根度
1	2.1	4.7 × 2.4	2.3	2.5	3.5 × 2.0	2.2	1.3	3.5 × 1.8	1.5
2	2.6	4.1 × 2.2	2.0	4.3	3.1 × 1.7	2.3	1.1	2.8 × 1.6	1.6
3	1.5	6.3 × 3.9	2.2	2.3	4.8 × 2.6	2.1	1.3	4.5 × 2.8	2.0
4	1.8	5.8 × 3.4	1.5	2.4	4.9 × 2.7	1.8	1.1	5.9 × 3.6	1.5
平均	2.0	5.2 × 3.0	2.0	2.9	4.1 × 2.3	2.1	1.2	4.2 × 2.5	1.6
無分割 りん片	2.7	5.2 × 3.5	2.3	2.3	5.4 × 3.1	1.9	2.3	4.7 × 3.0	1.6

a) 高さ (mm) × 幅 (mm)

b) 0 (未発根) ~ 3 (旺盛な発根)

第3表 9分割したりん片の子球形成に及ぼすABAの影響

Table 3. Effect of ABA on bulblets formation divided the scale into nine pieces

りん片 切片No.	ABA 0 mg/ℓ			ABA 0.1mg/ℓ			ABA 1.0mg/ℓ		
	子球数	大きさ ^{a)}	発根度 ^{b)}	子球数	大きさ	発根度	子球数	大きさ	発根度
1	2.5	1.8 × 1.0	0.3	1.8	2.7 × 1.5	0.0	1.2	2.2 × 1.5	0.0
2	4.5	2.9 × 1.6	1.0	2.3	2.4 × 1.4	0.2	1.4	2.4 × 1.4	0.0
3	1.8	3.6 × 2.1	0.3	2.7	2.0 × 1.1	0.2	1.7	2.0 × 1.1	2.0
4	2.7	1.9 × 1.1	0.0	2.8	2.0 × 1.2	0.3	2.0	1.6 × 1.0	0.0
5	1.0	2.4 × 1.8	0.3	3.2	2.1 × 1.1	0.0	1.8	1.4 × 0.9	0.0
6	2.8	2.0 × 1.1	0.3	2.8	2.8 × 1.8	0.5	1.8	1.7 × 1.2	0.0
7	0.8	1.5 × 0.7	0.5	2.3	4.8 × 2.3	2.2	1.8	2.7 × 1.5	0.8
8	2.0	5.7 × 2.7	1.8	1.7	4.0 × 2.2	2.0	1.5	3.2 × 2.1	1.0
9	4.5	2.8 × 1.6	1.8	1.5	6.0 × 3.3	2.0	2.4	3.3 × 1.8	1.0
平均	2.5	2.7 × 1.5	0.7	2.3	3.2 × 1.8	0.8	1.7	2.3 × 1.4	0.4
無分割 りん片	2.9	5.4 × 3.8	2.4	2.6	5.5 × 3.6	2.1	2.5	5.0 × 3.3	1.6

a)、b) 第2表と同じ

度は無分割区と比較して顕著に劣った。

また、ABAを添加した場合の子球形成は、0.1mg/ℓの添加で、無添加と比較してほとんど差は認められなかったが、1.0mg/ℓの添加では、子球の形成数、肥大および発根のいずれをも抑制した(第2、3表)。

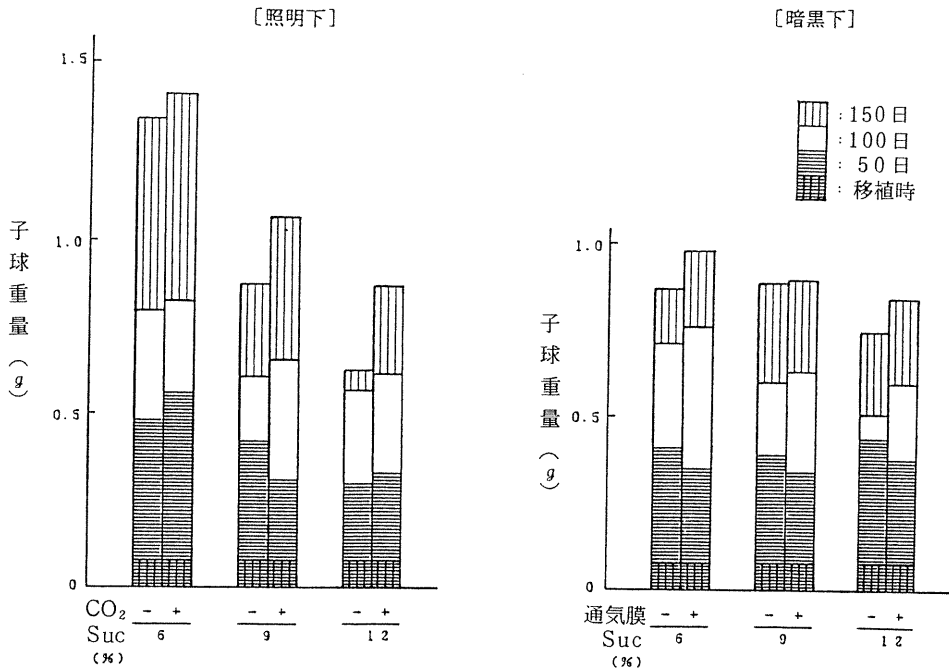
2. 培養環境およびショ糖濃度が子球の生育に及ぼす影響

照明下と暗黒下とも子球の肥大は、ショ糖濃度6% > 9% > 12%の順に良く、照明下で培養した場合の方がその差が顕著に現れた。また、照明下での培養では、CO₂施用した方が密閉状態で培養するよりも子球の肥大が促進された。暗黒下での培養においても、空気を流通させて培養した方が、密閉状態で培養するよりも若干子球の

肥大が促進された。照明下と暗黒下とも子球の肥大が良好であったショ糖濃度6%の区において、照明下での子球の生育は暗黒下での子球の生育と比較して、培養100日目まではさほど変わらなかったが、100日目から150日目の生育は非常に良好であった(第2図)。

3. 鉢上げ後の培養子球の生育

試験区I~IVの子球においては、4月上旬から5月上旬の間に出葉し、試験区V・VIにおいては、試験区I~IVのものより約1カ月半遅れの5月下旬から6月下旬の間に出葉した。また、試験区VIIの2子球はいずれも7月上旬に出葉した。暗黒下で培養した試験区I~IVの子球においては、試験区に係わらず鉢上げ時の子球重量が1g以下の場合、りん片葉しか形成されなかったが、1g



第2図 培養環境およびショ糖濃度が子球の生育に及ぼす影響

Fig.2 Effect of culture environment and sucrose concentration on the growth of bulblets

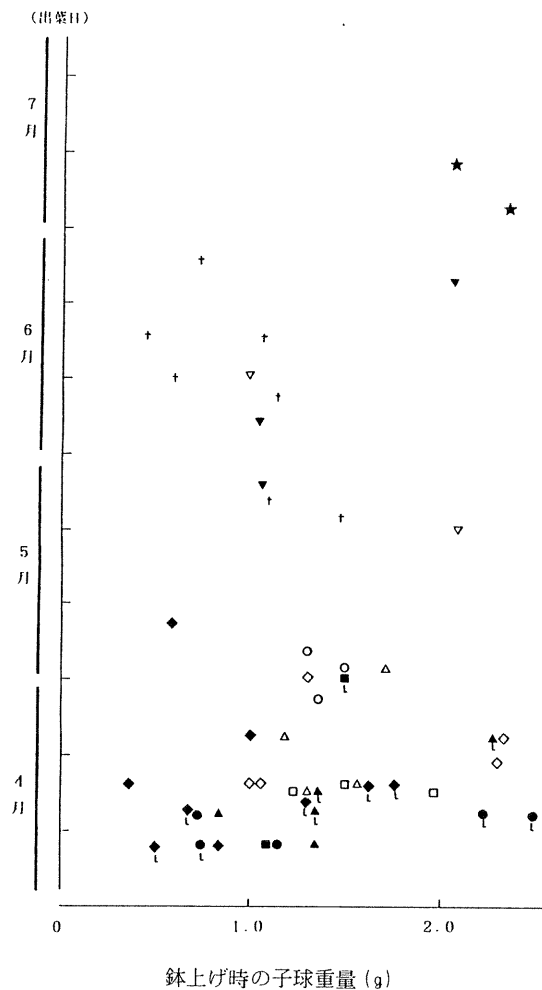
第4表 茎が伸長した個体の生育 (7月19日)

Table 4. The growth of stalk development plants

試験区 a)	鉢上げ時の 子球重量(g)	草丈 (cm)	葉数	最大葉 (cm)		茎径 (cm)
				縦	横	
I	1.49	11.5	5	7.0	1.6	0.13
	1.30	8.5	3	4.2	1.1	0.12
	1.37	12.5	7	6.6	1.4	0.16
II	1.99	16.2	6	8.6	1.7	0.15
	1.49	15.6	7	7.5	1.6	0.16
	1.24	12.0	4	8.0	1.4	0.13
III	1.57	15.8	6	9.6	2.0	0.16
	1.19	13.5	6	8.0	1.5	0.15
	1.72	13.5	6	5.5	1.4	0.13
	1.32	15.5	7	7.0	1.4	0.14
IV	2.29	17.2	7	9.8	1.8	0.18
	2.30	14.5	6	7.2	1.5	0.16
	1.30	8.6	4	5.3	1.3	0.11
	1.00	13.6	6	8.6	1.3	0.13
	1.08	11.8	4	8.4	1.6	0.13
VI	2.09	10.5	6	5.8	1.3	0.14
	0.92	10.5	6	8.3	1.4	0.12

a) 第1表参照

以上の場合、4月15日以降に出葉した子球は茎が伸長した。しかし、照明下で培養した子球は全てりん片葉しか形成されなかった。一方、試験区VIの鉢上げ時の重量が1g以上の子球においては茎を伸長させるものも見られたが、試験区VとVIIの子球は全てりん片葉しか形成されなかった(第3図)。



第3図 各試験区の鉢上げ時の子球重量が茎葉形成と出葉時期に及ぼす影響

Fig. 3 Effect of weight of bulblets in each test conditions on the shoot formation and the period of budding

注) ○・●(試験区I)、□・■(II)、△・▲(III)、◇・◆(IV)、+ (V)、▽・▼(VI)、★(VII)、L (L) 白印：茎が伸長した個体 黒印：りん片葉しか形成しなかった個体 試験区については第1表参照

7月19日の時点で最も生育の良かったのは、試験区IVの鉢上げ時の重量が2.29gの子球で、草丈は17.2cm、葉数は7枚、最大葉の縦は9.8cmで横は1.8cm、茎径は0.18cmだった。しかし、他の子球と同様で開花には至らなかった(第4表)。

考 察

自生しているササユリのりん片は雑菌が多く、完全に滅菌して効率良く無菌培養することは困難である。また、一般に他のユリ類と同様高率にウイルス感染しているのので、採取個体をもとに茎頂培養で得られたウイルスフリー子球を用いて、りん片培養による大量増殖について検討した。

分割したササユリのりん片切片を培養することにより、子球はその部位に関係なく無分割りん片とはほぼ同数形成されたことから、大量増殖にりん片切片を用いるのが実用的であると考えられる。子球の肥大について福井ら¹⁾は、暗黒下でショ糖6%の培地で培養するのが最適であると報告しているが、本研究では照明下でショ糖6%の培地で培養するのが最適であり、その場合、CO₂施用の方が密閉状態で培養するよりも子球の肥大が良くなった。このことは、りん片中に発達した葉緑体が施用されたCO₂により光合成を行い、子球の生育を促したことによると考えられる。一方、暗黒下の培養でも、キャップにミリシールを張り空気を流通させた場合、密閉状態で培養するより若干子球の肥大が良かったのは、培養ビン内で高濃度になっていると考えられるCO₂を分散させ、呼吸を正常にし、代謝が活性化したためではないかと考えられる。

ユリ類の組織培養技術を用いた増殖についての研究例は多数あるが、実用的な球根生産に関する研究は数例しかない⁹⁾⁻¹¹⁾。そこで、りん片培養で得られた子球について、生産球としての実用性について検討するため、培養子球の鉢上げ後の生育について調査したところ、暗黒下で培養し年内に自然条件下に移した1g以上の子球のうち、4月15日以降に出葉したものは全て茎が伸長した。しかし、照明下で培養した子球は全く茎が伸長せず、りん片葉しか形成されなかった。このことは、暗黒下と照明下で培養した子球は休眠性などの生理的特性が異なっていると考えられ、生産球としては子球の肥大は劣るが暗黒下で培養した子球が適していると考えられる。また、子球を4℃で1カ月低温処理すると、茎が伸長するものが半数認められたが、半月の低温処理では全てりん片葉しか形成されなかった。このことについては、水口ら⁹⁾

も子球を4℃で6～8週間低温処理すると出葉を促進したと報告しているように、培養子球の休眠打破には4℃で低温処理する場合、1カ月半から2カ月以上の期間が必要ではないかと考えられる。自生するササユリの花芽分化について、清水⁸⁾は愛知県の平地地での球根は、発芽後間もなく花芽は分化すると報告しており、大川⁷⁾は日本海岸と太平洋側の高地での球根は、11月に分化し、冬の寒さで分化を停止して、春の温暖で分化を再開し発芽直後に完成すると報告している。今後、培養子球の花芽分化について検討したい。

摘 要

ササユリのりん片を用いた大量増殖法について検討し、培養により形成された子球の鉢上げ後の生育について調査した。

1. 採取した球根のりん片をパーミキュライトに挿し、形成された子球を茎頂培養して実験材料を得た。
2. 分割したりん片をMS培地(6%ショ糖、0.1mg/l NAA)で培養することにより、効率良く子球が形成された。
3. ショ糖6%の培地を用い、照明下でCO₂施用して培養するのが、子球の肥大には最適であった。
4. 照明下で培養した子球は全てりん片葉しか形成しなかった。また、暗黒下で培養し、鉢上げ時の重量が1g以上の子球で、4月15日以降に出葉したものは全て茎を伸長させた。しかし、茎を伸長した全ての個体は着蕾せず、開花には至らなかった。
5. 子球を4℃で1カ月低温処理すると、茎が伸長するものが半数認められた。

引用文献

1. 福井博一・永瀬 幸・中村三夫. 1990. In vitro

- のササユリ (*Lilium japonicum* Thunb.) の球根肥大に関する研究. 園学雑. 第59巻別冊1:612-613.
2. 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 (1) :195-209.
 3. 水口 茂・大川勝徳. 1991. ササユリのりん片培養による増殖に関する研究. (第5報) 子球からの出葉と発根に及ぼす低温処理効果. 第12回植物組織培養学会. 講演要旨:67.
 4. 新美芳二. 1990. ササユリの成球生産に関する研究. (第1報) 母植物の鱗片、葉、茎の各切片の試験管内での子球形成能力. 園学雑. 第59巻別冊1:614-615.
 5. 大川勝徳・水口 茂・松田秀明. 1990. ササユリのりん片培養による増殖に関する研究. (第1報) 雑菌汚染に対するTBZの防止効果. 園学雑. 第59巻別冊2:638-639.
 6. ———・山下理恵子・水口 茂. 1991. ササユリのりん片培養による増殖に関する研究. (第4報) 子球形成の過程. 第12回植物組織培養学会. 講演要旨:66.
 7. 大川清. 1989. 日本自生ユリの花芽分化期について. 園学雑. 57(4):655-661.
 8. 清水基夫. 1971. 日本のユリ. 誠文堂新光社.:376
 9. SIMMONDS, J.A. and B.G. CUMMING. 1976. Propagation of *Lilium* hybrids. I. Dependence of bulblet production on time of scale removal and growth substances. *Scientia Hort.* 5:77-83.
 10. ——— and ———. 1976. Propagation scale callus cultures for increased propagation rates. *Scientia Hort.* 5:161-170.
 11. TAKAYAMA, S. M. MISAWA, Y. TAKASHIGE, H. TSUMORI and K. OHKAWA. 1982. Cultivation of in vitro propagated bulbs in soil. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 107:830-834.