

組織培養による球根の大量増殖法を利用した  
ユリ生産体系の実用化に関する研究

1996

河原林 和一郎

# 組織培養による球根の大量増殖法を利用した ユリ生産体系の実用化に関する研究

## 目次

緒言	-----	1
謝辞	-----	4
第I章 茎頂培養による無病（ウイルスフリー）球根の育成	-----	5
第1節 茎頂組織の生育に及ぼす培養条件の影響	-----	6
第1項 培地中の主要塩類組成、窒素形態およびビタミン・アミノ酸類	-----	7
第2項 培地pHと培地中の寒天濃度	-----	12
第3項 培地中のショ糖濃度	-----	13
第4項 培地中の生長調節物質の種類と濃度	-----	16
第5項 培地中の温度、照度および照明時間	-----	33
第6項 培地に対する茎頂組織の置床方向	-----	34
第2節 ウイルスの検定	-----	37
第3節 考察	-----	40
第4節 摘要	-----	46
第II章 組織培養による球根増殖と培養球根の栽培	-----	47
第1節 りん片培養	-----	48
第1項 子球の分化と生育に及ぼす培地中の生長調節物質の影響	-----	48
第2項 子球の分化と生育に及ぼす培養温度の影響	-----	50
第3項 子球の分化と生育に及ぼすりん片切断の効果	-----	55
第4項 設定培養条件の数種類のユリへの適用	-----	56
第2節 子球培養	-----	61

第1項	子球の生育に及ぼす培地中のNAAの影響	61
第2項	子球の生育に及ぼす培地中のショ糖濃度の影響	62
第3項	子球の生育に及ぼす培養温度の影響	63
第4項	設定培養条件の数種類のユリへの適用	68
第3節	葉片培養および茎の節培養	70
第1項	葉片培養	70
第2項	節培養	71
第4節	培養球根の栽培	76
第5節	考察	78
第6節	摘要	89
第III章	組織培養を利用した生産の体系化	91
第1節	液体培養による子球の増殖	92
第1項	スケールアップに適した簡便な培養方法の検討	92
第2項	液体通気りん片培養における子球の分化と生育に及ぼす培地中の 主要塩類濃度、ショ糖濃度および生長調節物質の影響	94
第3項	液体通気りん片培養における子球の分化と生育に及ぼす 通気ガス中の酸素濃度、培養温度および照明の影響	99
第4項	液体通気りん片培養における子球の分化と生育に及ぼす 供試球根の齢とりん片の部位の影響	100
第5項	液体通気りん片培養における子球の分化数と球径および 培地養分の経時変化	105
第6項	液体振盪子球培養における子球の生育に及ぼす 培地中のショ糖濃度と生長調節物質の影響	110
第7項	液体振盪子球培養における子球の生育に及ぼす培養温度の影響	111
第2節	液体通気培養の実用化試験	111
第1項	液体通気培養における培養切片からの子球の分化と生育に及ぼす 培養切片作成方法および培養切片密度の影響	114
第2項	簡易培養槽による液体通気培養	115
第3項	簡易培養槽を用いた培養のスケールアップ試験	118
第3節	液体通気培養球根の栽培による成球（開花株）生産の検討	119
第1項	通気培養球根の出葉と初期生育に及ぼす冷蔵処理とGA <sub>3</sub> 浸漬処理の影響	123
第2項	通気培養球根の栽培による開花株生産	124

第4節 考察	-----	134
第5節 摘要	-----	148
第IV章 総括	-----	151
引用文献	-----	159
Summary	-----	177

ユリ属植物は北半球の亜熱帯から亜寒帯にわたり広く自生し、その数はおよそ 130種におよび、わが国にも15種が分布するとされている(175)。ユリ属の多くは自生種のままでも美しく、園芸植物として重要な地位を占めており、わが国においても、テッポウユリ、ササユリ、オトメユリ、ヤマユリ、カノコユリなどは、鑑賞用として人気が高い。また、オニユリ、コオニユリなどは、食用としても利用されている。

これらのユリの多くは、一般に、鱗片、木子、珠芽などの植物体の一部を利用した栄養繁殖法によって球根増殖を行なっているため、親植物が病気に罹っていると、新しく形成される球根にも病気が伝染することになる。一方、植物はウイルス病に対して治癒能力を持たないことが知られている。このウイルス病の予防には、主に耕種的方法がとられ、一部に弱毒ウイルスの干渉作用を利用した防御法(158, 159, 228)も用いられてきた。また、近年、遺伝子操作技術を利用したウイルス抵抗性育種の進展も見られるようになった(143, 228)。しかし、現状では、ウイルスに罹病した植物体に対して有効な抗ウイルス農薬などの開発にまでは至っていない。したがって、一旦ウイルスに罹病した植物個体は、一生ウイルスに汚染されていることになる。このため、植物の種々の病気の中でも、ウイルスによる汚染は深刻である。ユリ栽培圃場においても、ウイルスによる罹病が大きな問題となっており、その切り花品質(草丈や花の数・大きさ・形状など)の低下や球根収量の減少がみられている。例えば、テッポウユリの球根は、第2次大戦前、わが国の主要な輸出農産物の一つであり、その輸出数量は最盛期に年間約 4,000万球にも達していた。しかし、戦後の輸出再開にあたって、わが国で生産するテッポウユリ球根のウイルス汚染による品質の低下が禍し、また、海外における優良品種の作出ともあいまって、輸出球根数は非常に減少した(75, 76, 91, 173)。このため、テッポウユリ球根の生産地では、育種による品種特性の向上とともに、ウイルスフリー球根の確保が切実な課題となっている。他のユリ類もテッポウユリと同様の問題を抱えており、ハカタユリなどではウイルス汚染のため健全な球根がほとんど失われ、岐阜県などの一部の地域で、細々と栽培されている現状である(174, 175)。また、昭和55年から昭和62年の7年間のユリ球根の輸出数量の推移をみても、減少の傾向を示しており、昭和62年の輸出数量(728万球)は昭和55年の数量(1,413万球)の約半数にまで低下している(140)。この輸出数量の低下も、ウイルス汚染が大きな要因の一つであるといわれ、ユリ類全体の球根生産現場におけるウイルス汚染の問題は、ますます深刻になってきていることが分かる。

このように、ウイルス病の被害が年々拡大する傾向にあることから、茎頂培養法を利用してウイルスに感染していない健全なユリ球根を作成し、生産現場に供給することが強く望まれている。ウイルスに罹病

したユリの茎頂組織の培養によるウイルスフリー化については、テッポウユリを研究材料として、森ら(112)、西沢と西(127)などが報告しており、また、‘エンチャントメント’などの交雑品種についても、ウイルスフリー球根の育成が報告されている(5,6,15)。これらのユリ茎頂培養に関する初期の研究では、培養の途中で異なる組成の培地への移植を必要としたり、土壤へ植えだすことができる程度にまで生育した幼植物体を得るために、4か月以上にわたる培養期間を必要とし、また、土壤へ移植した後に枯死する個体もあるなど、効率のよい培養方法が確立しているとはいえなかった。しかも、この後、ユリ茎頂組織の培養条件を、さらに詳細に検討した報告はみられない(224)。

また、ウイルスフリーの優良球根を栽培現場に供給するためには、茎頂培養法によって得られた球根を、効率よく大量に増殖する方法を確立することも必要である。ウイルスフリー球根を生産する従来の一一般的な方法は、以下のようなものである。まず、茎頂培養によって得られたウイルスフリー小球根を、寒天培養法である程度増殖する。その後、農薬の散布を頻繁に行ない、ウイルスの再感染や他の病害虫の発生を防止しながら、慣行のりん片挿しなどの栄養繁殖法を利用して、寒冷沙ハウスのような隔離栽培施設内で、このウイルスフリー親球根を増殖する。さらに、こうして得られた球根を増殖の親株として、販売用球根を圃場で大量に生産する方法が採用されている。しかし、このような球根生産方式では、栽培施設あるいは圃場で行なう球根の大量増殖の過程で、ウイルスの再感染や病害虫の発生を完全に防止することは困難であり、また、栽培管理に大きな労力を必要とする(8,9,11,16,114)。このため、新しい繁殖技術として、*in vitro* すなわちウイルスや病害虫が存在しない状態で、ユリ植物体の切片から多数の小球根を分化させることのできる組織培養法が着目され、この組織培養を利用したユリ球根の増殖研究も進められてきている(12,28,29,38,40,44,45,90,93,108,129,130,136,154,157,170,176,177,178,179,196,222,223,224)。これらの研究の多くは、外植体の植え付けや移植などの培養の作業工程に大きな労力を必要とする寒天培養による球根増殖に関するものであり、従って、得られた研究結果を、直ちにウイルスフリー球根の実用的な大量増殖技術として利用するためには、培養の形態や方法について、さらに工夫する必要がある。

しかし、最近では、大量増殖を考慮した簡便な培養法を開発することを目的に、液体培地を利用したユリ球根の増殖に関する報告もみられるようになってきている。高山と三沢(195)は、ヤマユリ、カノユリ、テッポウユリを用い、サイトカイニン高濃度の寒天培地上でりん片切片から分化した原基状不定りん片の塊を液体振盪培養することによって、個々のりん片を肥大させ、さらに、このりん片を液体振盪培養して多数の子球を得た。また、TakayamaとTakizawa(201)は、テッポウユリを供試し、容積10ℓのガラス製ジャー・フェルメンターを用いた液体通気培養で、培地1ℓ当たり300～500個の子球を生産したことを報告している。石破ら(64)も、上記の高山らの増殖法に準じ、オリエンタル系ハイブリッド品種のり

ん片を液体振盪培養して子球を分化させ、さらに、この子球を容積 4ℓ のフラスコ内で液体通気培養することによって、その肥大を促進している。高橋 (192) は、テッポウユリ球根の金属製大型タンク内での工業的生産法について検討し、球根を効率よく増殖するためには、通気ガスの酸素濃度を 100% にまで上げて、液体培地中の溶存酸素濃度を高める必要があるとした。一方、田中ら (210) は、彼等が洋ラン、ガーベラ、スパティフィラムなどの培養苗生産に関する研究で検討しているフッ素樹脂フィルム製培養容器 'Culture Bag' (207, 208, 209) をテッポウユリにも適用し、液体培地 108ml に 27 りん片を植え付け、根の分化が少ない大きな子球を、寒天培養と同等以上の数で得られることを示した。

以上のように、組織培養を利用したユリ球根の増殖に関する研究が進む中、本研究では、組織培養系において増殖した球根を利用し、ウイルスフリーであり、且つ優良な形質のユリを短期間に大量生産できる実用的技術の開発をめざした。この目的を達成するため、まず、ユリ球根の茎頂組織から、肥大したりん片を多数有するウイルスフリーの小球根を短期間に形成させる茎頂培養法に関する種々の条件を明らかにした。次いで、茎頂培養で得られたウイルスフリー小球根のりん片などを培養の材料とし、増殖の親球根となるべき小球根を *in vitro* で大量に分化・増殖させることによって、園芸的に望ましい優良な形質を有し、且つウイルスフリーであるユリ球根を効率よく供給できる基本的な増殖体系を確立するための条件について検討を行なった。さらに、この組織培養を利用した増殖体系の実用化をめざして、実際に球根や切り花の栽培を行なっている生産現場においても、大きな培養スケールでのユリ小球根の増殖を実現することができる簡便な培養方法を開発するとともに、この培養法で大量増殖した球根を用いた栽培による成球生産についても検討を加えた。

## 謝 辞

本研究の着手・遂行にあたり、懇切なご指導とご助言を賜った京都大学農学部名誉教授 塚本洋太郎博士と京都大学農学部名誉教授 故浅平 端博士に、謹んで深謝の意を表す。本論文のとりまとめにあたって、適切なご教示とご校閲をいただき、研究途上においてはご便宜とご激励をいただいた京都大学農学部教授矢澤 進博士に深謝の意を表す。

本研究の再開、完成、また、そのとりまとめの機会を賜った和歌山県農協連合会前会長 吉田 裕氏、同前副会長 東岡富一氏、同元専務 小谷義雄氏、同元専務 楠本國藏氏、株式会社和歌山アグリバイオ研究センター元専務 宇田 擴博士、同前専務 伊福 靖博士、同所長 前田久夫博士、御坊市長 柏木 征夫氏に深謝の意を表す。

研究途上において、適切なご助言、ご便宜、ご激励をいただいた日本大学短期大学農学科教授 武田泰明博士、千葉大学助教授 安藤敏夫博士、島根大学教授 細木高志博士、滋賀県立大学教授 重永昌二博士、京都大学農学部附属農場助教授 河瀬晃四郎博士ならびに同助教授 古川良茂博士、京都大学農学部蔬菜花卉研究室の先輩・同期・後輩の各諸氏に心から感謝の意を表す。また、研究再開後、ご便宜、ご激励をいただいた和歌山県農業試験場長 藤田政良氏に感謝の意を表す。

終始ご激励をいただいた近畿大学教授 宇都宮直樹博士、神戸大学助教授 市橋秀樹博士に心から感謝の意を表す。さらに、研究の実施に際し、ご便宜、ご協力をいただいた京都大学農学部附属農場、和歌山県農協連合会、株式会社和歌山アグリバイオ研究センター、社団法人和歌山県農産物加工研究所、和歌山ノーキョウ食品工業株式会社の関係各位に厚く御礼申し上げます。



## 第 I 章 茎頂培養による無病（ウイルスフリー球根）の育成

植物の種苗増殖には、種子繁殖と、株分けや挿し木・接ぎ木のように、親植物の一部を増殖材料とする栄養繁殖の2つの方法がある。栄養繁殖法の場合、親植物と同一の形質の子孫（クローン植物）を増殖することができ、さらに、種子繁殖の場合と比較して、成株になるまでに必要な栽培期間も短くてすむといった利点がある。しかし、栄養繁殖法では、植え付け作業が一般に煩雑で、種子繁殖法と比較して多くの労力を必要とするばかりでなく、罹病した植物体を増殖の材料とすると、増殖された植物にも病気が伝染してしまうことが多いといった問題もある。また、植物の病気の中でもウイルス病の場合は、栄養繁殖すると、その病原ウイルスが非常に高い確率で新個体に移行してしまう。しかも、植物はウイルス病に対して自然治癒能力を持っていないことや、また、効果的な抗ウイルス薬剤などもいまだに開発されていないことから、ウイルス病の感染を防止するためには、隔離施設での栽培、病原ウイルス媒介昆虫の駆除あるいはウイルス検定などによるウイルス病株の確認・抜き取りといったような対策が必要とされてきた。したがって、栄養繁殖によって生産した種苗を用いる植物種の栽培においては、ウイルス病の感染を防止することが重要な栽培技術の一つとなっている。実際、これらの植物では、ウイルス病の蔓延による品質の低下や生産量の減少が大きな問題となっているものが多く、甚だしい場合には、品種や系統の特性を維持することさえも困難である。

重要な園芸植物の一つであるユリ類も、一般に、栄養繁殖法によって球根を増殖しているため、その多くがウイルスによって汚染される可能性が大きい。ユリのウイルス性病害としては、緑色濃淡モザイク病、黄色条斑モザイク病、黄萎病、急性落葉病などが知られている。これらのウイルスに汚染された株では、葉のえ疽性褐色斑点・モザイク症状・矮曲・黄化、落葉、全体的な矮化・萎縮、不開花株や奇形花の発生などの病徴がみられ、切り花や球根収量の減少といった被害も甚だしい。このため、ユリのウイルス病に関する研究は、これまでも多数報告されてきた(238)。それらの報告によると、緑色濃淡モザイクを示す葉には、紐条のウイルスである lily mottle virus あるいは tulip breaking virus が存在し(4, 23, 24)、黄色条斑モザイクを示す葉には、紐条のウイルスである lily symptomless virus と球状のウイルスである lily ringspot virus あるいは cucumber mosaic virus が存在することが確認されている(3, 4, 23, 25, 26, 27, 70, 81, 82, 87, 94, 146)。また、ユリにみられるその他の病原ウイルスとして、arabis mosaic virus、broad bean wilt virus、citrus tatter leaf virus、tobacco rattle virus なども確認されている(10, 63, 238)。

このような植物のウイルス病に対する適切な防除手段を見出せない状況の中で、ウイルスフリー植物を

積極的に育成することを目的に考案し、開発された手段が組織培養法の一つである茎頂培養である。茎頂組織の培養法が開発されたきっかけは、ウイルスに罹病した植物でも、植物体の部位や齢によって病原ウイルスの濃度に違いがみられ、特に、生長点近傍の極く狭い部分には、ウイルスが存在しないか、あるいは存在しても極めて少ないとされたことにあった。このような知見をふまえて、Morel と Martin (109) は、モザイクウイルスに罹病したダリアの茎頂近傍組織を切り出して培養することによって、無ウイルスの植物体を得ることに初めて成功した。この研究以来、茎頂組織の培養法を用いて、ウイルスに汚染されていない植物体を再生する試みが、様々な種類の植物について検討されており、カーネーション、キク、ラン、グラジオラス、フリージア、スイセン、アイリス、アマリリスなど、多数の園芸植物でもウイルスフリー植物の育成が報告されている (19, 22, 35, 55, 56, 110, 185, 186, 193, 206)。ユリ類においても、農事試験場の森ら (112) がウイルスに罹病したテッポウユリの茎頂培養によるウイルスフリー化に成功しており、スカシユリ系の交雑品種などについてのウイルスフリー植物の育成も報告されている (5, 6, 15)。しかし、これらの報告では、茎頂の培養を開始してからウイルスフリーの植物体を育成するまでに長期間を必要とする、あるいは培養効率が低いなどの実用上改良すべき点がいくつか残されている。

本章では、優良な形質のウイルスフリー（無病）ユリ球根を増殖するための出発点として茎頂培養法を利用すべく、従来のユリ茎頂組織の培養においてみられる問題点の解決をめざした。まず、ウイルスフリー球根を *in vitro* で大量に増殖するため、その培養材料として利用できる幼植物・小球根を短期間に効率よく育成する茎頂培養法の確立を目的に実験を行なった。次いで、茎頂培養に由来する植物体のウイルスの保毒状態についても調査した。

## 第1節 茎頂組織の生育に及ぼす培養条件の影響

優良な品種はその花や草姿が美しく、耐病性などに優れていることは当然であるが、その品種としての特性を発揮するためには、植物体が無病であることも大切である。したがって、優良品種を増殖する場合には、無病球根を材料とすることが必要となる。ウイルス病も含めた無病球根を作成するためには、茎頂組織を分離して培養しなければならないが、増殖という観点からすると、茎頂培養によって得られた植物体は、単に無病であるだけでなく、次代の増殖材料として十分に利用できるだけの子球分化能力を有する、生育旺盛な個体であることが望まれる。従来のユリの茎頂培養に関する報告では、ウイルスフリー球根の育成自体に研究の重点が置かれており、その後の *in vitro* での球根の大量増殖を考慮しながら検討を行なっているものはない (238)。本研究は、ユリ類全般の組織培養を利用した大量増殖体系の確立を目的として研究を進めており、ウイルス病も含めた無病球根を育成する茎頂組織の培養は、そのプロセスの

出発点となるものである。

本節では、莖頂組織の培養において、肥大したりん片を有する小球を短期間に効率よく形成させる条件を明らかにするため、以下の実験を行なった。莖頂組織からの葉条（球根）や根の分化・生長に及ぼす主要塩類組成、窒素形態、ビタミン・アミノ酸類、pH、ショ糖濃度、寒天濃度、生長調節物質の種類と濃度などの培地条件の影響について最初に調べ、次に、温度、照度、照明時間、培地に対する莖頂組織の置床方向などの培養環境条件の影響について調べた。

### 第1項 培地中の主要塩類組成、窒素形態およびビタミン・アミノ酸類

植物組織を培養するための培地組成に関しては、数多くの報告がなされている。その無機微量塩類組成についてみると、各処方とも、植物の生育に必要とされるものを含み、大きな差異はみられない。しかし、主要塩類組成については、その濃度や窒素形態などが培養植物の生育や形態形成に大きな影響を及ぼす研究例が多数報告されている（42, 46, 49, 107, 148, 150, 165）。そこで、培地中の主要塩類組成を、その濃度が高く、硝酸態窒素とアンモニア態窒素をほぼ2対1の割合で含む Murashigeと Skoog（以下MS, 115）によるもの（第1表）と、塩類濃度が低く、窒素形態として硝酸態のみを含有する1/2 Knop液あるいはWhite (230) によるもの（第2表）の3処方とした場合およびMS処方の窒素形態を変更した場合の莖頂組織の生育に及ぼす影響を比較した。また、培地中のビタミン・アミノ酸類が莖頂組織の生育に及ぼす影響についても検討を行った。

#### 材料および方法

実験には、テッポウユリ (*Lilium longiflorum* Thunb.) ‘ジョージア’ を供試した。

供試する球根の滅菌と莖頂組織の分離は以下のように行なった。球根の根と外側のりん片および底盤部の大部分を切除し、中心部に小りん片数枚と莖頂組織を含む10mm角の底盤部組織に調整した。調整した組織を水洗した後、オスバン（塩化ベンザルコニウム10%w/v液）の10倍希釈液で10分間、次いでアンチホルミン（次亜塩素酸ナトリウム10%w/v）の25倍希釈液で8分間、それぞれ浸漬振とうして滅菌した。さらに、滅菌した組織を滅菌水で3回洗浄し、小りん片をピンセットで取り除いた後、両刃カミソリの破片をホルダーで固定したメスを用い、双眼実体顕微鏡下で葉原基1～2枚を含む莖頂組織（幅0.4～0.7mm、高さ0.5～0.8mm角）を切り取り、外植体とした。なお、莖頂組織の分離・採取時期に関する予備試験において、開花後数週間して掘り上げ、休眠していると予想される球根の莖頂組織や、既に抽台を開始した冷蔵貯蔵球の莖頂組織など、いずれの時期に莖頂組織を分離・培養しても、ほぼ同様に幼植物体を育成できることをみている。従って、以下の実験においても、莖頂組織の分離・採取時期については、特に記していない。

Table 1. Composition of MS's macro-elements and Fe

Ingredient	mg·liter <sup>-1</sup>
<u>Macro-elements</u>	
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1,650
KNO <sub>3</sub>	1,900
CaCl <sub>2</sub> ·7H <sub>2</sub> O	440
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	370
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
<u>Fe</u>	
Na <sub>2</sub> -EDTA	37.3
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27.8

Table 2. Composition of White's and 1/2 Knop's macro-elements

Ingredient	mg·liter <sup>-1</sup>	Ingredient	mg·liter <sup>-1</sup>
<u>White</u>		<u>1/2 Knop</u>	
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	200	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	500
KNO <sub>3</sub>	80	KNO <sub>3</sub>	125
KCl	65	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	125
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	200	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	125
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	16.5		
MgSO <sub>4</sub>	360		

Table 3. Composition of RN's micro-elements and organics

Ingredient	mg·liter <sup>-1</sup>	Ingredient	mg·liter <sup>-1</sup>
<u>Micro-elements</u>		<u>Organics</u>	
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	25.7	Glycine	20.0
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	10.0	myo-Inositol	100.0
ZnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	10.0	Nicotinic acid	5.0
KI	1.0	Pyridoxine-HCl	0.5
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.25	Thiamine-HCl	0.5
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.025	Folic acid	0.5
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.025	Biotin	0.05

主要塩類組成の影響をみた実験に使用する培地には、MS、1/2 Knop 液あるいはWhite の主要塩類組成に、それぞれ鉄源としてMSの処方（第1表）、微量要素および有機物質として Ringeと Nitsch の処方（以下RN、153、第3表）を加え、ショ糖を $40\text{g}\cdot\text{liter}^{-1}$ 、寒天を $8\text{g}\cdot\text{liter}^{-1}$ の濃度になるように添加した後、pH5.7に調整したものを使用した。窒素形態の影響をみた実験では、上記培地の主要塩類組成をMS処方、MS処方の硝酸アンモニウムを硝酸ナトリウムで置換し、さらに窒素濃度はMS処方と同じにしたもの（以下MS-NO<sub>3</sub>）、MS処方の硝酸アンモニウムと硝酸カリウムを塩化アンモニウムで置換し、さらに塩化カリウムを加えて窒素とカリウムの濃度をMS処方と同じにしたもの（以下MS-NH<sub>4</sub>）およびWhiteの処方に変更したものをを用いた。また、ビタミン・アミノ酸類の影響をみた実験では、生長調節物質として $\alpha$ -ナフトレン酢酸（以下NAA）を $0.1\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$ の濃度になるように添加し、主要塩類組成をMS処方とした上記培地中のRN処方の有機物組成のうち、イノシトール、チアミンだけを、それぞれ単独であるいは組合せて添加した培地、およびRN処方の有機物組成の全てを添加しなかった培地を用いた。培地の滅菌は、 $1.2\text{kg}/\text{cm}^2 \cdot 120^\circ\text{C} \cdot 12$ 分間の条件で行なった。

培養は、直径25mmの試験管に分注した20mlの培地上に、切り取った茎頂組織の生長円錐体側を上方向にして、基部切り口側が培地に接するように置床した後、昼光色蛍光灯による照明装置を備えつけた恒温器内に静置して行なった。培養条件は、温度23~24°C、照度1,500 lxの連続照明とした。

## 結果

各処方の主要塩類組成培地上における、培養75日後の茎頂組織の生育を第4表に示した。MS処方の主要塩類組成を用いた培地上に置床された茎頂組織は速やかに発根し、その後の葉条の形成や根の生育も良好であった。その葉条形成率と発根率は、ともに90%であり、葉条の伸長した葉の基部がりん片様にわずかに肥大したものもみられた。1/2 Knop液あるいはWhiteの処方を用いた場合、茎頂組織からの葉条形成率と発根率が、前者の処方では、それぞれ60%と20%、後者の処方では、ともに50%となり、MS組成の基本培地を用いた場合の結果と比較して低くなった。また、1/2 Knop液あるいはWhiteの処方を用いた培地では、伸長する葉の数も少なく、葉の基部の肥大・りん片化もほとんどみられなかった。

主要塩類組成中の窒素形態の影響をみた実験では、培養45日目における葉条の形成・発根などの茎頂組織の生育は、MS処方の主要塩類組成培地上で最も良好であり、MS-NH<sub>4</sub>処方とMS-NO<sub>3</sub>処方での生育がほぼ同程度でこれに次ぎ、Whiteの処方では劣っていた。培養75日目になると、MS、MS-NH<sub>4</sub>、MS-NO<sub>3</sub>の各処方の主要塩類組成培地で培養した茎頂組織から得られた葉条と根の生育に、ほとんど差は認められなかった。一方、Whiteの処方の培地上での生育は、他の培地のものと比較して明らかに劣っていた（第1図）。

NAAを添加したMS主要塩類組成培地中の有機物質（ビタミン・アミノ酸類）のRN処方を変更した培地あ

Table 4. Influence of the composition of macro-elements in the medium on growth of shoot tips of *L. longiflorum* 'Georgia' cultured *in vitro*. (Culture period : 75 days)

macro-element	% of explants with shoot	No. of leaves per explant	% of explants with roots
Murashige-Skoog (MS)	90	7	90
1/2Knop	60	3	20
White	50	2	50

Culture medium : Any one of above macro-elements, Ringe-Nitsch (RN) 's micro elements and organics, 40g·liter<sup>-1</sup> sucrose, 8g·liter<sup>-1</sup> agar, pH5.7.

Culturing conditions: 23 °C, continuous light (1,500 lux) .

Culture materials : Shoot tip with one or two leaf primordium (0.4~0.7mm in width, 0.5~0.8mm in height) was excised and placed in upright position in a test tube (25mm diam) containing 20 ml medium.

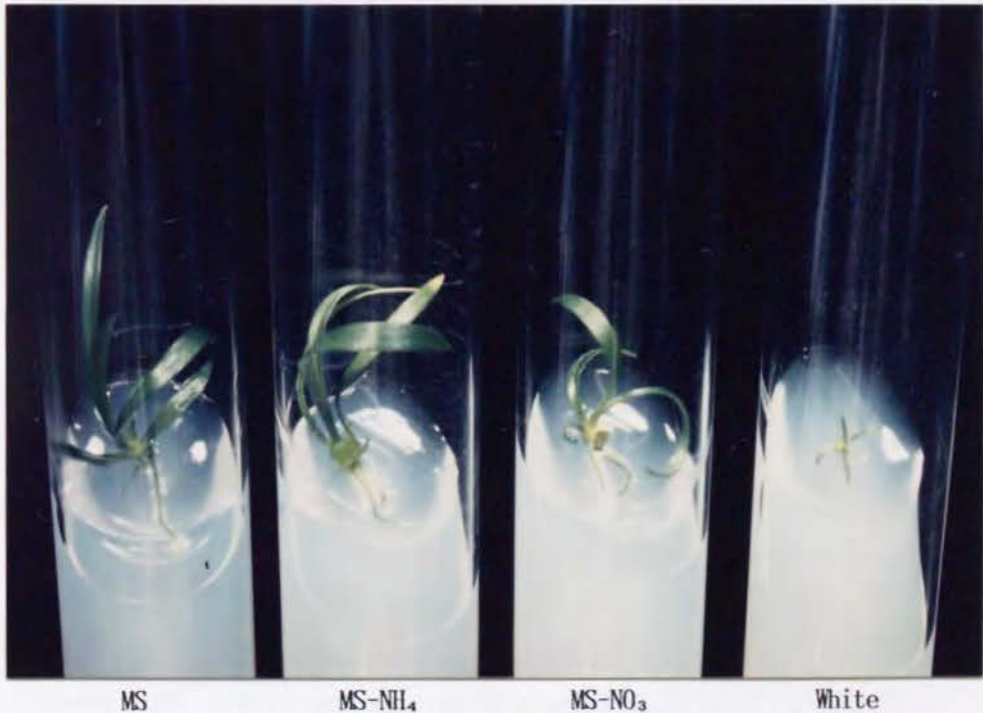


Fig. 1. Influence of macro-elements in the medium on growth of shoot tips of *L. longiflorum* 'Georgia' cultured *in vitro*. (Culture period : 75 days)

Culture medium: MS and White media were the same as in Table 4.

In the MS-NH<sub>4</sub> medium, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> and KNO<sub>3</sub> of MS's macro-elements were replaced with NH<sub>4</sub>Cl, and KCl was supplemented to compensate for decrease of K concentration.

In the MS-NO<sub>3</sub> medium, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> of MS's macro-elements was replaced with NaNO<sub>3</sub>.

The N concentration of macro-elements of both media was same as that of MS.

For culturing conditions and materials: See Table 4 .



Fig. 2. Influence of organic-addenda in the medium on growth of shoot tips of *L. longiflorum* 'Georgia' cultured *in vitro* . (Culture period : 70 days)

Upper left : Basal medium (MS;macro-elements and Fe ,RN;micro-elements and organics (vitamins and amino acids)) .

Upper right : MS, RN's micro-elements, thiamin-HCl and myo-inositol of RN organics.

Lower left : Basal medium minus RN's organics.

Lower center: MS, RN's micro-elements, myo-inositol of RN's organics.

Lower right : MS, RN's micro-elements, thiamin-HCl of RN's organics.

All these media contained  $40\text{g}\cdot\text{liter}^{-1}$ sucrose and  $0.1\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$ NAA, and the pH was adjusted to 5.7.

For culturing conditions and materials: See Table 4 .

るいは全て除いた培地上での、培養70日後の茎頂組織の生育を第2図に示した。イノシトールあるいはチアミンだけを添加した培地のみならず、ビタミン・アミノ酸類を全く添加していない培地上においても、茎頂組織からの葉条の形成、葉の伸長、発根は旺盛であった。また、いずれの培地上でも、ピンセットで分離・採取して継代し、りん片培養による増殖に利用できる程度に肥大したりん片を数枚形成した。

## 第2項 培地pHと培地中の寒天濃度

植物の生育に影響を及ぼす土壤中の養分の溶解度や微生物の活動などは、土壌pHの変動によって、大きな影響をうける。一方、植物は、その種や品種などによって、各養分の要求量や吸収量に差異があり、また、過剰に吸収した養分に対する生育反応も異なっている。それぞれの植物の生育に適するpH範囲は、これらの要因が相互に関連して決定されているといえる。このことを考慮すると、培養する植物種によっては、その生育に適したpHが、一般に調整されている植物組織培養用培地のpH5.5前後の範囲と異なっている場合も考えられる。ここでは、ユリの茎頂の生育に適した培地pHの範囲を明らかにするための実験を行なった。また、土壌の湿度・硬度などの物理的条件も植物の生育に影響を及ぼすことから、培地の硬度(寒天濃度)の影響についても検討した。

### 材料および方法

実験には、テッポウユリ‘ジョージア’を供試し、球根の滅菌と茎頂組織の分離は、前項と同様に行なった。また、寒天培地では、pHを低くすると培地が軟弱になり、pHを高くすると硬くなる傾向があることが知られているので、培地pHに関する実験では、培地の固さの影響を除外し、培地pH自体の影響をみるため、分離・採取した茎頂組織は、液体培地のペーパーウイック法によって培養した。茎頂組織の置床方向、培養容器、培地量、培養中の温度・照明などの培養条件は前項に準じた。

培地には、主要塩類組成と鉄源としてMSの処方、微量元素および有機物質としてRNの処方を加え、生長調節物質としてNAAを $0.1\text{ mg}\cdot\text{liter}^{-1}$ 、ショ糖を $40\text{ g}\cdot\text{liter}^{-1}$ の濃度になるように添加したものをを用い、前項と同様の条件でオートクレーブ滅菌した。培地pHの影響に関する実験については、培地の滅菌前に、1.0あるいは0.1規定の塩酸と水酸化ナトリウムを用い、3.7、4.7、5.7、6.7および7.7にpHを調整した。また、同様にpH調整した寒天培地( $8\text{ g}\cdot\text{liter}^{-1}$ )での培養も、対照として行なった。寒天濃度の影響をみた実験では、pHを5.7に調整した同様の培地の寒天濃度を0、4、8、および $12\text{ g}\cdot\text{liter}^{-1}$ とし、寒天無添加の液体培地では、1 rpmの速度で回転培養を行なった。

### 結果

培地pHの影響をみると、ペーパーウイック法で培養したろ紙床上の茎頂組織から形成された葉条の葉の伸長、葉の基部の肥大・りん片化および根重は初期pH値を5.7に調整した培地で最大となった。5.7より



酸性側あるいはアルカリ側に初期pHの調整値が移行するにつれて、葉条および根の生育はやや劣る傾向があったが、かなり酸性度の強い培地 (pH3.7) と弱アルカリ性の培地 (pH7.7) においても葉条および根の生育は認められた (第5表、第3図)。寒天培地を用いて培養を行なった場合、初期pH調整値 4.7~6.7 の範囲では、葉条および根の生育はペーパーウィック培養法のものと同様であり、葉の基部が肥大・りん片化し、多数の根を分化した幼植物が得られた。しかし、初期pHを3.7に調整した軟弱な培地では、茎頂組織の置床操作はやや困難で、培地中に埋没した茎頂組織の生育が不良となったりするため、培養結果に不揃いが生じた。また、pH 7.7に調整した硬い培地では、置床した茎頂組織から根は分化・伸長せず、葉条の生育も認められなかった。

異なる寒天濃度で培養した培養70日後の茎頂組織の生育を第4図に示した。液体培地での回転培養や寒天を $12 \text{ g} \cdot \text{liter}^{-1}$ の濃度で添加した硬い培地で培養された茎頂組織では、葉条および根の形成・生育が抑制された。一方、寒天 $4 \text{ g} \cdot \text{liter}^{-1}$ のやや軟弱な培地や $8 \text{ g} \cdot \text{liter}^{-1}$ のやや硬い培地において、茎頂組織から形成される葉条や根は良好な生育を示し、肥大したりん片も認められた。なお、寒天 $4 \text{ g} \cdot \text{liter}^{-1}$ を添加した培地では、置床した茎頂組織が寒天培地中に埋没する場合もあり、 $8 \text{ g} \cdot \text{liter}^{-1}$ 添加培地と比較すると、生存率がやや低く、また、カルスを形成するものも多くなる傾向があった。

### 第3項 培地中のシヨ糖濃度

#### 材料および方法

実験には、テッポウユリ‘ジョージア’を供試し、球根の滅菌と茎頂組織の分離・置床方向、培養容器、培地量、培養中の温度・照明などの培養条件は第1項に準じた。

培地には、主要塩類組成と鉄源としてMSの処方、微量元素および有機物質としてRNの処方を加え、生長調節物質としてNAAを $0.1 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ 、寒天を $8 \text{ g} \cdot \text{liter}^{-1}$ の濃度になるように添加し、pHを5.7に調整したものをを用いた。検討する培地中のシヨ糖濃度は、10、20、40および $80 \text{ g} \cdot \text{liter}^{-1}$ とした。第1項と同様の条件で、培地をオートクレーブ滅菌した。

#### 結果

シヨ糖濃度を $20 \text{ g} \cdot \text{liter}^{-1}$ 、 $40 \text{ g} \cdot \text{liter}^{-1}$ とした培地において、茎頂組織から形成された幼植物の葉条は旺盛な生育を示した。また、 $20 \text{ g} \cdot \text{liter}^{-1}$ のシヨ糖濃度の培地上の葉条は葉を伸長する傾向が強く、一方、 $40 \text{ g} \cdot \text{liter}^{-1}$ の培地ではりん片の形成や肥大が促進される傾向があった。シヨ糖濃度を $80 \text{ g} \cdot \text{liter}^{-1}$ に高めた場合、茎頂組織からの根の分化と肥大が非常に旺盛となったが、りん片の肥大に対する促進効果はあまりみられず、また、葉の伸長は抑制された (第6表)。

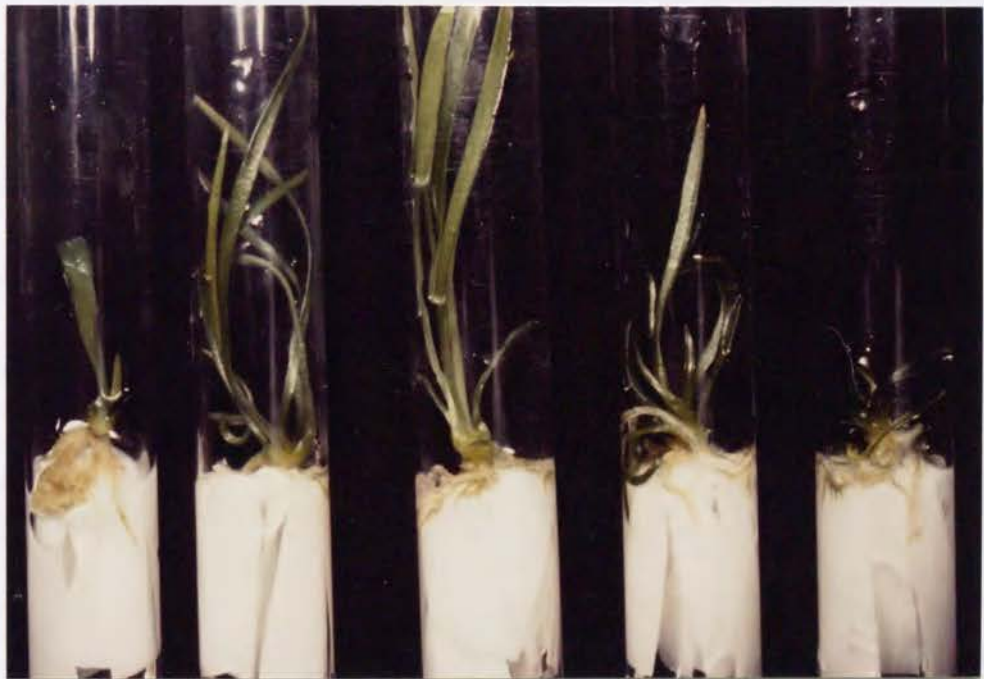
Table 5. Influence of changing the pH of the medium on growth of shoot tips of *L. longiflorum* 'Georgia' cultured in vitro. (Culture period : 70 days)

pH	FW of shoots per explant (mg)	No. of scales per explant			total	FW of roots per explant (mg)
		$\sim \geq 20\text{mg}$ (Fw)	$> \sim \geq 10\text{mg}$ (FW)	$> \sim \geq 5\text{mg}$ (FW)		
3.7	148.9	0.8	2.4	0.1	3.3	434.5
4.7	360.0	1.0	1.4	1.5	3.9	610.0
5.7	423.0	1.5	3.0	1.5	6.0	775.0
6.7	285.5	0.6	4.0	1.1	5.7	472.3
7.7	227.0	0.1	1.4	1.2	2.7	422.0

Shoot tips were cultured on paper-wick supports in liquid media.

Culture medium: MS's macro-elements, RN's micro-elements and organics,  $40\text{g}\cdot\text{liter}^{-1}$  sucrose,  $0.1\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$  NAA, pH5.7 .

For culturing conditions and materials: See Table 4.



pH 3.7 4.7 5.7 6.7 7.7

Fig. 3. Influence of changing the pH of the medium on growth of shoot tips of *L. longiflorum* 'Georgia' cultured in vitro. (Culture period :70 days )

Shoot tips were cultured on paper-wick supports in liquid media.

For culture medium, culturing conditions and materials: See Table 5.



Agar concn  
(g·liter<sup>-1</sup>)                      0                      4                      8                      12

Fig. 4. Influence of agar concentration in the medium on growth of shoot tips of *L. longiflorum* 'Georgia' cultured in vitro. (Culture period : 70 days)

Culture medium: The same medium as in Table 5 was used except for changing the concentration of agar. In liquid culture (0g·liter<sup>-1</sup> agar), culture tubes were rotated at 1 rpm.

For culturing conditions and materials: See Table 4.

Table 6. Influence of sucrose concentration in the medium on growth of shoot tips of *L. longiflorum* 'Georgia' cultured in vitro. (Culture period : 70 days)

Sucrose concn (g·liter <sup>-1</sup> )	FW of shoots per explant (mg)	No. of scales per explant				total	FW of roots per explant (mg)
		~≥20mg (Fw)	20 >~≥10mg (FW)	10 >~≥5mg (FW)			
10	84.0	0	0.2	1.0	1.2	105.0	
20	301.0	0.1	1.3	1.9	3.3	497.0	
40	264.5	1.0	1.9	1.0	3.9	753.5	
80	91.0	0.5	2.0	2.4	4.9	1018.5	

Culture medium: The same medium as in Table 5 except for the addition of 8g·liter<sup>-1</sup> agar and changing the sucrose concentration was used.

For culturing conditions and materials: See Table 4.

## 第4項 培地中の生長調節物質の種類と濃度

### 材料および方法

本項の実験には、テッポウユリ ‘ジョージア’ と ‘ヒノモト’、カノコユリ (*Lilium speciosum* Thunb.) ‘内田かのご’、ササユリ (*L. japonicum* Thunb.)、ハカタユリ (*L. brownii* var. *colchesteri* Wilson)、ヤマユリ (*L. auratum* Lindl.)、トサヒメユリ (*L. concolor* Salisb.) およびアジアチックハイブリッド群のミッドセンチュリーハイブリッド系品種である ‘エンチャントメント’、‘金扇’ と ‘烏羽玉’ を供試した。

球根の滅菌と茎頂組織の分離・置床方向、培養容器、培地量、培養中の温度・照明などの培養条件は第1項に準じた。

培地には、主要塩類組成と鉄源としてMSの処方、微量要素および有機物質としてRNの処方を加え、ショ糖を  $40\text{g}\cdot\text{liter}^{-1}$ 、寒天を  $8\text{g}\cdot\text{liter}^{-1}$  および検討する生長調節物質を所定の濃度になるように添加し、pHを5.7に調整したものをを用いた。培地の滅菌は、第1項と同様に行なった。

生長調節物質の種類は、オーキシシンとして、NAA、インドール酢酸(以下IAA)あるいは2,4ジクロロフェノキシ酢酸(以下2,4-D)、サイトカイニンとして、6ベンジルアミノプリン(以下BA)あるいはカイネチンであり、 $0.01$ 、 $0.1$ 、 $1.0\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$ の濃度範囲で、茎頂組織の生育に及ぼすその影響を検討した。

また、NAA  $0.1\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$  あるいはBA  $1.0\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$ 添加培地で培養中の茎頂組織を、随時FAAで固定し、ブタノール・アルコールシリーズで脱水、パラフィンに包埋して厚さ $10\mu\text{m}$ の連続切片とした。作成した切片を、サフラニン・ファストグリーンにより染色した後、顕微鏡下で組織観察を行なった。

### 結果

NAA ( $0\sim 1.0\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$ )を添加した培地で70日間培養したテッポウユリ ‘ひのもと’ 茎頂組織の生育を第7表と第5図に示した。NAA無添加の培地上では、茎頂組織からの発根数が少なく、伸長した葉の基部の肥大・りん片化の程度も小さかった。NAAを $0.1\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$ の濃度で添加した培地上では、形成された葉条から多数の葉や根が伸長し、葉の基部が肥大してりん片様になっているものも多く認められた。 $0.01\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$ を添加した場合でも葉の伸長はみられたが、その基部の肥大・りん片化の程度は、 $0.1\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$ 添加培地で培養して得られた葉条のものと比較すると劣っていた。 $1.0\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$ を添加した培地では、多数の根が分化したが、根や葉の伸長および葉の基部の肥大・りん片化はむしろ抑制された。

つぎに、NAA ( $0.1\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$ )、IAA ( $0.01\sim 1.0\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$ )あるいは2,4-D ( $0.01\sim 1.0\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$ )を所定の濃度で添加した培地上で、テッポウユリ ‘ジョージア’の茎頂組織を80日間培養した結果を第8表に示した。2,4-Dの添加は、茎頂組織から形成される葉条の生育に対してほとんど促進効果を示さな

った。逆に、 $1.0\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$  まで濃度を高めると、葉条や根の生育は完全に抑制された。IAA を添加した場合、 $0.01\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$  の濃度では、形成された葉条の生育に対する促進効果は認められなかった。しかし、 $0.1\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$  の濃度では、NAA  $0.1\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$  添加培地上で形成される小球と同程度に肥大した球根が得られた。一方、NAA  $0.1\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$  を添加した培地では、葉条の葉が伸長し、根の生育もさらに良好となった。また、NAA 添加培地の葉条から形成された小球の肥大程度は、IAA 添加培地上のものと比較して、培養個体による差異も小さく、生育が揃っていた。なお、いずれのオーキシンを添加しても、茎頂組織からのカルス形成率は、無添加培地のものと比較して、高くなる傾向があった。

カノコユリ ‘内田かのか’ において、基本培地中に添加するオーキシンとして、NAA、IAA および 2,4-D を用い、その濃度 ( $0.01 \sim 1.0\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$ ) の影響について検討した実験の培養70日後の結果を第9表に示した。

カノコユリの場合、生長調節物質無添加の培地上でも、培養24日後には茎頂組織基部の肥大が認められ、培養40日目になると、葉原基も肥大・緑色化しており、根を分化している個体もみられた。培養70日後には、新たな葉原基も分化・肥大して、直径5mm程度の球根となった。一方、オーキシン類 (NAA、IAA、2,4-D;  $0.01, 0.1, 1.0\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$ ) の添加は茎頂組織基部の肥大を促進した。特に、NAA  $0.1, 1.0\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$ 、2,4-D  $1.0\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$  あるいは IAA  $1.0\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$  を添加した場合、その傾向が明らかとなった。NAA は発根に対しても促進効果を示したが、 $1.0\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$  の濃度では太く短い異常な形態の根が多く、分化した根がお互いに癒合したものもみられた。球根の形成・肥大に対しては、前述のように、生長調節物質無添加の培地でも、直径5mm程度の大きさの球根が形成されたため、オーキシン添加による促進効果は明確ではなかった。しかし、培養を70日目以降もさらに続けると、IAA あるいは NAA を  $0.1\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$  添加した培地で形成された球根では、生長調節物質無添加培地と比較して、りん片の肥大・充実が一層すすみ、葉の伸長もみられた。また、NAA  $0.1\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$  を添加した場合、茎頂組織の肥大した基部から、新たな芽が分化・生育し、複数個の球根が得られた (第6図)。NAA  $0.1\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$  添加培地で培養した茎頂組織の縦断切片の組織観察から、培養14日目では、茎頂組織の基部の細胞にわずかに分裂が認められるだけであるが、培養25日目には、基部細胞での分裂・肥大とともに、生長点部位での葉原基の分化もみられることがわかった (第7図 (A) (B))。カルスの形成と生長には、2,4-D が適しており、2,4-D  $1.0\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$  の濃度でのカルス形成率は90%となった (第9表、第8図)。

ササユリ、ハカタユリ、スカシユリ ‘清津紅’ においても、培地に添加した NAA ( $0.01, 0.1, 1.0\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$ ) が茎頂組織の生育に及ぼす影響を調べた。ササユリ、ハカタユリでは、NAA 添加の有無にかかわらず、生存率は80~100%と高かった。一方、‘清津紅’ では、NAA 無添加で10%、 $0.01\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$  添加で20%、 $0.1\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$  添加で40%、 $1.0\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$  添加で100%と、NAA 濃度の上昇とともに生存率

Table 7. Influence of NAA concentration in the medium on growth of shoot tips of *L. longiflorum* 'Hinomoto' cultured in vitro. (Culture period : 70 days)

NAA concn (mg·liter <sup>-1</sup> )	FW of shoots per explant (mg)	No. of scales per explant				Total	No. of leaves per explant	FW of roots per explant (mg)
		~≥20mg 20 (Fw)	>~≥10mg 10 (Fw)	>~≥5mg (Fw)				
0	271.3	0.0	1.8	6.3	8.1	7.1	91.3	
0.01	451.3	0.1	2.6	4.5	7.2	6.0	272.5	
0.1	911.3	0.9	4.9	3.6	9.4	5.1	1480.0	
1.0	47.5	0.0	0.0	2.0	2.0	0.3	647.5	

Culture medium: The same medium as in Table 5 was used except for the addition of 8g·liter<sup>-1</sup> agar and changing the NAA concentration.  
For culturing conditions and materials: See Table 4.

Table 8. Influence of auxins in the medium on growth of shoot tips of *L. longiflorum* 'Georgia' cultured in vitro. (Culture period : 80 days)

Auxin	Concn (mg·liter <sup>-1</sup> )	FW of shoots per explant (mg)	No. of leaves per explant	Length of leaves per explant (cm)	No. of scales per explant				FW of roots per explant (mg)
					≥20mg 20 (Fw)	>~≥10mg 10 (Fw)	>~≥5mg (Fw)	Total	
Control	0	97.5	1.3	2.4	1.5	1.0	0.3	2.8	63.3
NAA	0.1	730.0	5.1	7.1	3.9	1.5	0.3	5.7	1028.8
IAA	0.01	95.0	2.5	1.7	0.0	0.0	0.5	0.5	41.3
	0.1	440.7	4.0	4.9	4.0	1.4	0.9	6.3	365.7
	1.0	379.0	3.0	2.0	2.2	0.8	0.0	3.0	522.0
2,4-D	0.01	192.9	2.7	3.9	1.9	0.4	0.0	2.3	89.3
	0.1	136.9	2.7	4.4	1.3	1.0	0.6	2.9	639.4
	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

Culture medium: The same medium as in Table 5 was used except for the addition of 8g·liter<sup>-1</sup> agar and changing the concentration of various auxins.  
For culturing conditions and materials: See Table 4.



NAA  
(mg·liter<sup>-1</sup>)

0                      0.01                      0.1                      1.0

Fig. 5. Influence of NAA concentration in the medium on growth of shoot tips of L. longiflorum 'Hinomoto' cultured in vitro. ( Culture period : 70 days )

For culture medium: See Table 7.

For culturing conditions and materials: See Table 4.



NAA  
(mg·liter<sup>-1</sup>)

0                      0.01                      0.1                      1.0

Fig. 6. Influence of NAA concentration in the medium on growth of shoot tips of L. speciosum 'Uchida' cultured in vitro. ( Culture period : 140 days )

For culture medium: See Table 9.

For culturing conditions and materials: See Table 4.

Table 9. Influence of auxins in the medium on growth of shoot tips of *L. speciosum* 'Uchida' cultured *in vitro*.  
(Culture period : 70 days)

Auxins	Concn (mg·liter <sup>-1</sup> )	% of explants with shoot	Bulblet growth <sup>z</sup>	% of explants with roots	Root growth <sup>y</sup>	% of explants with callus
Control	0	100.0	+++	66.7	++	33.3
NAA	0.01	100.0	++++	100.0	+++	30.0
	0.1	100.0	+++	100.0	++++	0.0
	1.0	20.0	+	100.0	++++	0.0
IAA	0.01	100.0	++++	66.7	+++	33.3
	0.1	100.0	++++	30.0	+++	70.0
	1.0	20.0	++	100.0	***	10.0
2,4-D	0.01	100.0	++++	80.0	+++	80.0
	0.1	100.0	++++	100.0	+++	40.0
	1.0	60.0	+++	16.7	++	90.0

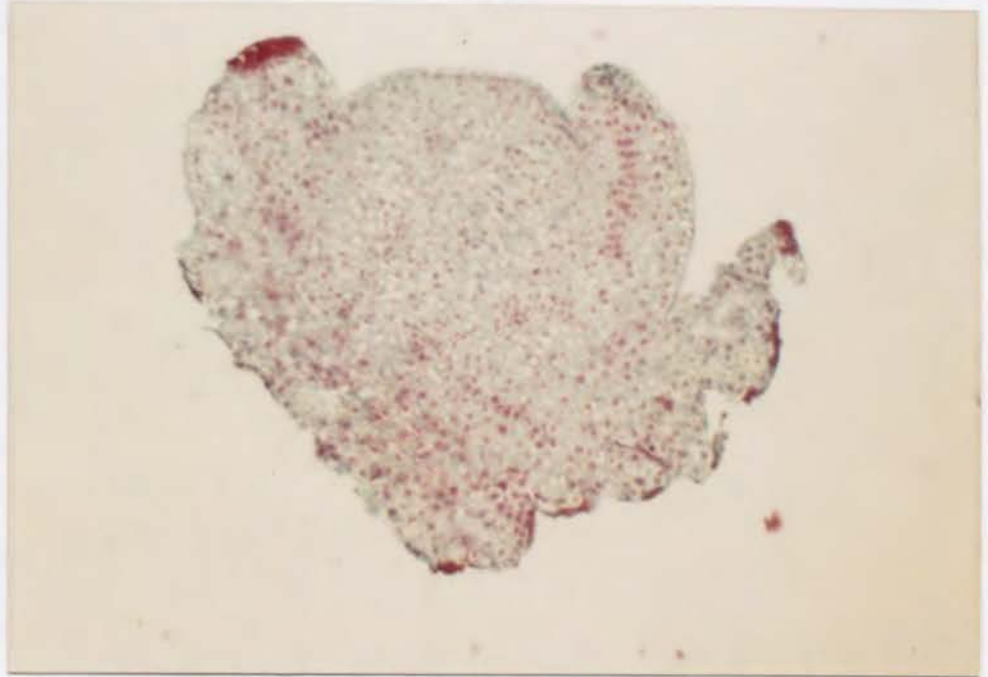
Culture medium: The same medium as in Table 5 was used except for the addition of 8g·liter<sup>-1</sup> agar and changing the concentration of various auxins.

For culturing conditions and materials: See Table 4.

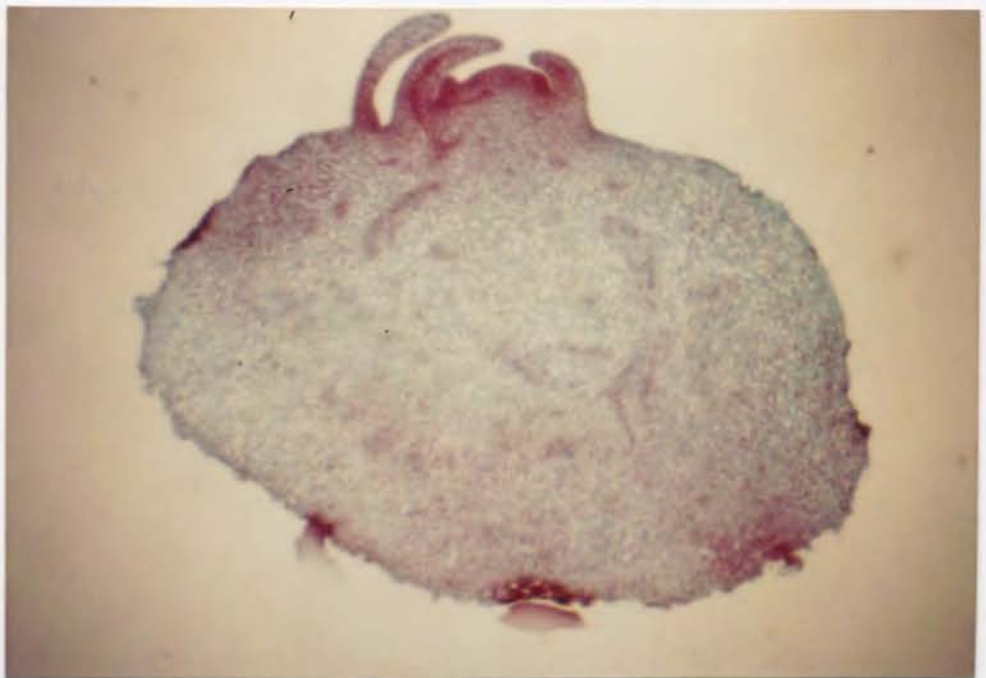
<sup>z</sup> Bulblet growth : += bulblet with diameter of 1 ~ 2mm, ++ = bulblet with diameter of 2 ~ 4mm,  
+++ = bulblet with diameter of 4 ~ 6mm, ++++ = bulblet with diameter of 6mm ~.

<sup>y</sup> Root growth : += few root formation, ++ = several root formation, +++ = many root formation,  
++++ = many elongated root formation, \*\*\* = many abnormal root formation.





(A) A shoot tip after culturing for 14 days.



(B) A shoot tip after culturing for 25 days.

Fig. 7. Longitudinal section of shoot tips of *L. speciosum* 'Uchida' cultured on the medium containing  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$  NAA.

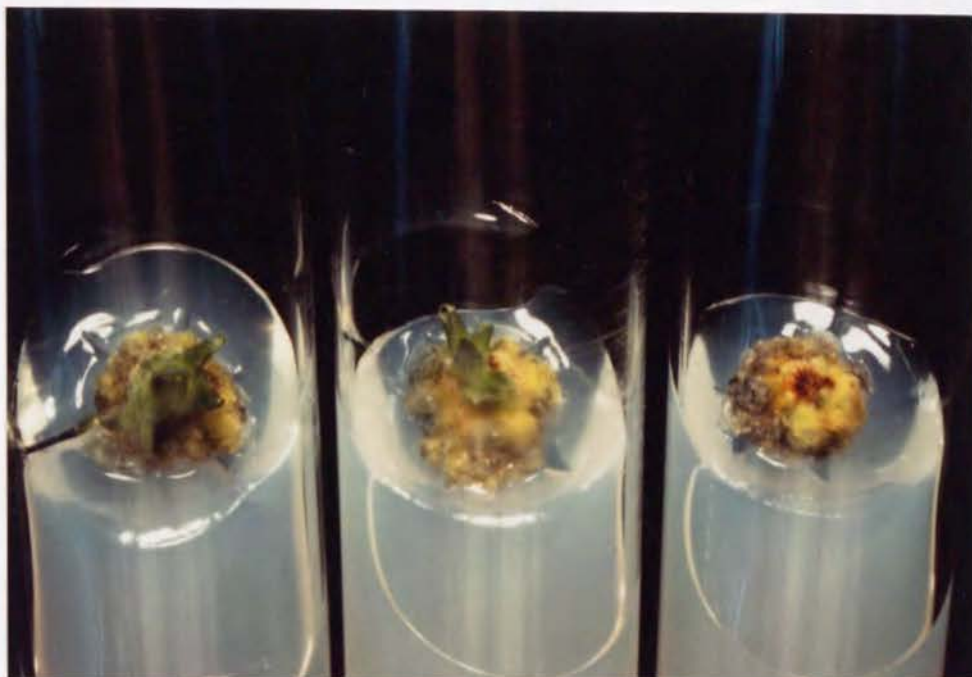


Fig. 8. Callus formation of *L. speciosum* 'Uchida' shoot tips on the medium containing  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{liter}^{-1}$  2,4-D. ( Culture period : 70 days )

For culture medium: See Table 9.

For culturing conditions and materials: See Table 4.



Fig. 9. *L. japonicum* bulblets propagated by shoot-tip culture for 210 days on the medium containing  $0.1 \text{ mg}\cdot\text{liter}^{-1}$  NAA.

For culture medium: See Table 7.

For culturing conditions and materials: See Table 4.

が向上した。莖頂組織から形成された葉条と根の生育についてみると、ササユリでは、NAA 無添加培地で得られる培養70日後の葉条の生体重は 5mgであり、ほとんど生育が認められなかった。しかし、 $0.1\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$  を添加した場合、葉条の生体重は88mgまで増加し、りん片の肥大も認められた。さらに、 $0.1\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$  添加培地で培養を続け、莖頂培養開始から210 日後に調査したところ、球重 2,423mg、球周 3.9 cmの球根が得られた(第9図)。ハカタユリの莖頂組織の場合、NAA  $0.1\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$  添加培地で葉条と根の生育が最も良好であり、肥大したりん片も得られた。さらに、培養がすすむと、根の周囲にカルス組織が形成され、そこから多数の小球が分化した(第10図)。このようにして得られた直径 2~8mm 程度の小球根を鉢上げしたところ、栽培2年目に開花した(第11図)。*‘清津紅’*の莖頂組織では、NAA  $1.0\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$  添加培地において、その生育が最も良好であり、5 ~8 cmに伸長した細い葉が多数形成された。また、りん片の肥大は不十分ではあるが、複数個の小さな球根も得られた(第12図)。これらの小球根も、鉢上げ栽培2年目にはすべて開花した。

培地中の生長調節物質として、サイトカイニン( BAあるいはカイネチン) を所定の濃度 ( $0.01, 0.1, 1.0\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$ ) で添加した場合、テッポウユリ *‘ジョージア’* の莖頂組織では、形成された葉条の葉の伸長や、葉の基部の肥大・りん片化および発根が抑制された。特に、 $1.0\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$  のサイトカイニン濃度では、葉原基がわずかに生長した程度の小さな葉だけを形成する 경우가多く、オーキシン添加でみられた腋芽の生育あるいは不定芽の分化に対する促進効果もなかった。カルス形成率に関しては一定の傾向を示さなかったが、形成されたカルスは大きくなった。なお、NAA  $0.01\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$  に BA  $0.01, 0.1, 1.0\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$  を組合せた濃度の培地では、葉条および根の生育に対する促進効果は認められず、むしろ、NAA 単独添加でみられた葉の伸長、りん片形成、発根などを促進する効果が抑制される傾向があった(第13図)。

カノユリ *‘内田かのご’* の場合、BA  $0.1, 1.0\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$ あるいはカイネチン  $1.0\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$  を添加した培地で培養した莖頂組織は、培養10日目ごろから組織全体が肥大し、40日目にはその表面から小さな不定芽様突起物を多数分化した。培養70日目の観察では、これらの培地で培養された莖頂組織から 6個以上の不定芽が分化した。しかし、形成された不定芽は、その葉原基を伸長させたり、りん片様に肥大させたりせず、小球根にまで生育しなかった(第10表、第14図)。第15図には、BA  $1.0\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$ を添加した培地に置床した莖頂組織の培養10日目(A)と培養33日目(B)の組織縦断切片を示した。NAA 添加培地の場合と異なり、培養10日目には、莖頂組織の表面全体に分裂・肥大がみられ、培養33日目の切片では、葉原基を形成しつつある生長点様の分裂部位が、組織の表面全体から複数個分化している様子が認められた。さらに、BAとNAA を組合せて添加した培地で培養を試みたところ、莖頂組織の分裂と肥大が NAA によってさらに促進され、その結果、不定芽の分化数が増加する傾向があった(第11表)。

サイトカイニン類の添加によって得られた多数の不定芽は、そのまま長期間培養を続けても肥大した小球根にまで生育せず、そのまま枯死した。そこで、これらの不定芽の球根への生育・肥大を促すことを目的に、不定芽を分化した組織を新しい培地へ移植した。多数の小さな不定芽あるいは不定芽様突起物の集合体（以下「不定芽塊」）を分化している茎頂組織を4個の切片に切断・分離し、生長調節物質無添加培地あるいはNAA  $0.1\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$ 添加培地に移植した。それぞれの移植した「不定芽塊」切片は根を分化し、また、切片上の不定芽の葉原基は濃い緑色となり、りん片様に肥大し、球根化した。一方、BAを含有する培地に「不定芽塊」切片を移植した場合、切片上の不定芽の肥大は認められず、むしろ、新たな不定芽を分化し、その数が増加した。NAA とBAを組合せた培地に移植した「不定芽塊」はBA単独添加培地に移植したものより肥大し、それぞれの不定芽の肥大・球根化も促進される傾向が認められた（第12表、第16図）。

テッポウユリやカノユリの茎頂組織からの葉条・根や「不定芽塊」の形成・生育に対し、それぞれ促進的な効果を示したNAA  $0.1\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$  添加培地とBA  $0.1\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$ 添加培地を用い、ヤマユリ、トサヒメユリとスカシユリ系品種である‘エンチャントメント’、‘金扇’および‘烏羽玉’の茎頂組織を70日間培養した。

培養終了後に得られた子球あるいは不定芽の分化数とその生育程度および発根率を第13表に示した。ヤマユリでは、生長調節物質を添加しない培地でも根の分化・発達が良好であり、茎頂組織の葉原基は肥大し、りん片化した。NAA の添加は、無添加の場合と比較して、葉原基の肥大・りん片化に対して明確な促進効果を示さなかったが、葉の伸長を促進する傾向を示した。BAの添加は、カノユリの場合と同様、茎頂組織の肥大と不定芽の分化を促進し、1茎頂組織当たり8.6個以上の不定芽が得られた（第17図（A））。トサヒメユリでは、NAA の添加によって、りん片の形成と肥大、葉の伸長および根の分化と伸長が促進された。BAを添加すると、複数個の不定芽が分化する場合もみられたが、置床した茎頂組織の生育に不揃いが多く、カノユリなどの場合のような、BA添加による明確な「不定芽塊」形成促進効果は見出せなかった（第17図（B））。‘エンチャントメント’の場合、NAA の添加による葉条および根の生育促進効果は培養70日目でも認められたが、さらに培養を続けることにより、葉が伸長し、また、りん片の肥大した球根が得られた（第17図（C））。一方、BA添加による不定芽分化の促進効果はみられなかった。‘金扇’の場合、生長調節物質を添加しない培地では、葉条の生育や発根はほとんどみられなかった。しかし、NAAの添加によって茎頂組織の生育は促進され、培養の経過とともに多数の肥大した根とりん片を有する小球根が得られた。また、カルスを形成するものもみられた（第17図（D））。一方、BAを添加しても不定芽分化の促進は認められなかった。‘烏羽玉’でもNAA の添加によって葉条の生育が促進され、長期間培養を行なうと、先に述べた‘清津紅’の場合と同様、小さな球根が6～8個形成されたが、いずれの球根もりん片

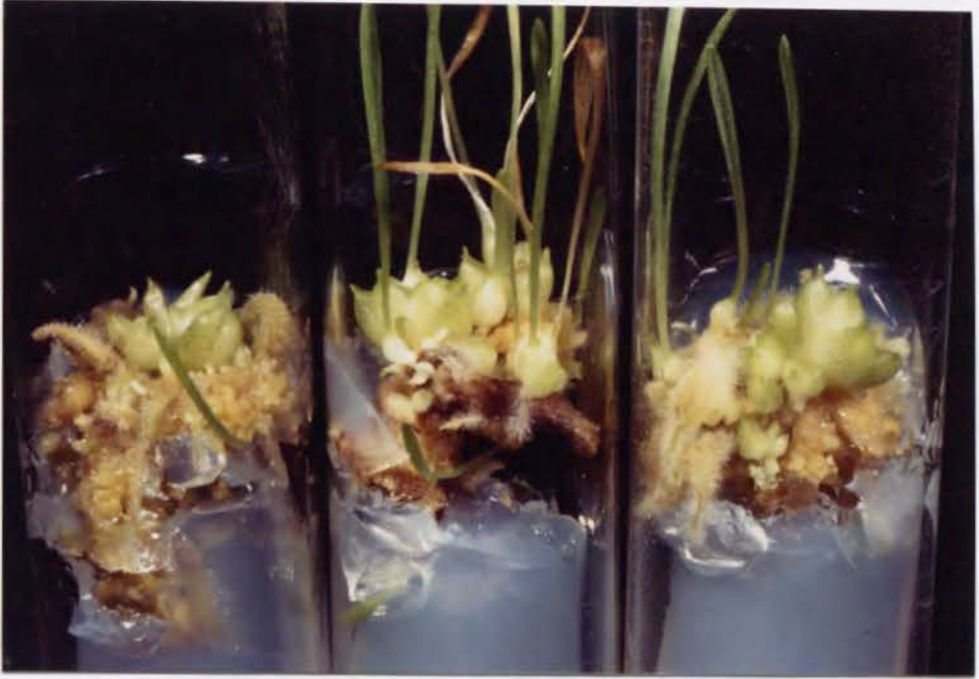


Fig.10. Multiple bulblet formation in callus like meristematic tissue originating from *L.brownii* shoot tips on the medium containing  $0.1 \text{ mg}\cdot\text{liter}^{-1}$ NAA. ( Culture period : 140 days)

For culture medium: See Table 7.

For culturing conditions and materials: See Table 4.



Fig.11. Flowering of *L.brownii* plants propagated by shoot-tip culture.

*L.brownii* bulblets with diameter of 2~8mm propagated by shoot-tip culture were cultivated in soil. After 2 years of cultivation, these plants flowered normally.

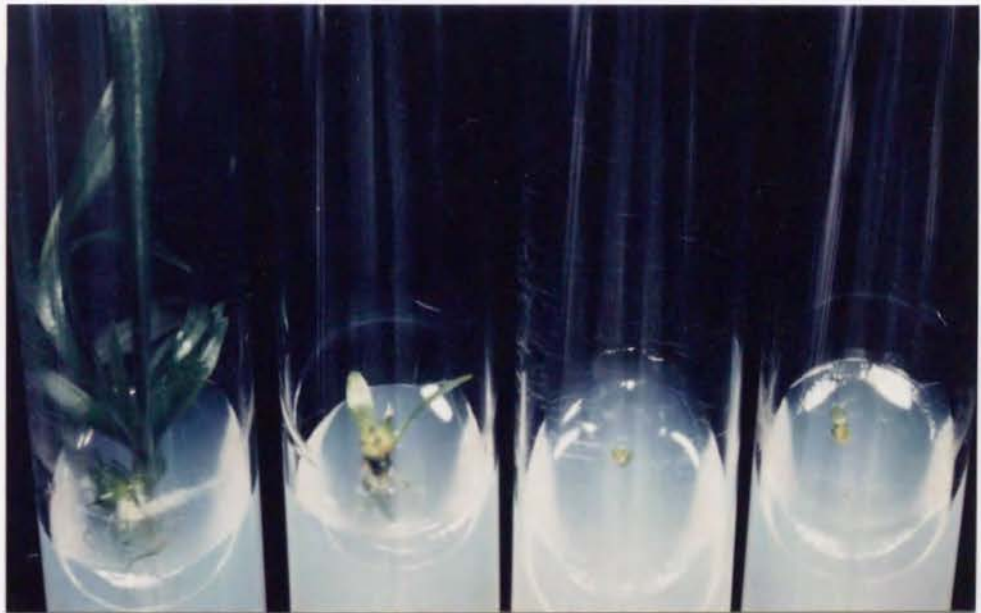


NAA 0 0.01 0.1 1.0  
( $\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$ .)

Fig.12. Influence of NAA concentration in the medium on growth of shoot tips of 'Kiyozubeni' cultured in vitro. ( Culture period : 120 days )

For culture medium: See Table 7.

For culturing conditions and materials: See Table 4.



0.01  $\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$  NAA  
+  
BA ( $\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$ ) 0 0.01 0.1 1.0

Fig.13. Influence of NAA and BA in the medium on growth of shoot tips of L. longiflorum 'Georgia' cultured in vitro. ( Culture period : 70 days )

Culture medium : MS's macro-elements and Fe, RN's micro-elements and organics,  $40\text{g}\cdot\text{liter}^{-1}$  sucrose,  $8\text{g}\cdot\text{liter}^{-1}$  agar, combination of  $0\sim 1.0\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$  BA with  $0.01\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$  NAA, pH5.7 .

For culturing conditions and materials: See Table 4.

Table 10. Influence of cytokinins in the medium on growth of shoot tips of *L. speciosum* 'Uchida' cultured *in vitro*.  
(Culture period : 70 days)

Cytokinins	Concn (mg·liter <sup>-1</sup> )	No. of bulblets [adventitious buds] <sup>z</sup> per explant	Bulblet [adventitious bud] <sup>z</sup> growth <sup>y</sup>	% of explants with roots	Root growth <sup>x</sup>	% of explants with callus
BA	0.01	1.0	++++	100.0	++	60.0
	0.1	[7.0]	[++]	0.0	-	0.0
	1.0	[>8.0]	[+]	0.0	-	0.0
Kinetin	0.01	1.0	++++	62.5	++	12.5
	0.1	1.4	+++	90.0	++	50.0
	1.0	[6.0]	[++]	0.0	-	10.0

Culture medium: MS's macro-elements and Fe, RN's micro-elements and organics,  
40g·liter<sup>-1</sup>sucrose, 8g·liter<sup>-1</sup>agar, 0.01~1.0mg·liter<sup>-1</sup>BA or kinetin, pH5.7 .

For culturing conditions and materials: See Table 4.

<sup>z</sup> Numbers and plus signs in brackets indicate the number and growth of adventitious buds, respectively.

<sup>y</sup> Bulblet[bud]growth: += bulblet[bud] with diameter of ~2mm, ++= bulblet[bud] with diameter of 2~4mm, +++= bulblet[bud] with diameter of 4~6mm, ++++= bulblet[bud] with diameter of 6mm~.

<sup>x</sup> Root growth: -= no root formation, += few root formation, ++= several root formation, +++= many root formation, ++++= many elongated root formation.

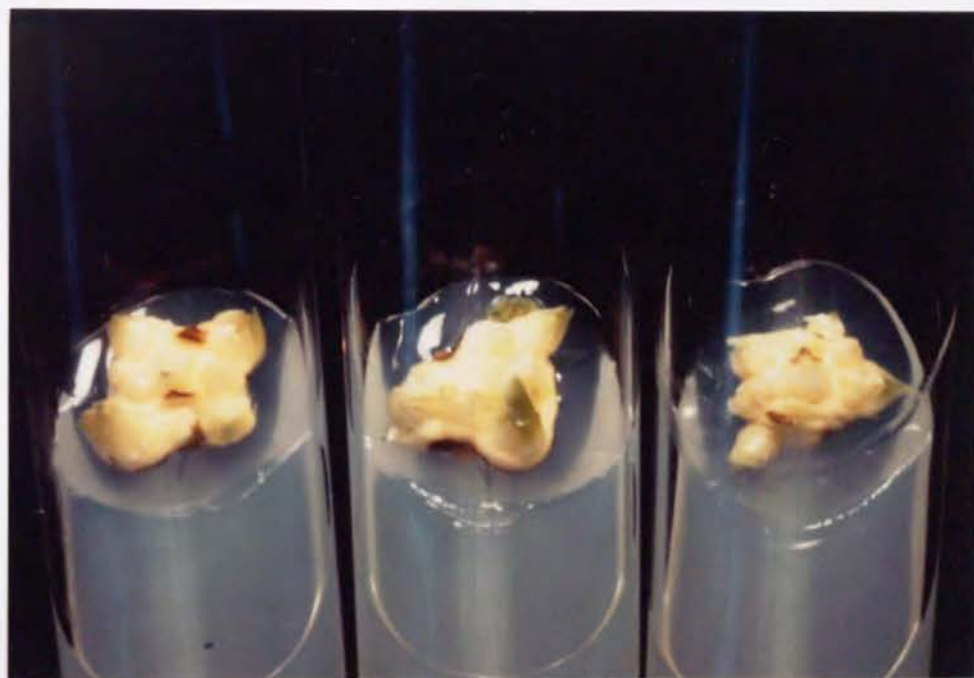
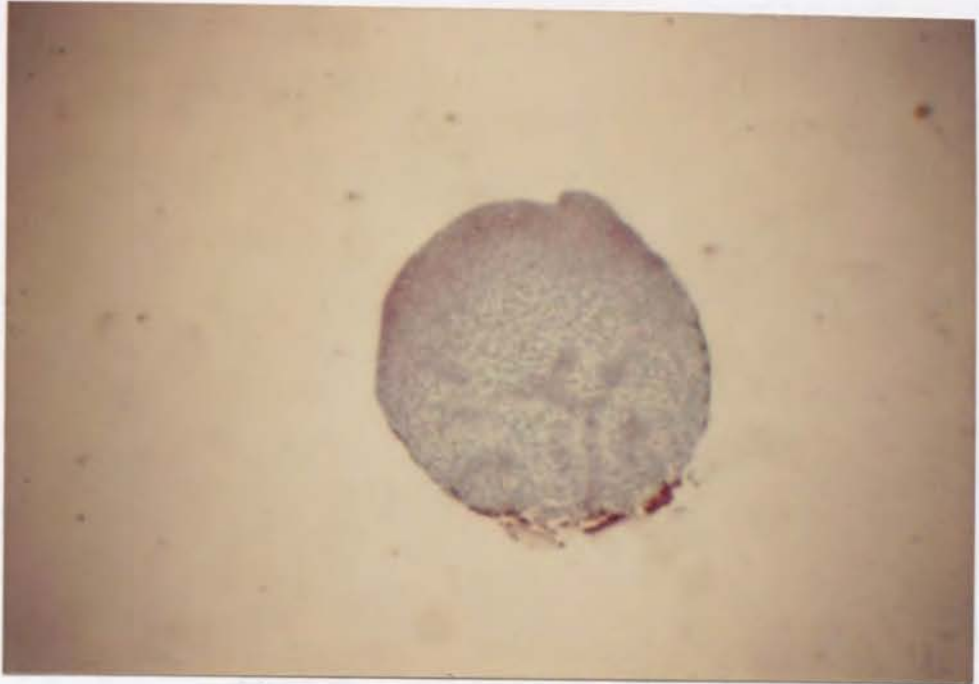


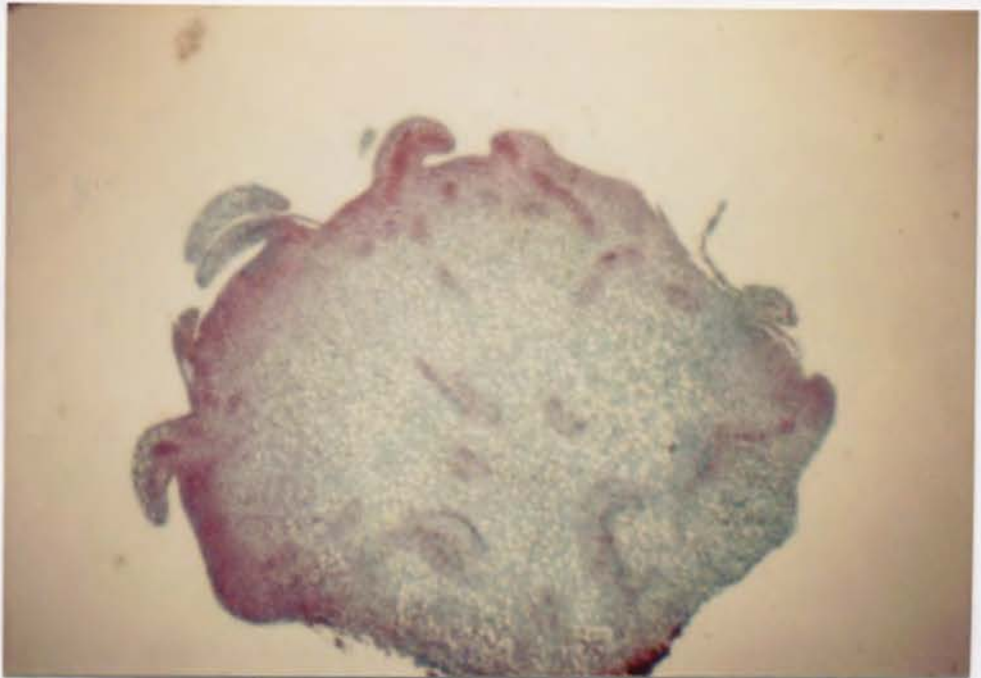
Fig.14. 'Multiple adventitious bud' formation from shoot tips of *L. speciosum* 'Uchida' on the medium containing 0.1 mg·liter<sup>-1</sup>BA. (Culture period : 70 days )

For culture medium: See Table 10.

For culturing conditions and materials: See Table 4.



(A) A shoot tip after culturing for 10 days.



(B) A shoot tip after culturing for 25 days.

Fig.15. Longitudinal section of shoot tips of *L. speciosum* 'Uchida' cultured on the medium containing  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{liter}^{-1}$  BA.



Table 11. Influence of NAA and BA in the medium on growth of shoot tips of *L. speciosum* 'Uchida' cultured in vitro. (Culture period : 70 days)

Growth regulators (mg·liter <sup>-1</sup> )		No. of adventitious buds per explant	Adventitious bud growth <sup>z</sup>	% of explants with roots	Root growth <sup>y</sup>
NAA	BA				
-	0.1	6.6	++	10.0	+
0.1	0.1	8.9	++	30.0	+
-	1.0	>7.6	+	0.0	-
1.0	1.0	>9.3	++	0.0	-

Culture medium : MS's macro-elements and Fe, RN's micro-elements and organics, 40g·liter<sup>-1</sup>sucrose, 8g·liter<sup>-1</sup>agar, combination of 0 ~ 1.0mg·liter<sup>-1</sup>NAA with 0.1 ~ 1.0mg·liter<sup>-1</sup>BA, pH5.7.

For culturing conditions and materials: See Table 4.

<sup>z, y</sup> For adventitious bud growth and root growth: See Table 10.

Table 12. Influence of NAA and BA in the medium on growth of 'multiple adventitious bud' derived from shoot-tip culture of *L. speciosum* 'Uchida'. (Culture period : 70 days)

Growth regulators (mg·liter <sup>-1</sup> )		No. of bulblets [adventitious buds] <sup>z</sup> per segment	Bulblet [adventitious bud] <sup>z</sup> growth <sup>y</sup>	% of segments with roots	Root growth <sup>x</sup>
NAA	BA				
-	-	1.3	++++	100.0	++
0.1	-	1.5	++++	100.0	++++
0.1	0.1	[9.6]	[++]	20.0	+
-	1.0	[> 10.6]	[+]	0.0	-

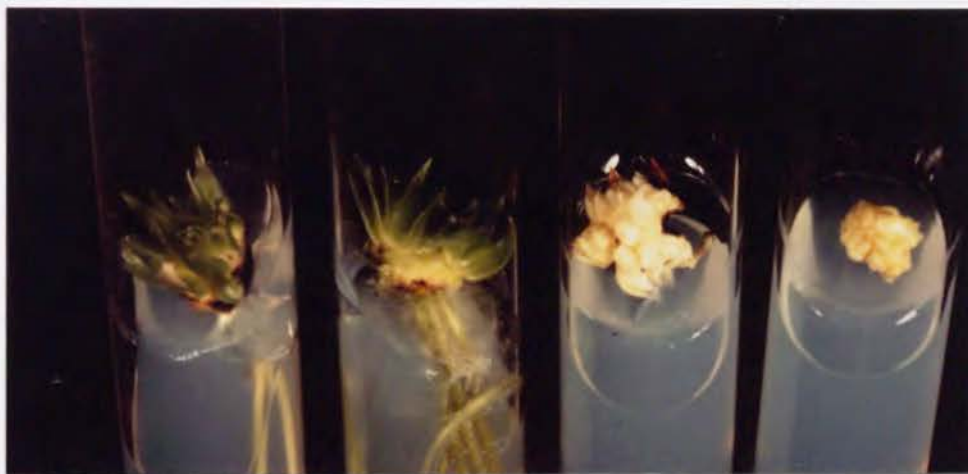
Culture medium : MS's macro-elements and Fe, RN's micro-elements and organics, 40g·liter<sup>-1</sup>sucrose, 8g·liter<sup>-1</sup>agar, combination of 0 ~ 0.1mg·liter<sup>-1</sup>NAA with 0 ~ 1.0mg·liter<sup>-1</sup>BA, pH5.7 .

Culture materials: A 'multiple adventitious bud' formed by shoot-tip culture was cut into four pieces and each piece was transferred to the four different media as described above.

For culturing conditions: See Table 4.

<sup>z</sup> Numbers and plus signs in brackets indicate the number and growth of adventitious buds, respectively.

<sup>y, x</sup> Bulblet[bud] growth and root growth: See Table 10.



NAA ( mg·liter<sup>-1</sup>) 0                      0.1                      0.1                      0  
 BA ( mg·liter<sup>-1</sup>) 0                      0.01                      0.1                      1.0  
 Fig.16. Growth of 'multiple adventitious bud' derived from a shoot tip of *L. speciosum* 'Uchida' cultured in vitro after transfer to new medium. (Culture period : 40 days )

'multiple adventitious bud' formed by shoot-tip culture were cut into four pieces and each piece was transferred to the four different media as indicated above.

For culture medium and materials: See Table 12.

For culturing conditions: See Table 4.

Table 13. Influence of NAA and BA in the medium on growth of shoot tips of several lilies.  
(Culture period : 70 days)

Species and variety	Growth regulators (mg·liter <sup>-1</sup> )	No. of bulblets [adventitious buds] <sup>z</sup> per explant	Bulblet [adventitious bud] <sup>z</sup> growth <sup>y</sup>	% of explants with roots	Root growth <sup>x</sup>
<i>L. auratum</i>	-	1.0	+++	87.5	+++
	NAA 0.1	1.3	+++	87.5	++++
	BA 0.1	[>8.6]	[+]	50.0	+
<i>L. concolor</i>	-	1.0	+	80.0	+
	NAA 0.1	1.5	++++	100.0	++++
	BA 0.1	3.0	+	50.0	+
<i>L. ×elegans</i> 'Enchantment'	-	1.0	+	100.0	+
	NAA 0.1	1.0	++	100.0	+++
	BA 0.1	0.1	±	0.0	-
<i>L. ×elegans</i> 'Kinsen'	-	1.0	±	0.0	-
	NAA 0.1	1.0	++	100.0	+++
	BA 0.1	1.1	±	0.0	-
<i>L. ×elegans</i> 'Ubatama'	-	1.0	+	30.0	++
	NAA 0.1	3.4	++	100.0	++
	BA 0.1	3.5	+	0.0	-

Culture medium : MS's macro-elements and Fe, RN's micro-elements and organics, 40g·liter<sup>-1</sup>sucrose, 8g·liter<sup>-1</sup>agar, no growth chemicals or 0.1 mg·liter<sup>-1</sup>NAA or BA, pH5.7 .

For culturing conditions and materials: See Table 4.

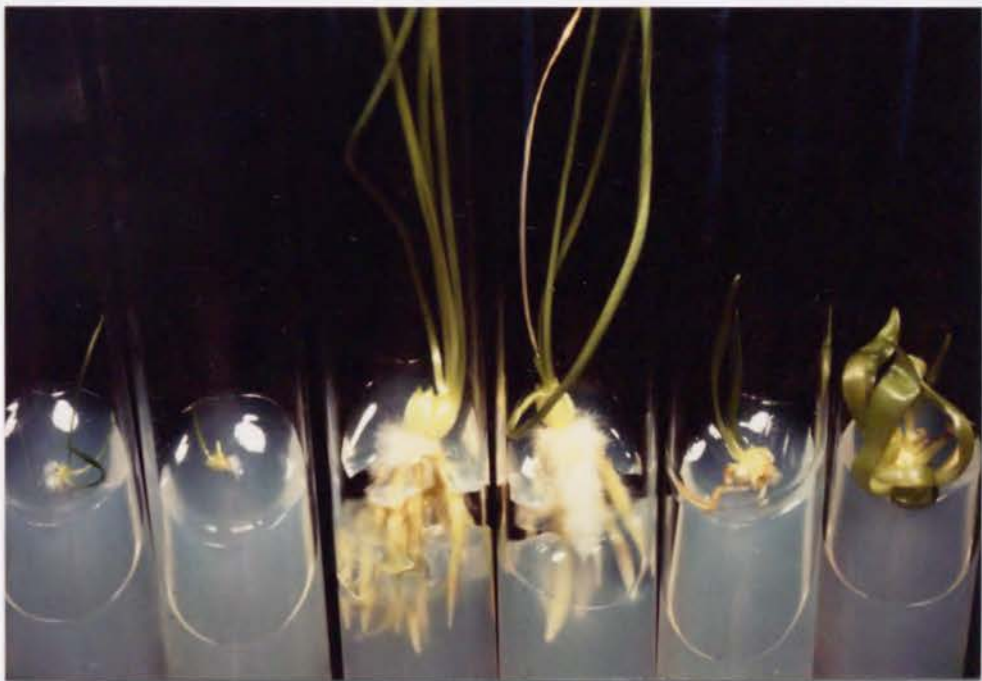
<sup>z</sup> Numbers and plus signs in brackets indicate the number and growth of adventitious buds, respectively.

<sup>y</sup> Bulblet[bud]growth : ± = bulblet[bud] with diameter of ~1mm, + = bulblet[bud] with diameter of 1 ~2mm, ++ = bulblet[bud] with diameter of 2~4mm, +++ = bulblet[bud] with diameter of 4~6mm, ++++ = bulblet[bud] with diameter of 6mm~.

<sup>x</sup> Root growth: See Table 10.



(A) Control +NAA (0.1mg·liter<sup>-1</sup>) +BA (0.1mg·liter<sup>-1</sup>)



(B) Control +NAA (0.1mg·liter<sup>-1</sup>) +BA (0.1mg·liter<sup>-1</sup>)

Fig.17. Influence of NAA and BA in the medium on growth of shoot tips of several lilies cultured *in vitro*.

- (A) *L. auratum* after culturing for 70 days.  
 (B) *L. concolor* after culturing for 70 days.  
 (C) *L. ×elegans* 'Enchantment' after culturing for 150 days.  
 (D) *L. ×elegans* 'Kinsen' after culturing for 150 days.  
 (E) *L. ×elegans* 'Ubatama' after culturing for 150 days.  
 For culture medium: See Table 13.  
 For culturing conditions and materials: See Table 4.



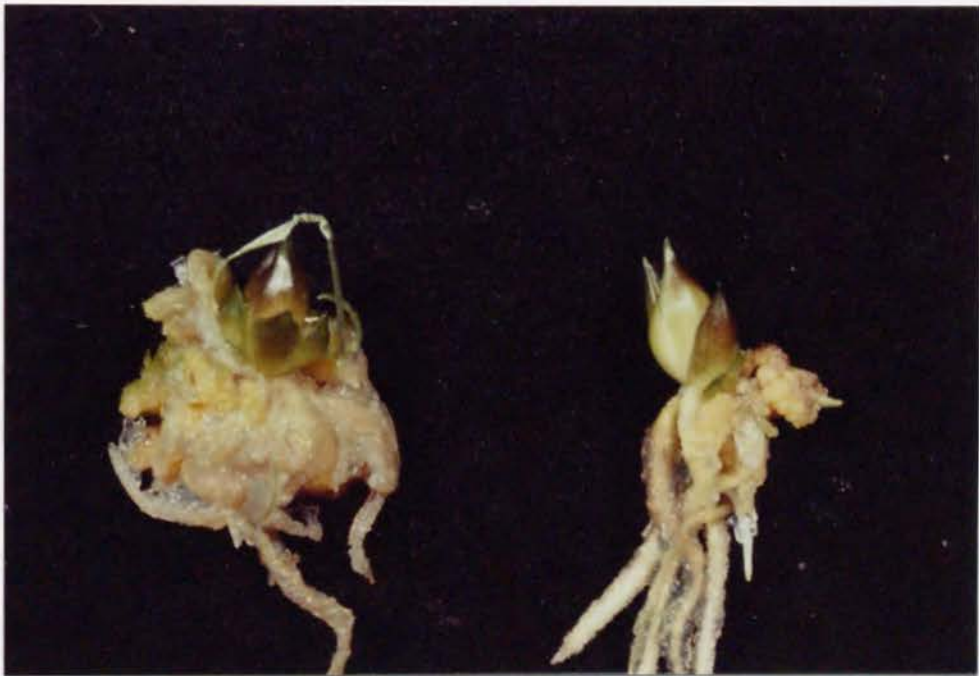
(C) Control

+NAA  
(0.1mg·liter<sup>-1</sup>)



(E) Control

+NAA  
(0.1mg·liter<sup>-1</sup>) +BA  
(0.1mg·liter<sup>-1</sup>)



(D) +NAA (0.1mg·liter<sup>-1</sup>)

の肥大が不十分であった。BAを添加すると、カノコユリやヤマユリの場合と同様、複数個の不定芽を分化したが、茎頂組織があまり肥大しないため、不定芽の分化数は少なかった(第17図(E))。

#### 第5項 培養中の温度、照度および照明時間

##### 材料および方法

実験には、テッポウユリ‘ジョージア’を供試し、球根の滅菌と茎頂組織の分離・置床方向、培養容器、培地量および培地の滅菌方法は第1項に準じた。

培地には、主要塩類組成と鉄源としてMSの処方、微量要素および有機物質としてRNの処方を加え、生長調節物質としてNAAを $0.1\text{ mg}\cdot\text{liter}^{-1}$ 、ショ糖を $40\text{ g}\cdot\text{liter}^{-1}$ 、寒天を $8\text{ g}\cdot\text{liter}^{-1}$ の濃度になるように添加し、pHを5.7に調整したものをを用いた。

培養条件は、昼光色蛍光灯による照明装置を備えつけた恒温器内で、温度 $23\sim 24^{\circ}\text{C}$ 、照度 $1,500\text{ lx}$ 連続照明を基本とした。培養中の温度の影響をみた実験では、培養容器を静置する恒温器内の温度を $17\sim 18^{\circ}\text{C}$ 、 $23\sim 24^{\circ}\text{C}$ 、 $27\sim 28^{\circ}\text{C}$ および $31\sim 32^{\circ}\text{C}$ に設定した。培養中の照度の影響をみた実験は、京都大学農学部ファイトロン内の水銀ランプによる照明装置を備えつけた $20^{\circ}\text{C}$ ・連続照明の培養室で行ない、寒冷沙を用いて遮光し、培養試験管の培地表面の高さと同じ位置で、 $400$ 、 $1,500$ 、 $4,000$ 、 $7,000$ および $13,000\text{ lx}$ となるように照度を調整した。培養中の照明時間の影響をみた実験では、培養容器を静置する恒温器内の1日の照明時間の設定を、 $0$ 、 $8$ 、 $16$ および $24$ 時間とした。

##### 結果

培養温度を $17\sim 18^{\circ}\text{C}$ 、 $23\sim 24^{\circ}\text{C}$ 、 $27\sim 28^{\circ}\text{C}$ および $31\sim 32^{\circ}\text{C}$ として70日間培養した茎頂組織の生育を第14表に示した。 $17\sim 18^{\circ}\text{C}$ で培養すると、形成される葉条や根の生育が緩慢であり、伸長した葉の基部の肥大やりん片化もほとんどみられなかった。 $23\sim 24^{\circ}\text{C}$ あるいは $27\sim 28^{\circ}\text{C}$ の温度で培養して得られる葉条および根の生育は良好であった。特に、 $23\sim 24^{\circ}\text{C}$ では、葉条から伸長する葉の数が増加し、その結果として葉条生体重も増加した。 $27\sim 28^{\circ}\text{C}$ では、伸長葉数が少なくなるため、葉条生体重が減少した。しかし、形成されたりん片は $23\sim 24^{\circ}\text{C}$ の培養温度で得られたものより肥大し、幅 $5\text{ mm}$ 以上の大きなりん片も多数形成された。 $31\sim 32^{\circ}\text{C}$ の培養温度では、培養途中で枯死する茎頂組織が多く、形成された葉条や根の生育も抑制されて、肥厚したりん片の数も減少した。

照度を $400$ 、 $1,500$ 、 $4,000$ 、 $7,000$ および $13,000\text{ lx}$ として培養した茎頂組織の培養70日目の生育を第15表に示した。 $1,500\text{ lx}$ あるいは $4,000\text{ lx}$ の照度で培養したとき、形成された葉条の生育は良好であり、伸長する葉や肥大したりん片が最も多く得られた。 $7,000\text{ lx}$ で培養した場合、 $1,500\text{ lx}$ や $4,000\text{ lx}$ で培養したものと比較して、根の生体重は増加したが葉条生体重はむしろ減少し、りん片の形成や肥大も促進され

なかった。400 lxでは、伸長した葉の基部がほとんど肥大せず、りん片化しているものが少なかった。また、根の分化も少なく、その伸長も劣った。13,000 lxの高照度になると、培養初期における茎頂組織の生育が抑制され、生育を始めたものでも形成された葉条の葉が厚く、その伸長や基部の肥大・りん片化も抑制された。

1日の照明時間を、0、8、16および24時間として培養した茎頂組織の培養70日目の生育を第16表に示した。0時間照明（暗黒）で茎頂組織を培養した場合、形成された葉条は、ほとんど葉を伸長せず、葉条の生体重は小さくなった。しかし、葉条は肥大し、りん片が形成され、16あるいは24時間照明と同等の大きさの球根が得られた。照明時間が長くなるにつれて、根の生体重は増加したが、葉条生体重の増加に関しては一定の傾向がみられなかった。8時間照明の場合、細い葉が多数形成されたが、その基部が肥大してりん片様になるものは少なかった。一方、16あるいは24時間照明によって得られた葉条では、伸長した葉も大きく、形成されたりん片の肥大も良好であった。

#### 第6項 培地に対する茎頂組織の置床方向

前項までの実験では、切り取った茎頂組織の生長円錐体側を上方向にして、基部切り口を培地の表面に置床し培養を行ってきた。本項の実験では、基部切り口を上方向にして、生長円錐体側を培地の表面に置床したときの茎頂組織の生育について調べた。

#### 材料および方法

実験には、テッポウユリ‘ジョージア’を供試し、球根の滅菌と茎頂組織の分離、培養容器、培地量、培養中の温度・照明などの培養条件は第1項に準じ、培地は第5項と同様とした。

#### 結果

従来通り基部の切り口側を培地面に置床して培養した場合、前項までの実験結果と同様、3～4枚の肥厚したりん片を有し、4～5枚の葉を伸長している小球根が得られた。また、旺盛な生長を示している根の基部の肥大した部位にはカルスが形成される場合もみられたが、その形成率は30～50%であった。一方、生長円錐体側を培地に置床した場合、培養した全ての茎頂組織はカルスを形成した。また、そのカルスの生長は良好であり、置床した茎頂組織の周囲全体に増殖し、茎頂組織からの葉条の形成およびその生育はむしろ抑制された（第18図）。

Table 14. Influence of temperature on growth of shoot tips of *L. longiflorum* 'Georgia' cultured in vitro.  
(Culture period : 70 days)

Temperature (°C)	FW of shoots per explant (mg)	No. of scales per explant				Total	FW of roots per explant (mg)
		$\sim \geq 30\text{mg}$ (Fw)	$30 > \sim \geq 20\text{mg}$ (FW)	$20 > \sim \geq 10\text{mg}$ (FW)	$10 > \sim \geq 5\text{mg}$ (FW)		
17 ~18	176.3	0.0	0.0	0.4	1.9	2.3	313.8
23 ~24	708.9	0.0	4.0	1.9	0.3	6.2	1092.2
27 ~28	681.4	3.0	1.0	4.0	0.3	8.3	897.1
31 ~32	135.0	0.0	0.0	3.0	1.4	4.4	130.0

Culture medium : MS's macro-elements and Fe, RN's micro-elements and organics,  
40g·liter<sup>-1</sup>sucrose, 8g·liter<sup>-1</sup>agar, 0.1 mg·liter<sup>-1</sup>NAA, pH5.7 .  
Culturing conditions : The same conditions as in Table 4 except for temperature.  
For culture materials: See Table 4.

Table 15. Influence of light intensity on growth of shoot tips of *L. longiflorum* 'Georgia'  
cultured in vitro.  
(Culture period : 70 days)

Light intensity (lx)	FW of shoots per explant (mg)	No. of scales per explant				Total	FW of roots per explant (mg)
		$\sim \geq 20\text{mg}$ (Fw)	$20 > \sim \geq 10\text{mg}$ (FW)	$10 > \sim \geq 5\text{mg}$ (FW)			
400	120.0	0.0	0.0	2.9	2.9	221.7	
1,500	384.4	3.0	3.2	1.0	7.2	1048.9	
4,000	497.0	2.9	3.0	2.1	8.0	1045.0	
7,000	268.3	2.0	3.0	0.3	5.3	1383.3	
13,000	173.0	0.7	1.0	1.0	2.7	628.0	

For culture medium : See Table 14.  
Culturing conditions and materials: The same as in Table 1 except for light intensity.

Table 16. Influence of daily light period on growth of shoot tips of *L. longiflorum*  
'Georgia' cultured in vitro.  
(Culture period : 70 days)

Light per day (hours)	FW of shoots per explant (mg)	No. of scales per explant				Total	FW of roots per explant (mg)
		$\sim \geq 20\text{mg}$ (Fw)	$20 > \sim \geq 10\text{mg}$ (FW)	$10 > \sim \geq 5\text{mg}$ (FW)			
0	181.7	1.3	3.8	1.5	6.6	155.0	
8	456.0	0.4	2.0	1.3	3.7	598.0	
16	556.3	1.6	3.0	1.9	6.5	768.8	
24	473.3	1.6	2.5	2.2	6.3	950.0	

For culture medium : See Table 14.  
Culturing conditions and materials: The same as in Table 4 except for daily light period.



Fig.18. Influence of explant orientation on growth of shoot-tips of L. longiflorum 'Georgia' cultured in vitro. ( Culture period : 70 days )

Upper: Normal placement of shoot tips(apex up) on the medium.

Lower: Inverted placement of shoot tips(apex down) on the medium  
For culture medium: See Table 14.

Culturing conditions and materials: The same as in Table 4 except for the orientation of shoot-tip explants on the medium.



## 第2節 ウイルスの検定

一般に、植物体のウイルス保毒の有無を検定する方法としては、判別植物を用いる生物学的手法による検定法、被検定植物から作成した試料を電子顕微鏡によって観察する検定法、ウイルスの抗血清を作成し、その抗原抗体反応を利用するELISA 検定法などが知られている。ユリ類では、先に述べたように9種類の病原ウイルスが確認されているが、特に広く問題となっているのは、葉に緑色濃淡モザイク病を引き起こす *lily mottle virus* と *tulip breaking virus*、複合感染して黄色条斑モザイク病を引き起こす *lily symptomless virus*あるいは *lily ringspot virus*と *cucumber mosaic virus*である。これらの病原ウイルスの伝染経路、寄宿範囲や物理的・化学的性質を明らかにして、それぞれを分類・同定していく研究の過程で、各ウイルスに対する判別植物の種類や適切な生物学的検定法が明らかにされている(23, 24, 25, 26, 63, 82, 146)。また、電子顕微鏡による植物試料の観察が可能になるとともに、ユリにみられる病原ウイルスの形状も明らかとなり、上記の *lily mottle virus*、*tulip breaking virus*と *lily symptomless virus* は紐状ウイルスであり、*lily ringspot virus* と *cucumber mosaic virus*は球状ウイルスであることが確認されている(3, 4, 94)。この電子顕微鏡観察による検定法には、組織切片の試料を作成して、ウイルス粒子の存在とその大きさ、形状や封入体の形状などを調べる方法と、組織汁液を直接観察してウイルス粒子の存在を確認する方法(leaf dip法)とがある。leaf dip法は、桿状や紐状ウイルスの観察には適しているが、球状ウイルスでは、植物細胞内の球状成分とウイルス粒子との区別が難しいため不适当である。抗原抗体反応を利用した検定法では、ウイルスの存在の有無が明確になると同時に、その種類の判別も可能となるが、検定に使用する抗血清を作成するためには、病葉から目的とするウイルスを精製する必要がある。したがって、ウイルス収量の多い判別植物を選定するとともに、効率のよいウイルス精製方法を確立しなければならない。最近では、*lily symptomless virus*の抗血清が市販され、検定に必要な機器・器具類も改良された結果、ELISA 法による *lily symptomless virus* の検定は比較的簡便に行なえるようになっている。また、新美ら(134)は、抗血清を利用した検定法として、DIBA法によるユリ・ウイルスの検出について報告している。

本節では、上記の検定法のうち、タカサゴユリを判別植物とした汁液接種による生物検定法とleaf dip浸漬法を用いた電子顕微鏡観察による検定法を組合せて実施し、前節の茎頂組織の培養に由来する若い植物体の紐状ウイルスの保毒状態を調査し、球根増殖の初期段階でのウイルス検定の可能性について検討した。

### 材料および方法

京都大学農学部実験圃場で二作した市販のテッポウユリ‘ジョージア’の球根を親球根として、本節の

実験に供試する植物体を得た。圃場二作球根から切り出した茎頂組織を培養することによって得た幼植物体（組織培養系統）と、この茎頂培養に使用したそれぞれの球根のりん片を用い、ビニル被覆した寒冷紗ハウス内でのりん片繁殖によって増殖した植物体（りん片挿し系統）とを一对の組合せ系統とした。各系統の個体を直径15cmの素焼き鉢に植え、ガラス温室内の寒冷紗を被覆したベンチ上で隔離栽培して、ウイルスの検定に供試する植物体を育成した。

ウイルスの検定は、カーボランダムを用いた葉汁液接種による生物検定と、1%リタングステン酸を用いたleaf dip浸漬法による電子顕微鏡でのウイルス粒子の観察とにより行なった。それぞれの増殖法によって得た球根の組合せ系統を、生物検定では三組、電子顕微鏡観察では二組、供試した。

汁液接種を行なう判別植物として、タカサゴユリ (*L. formosanum* Wallace) の葉数6~7枚の実生苗を使用した。直径15cmの素焼き鉢に1個体ずつの実生を植え、温室内の寒冷紗隔離ベンチで栽培した。葉汁液接種法は、茎を20cm程度に伸長した被検定植物から、上部の展開して間もない若い葉を切り取り、生葉重の10倍量の0.1Mのりん酸緩衝液（0.05Mのチオグリコール酸ナトリウムを含有、pH 7.0）中で磨砕し、得られた葉汁液を、判別植物の伸長しつつあるりん葉に600メッシュのカーボランダムとともに接種することによって行なった。接種後、判別植物は温室内の寒冷紗で隔離したベンチ上で栽培し、1か月目と4か月目に病徴発現の有無を調査した。

leaf dip浸漬法を用いた電子顕微鏡によるウイルス粒子の観察は、以下の手順で行なった。上記の葉汁液接種法による検定の場合と同様にして、被検定植物からサンプリングした若い葉の中央部の0.5cm角の葉片を2~3滴の蒸留水中で切り刻み、葉汁液を得た。この葉汁液の1滴をDN-300メッシュに載せ、さらに、リタングステン酸1滴を加えた。5分後、余分な液をろ紙で吸い取り自然乾燥させて作成した試料を、5万倍の倍率で電子顕微鏡により観察した。

## 結果

電子顕微鏡での観察とタカサゴユリ実生苗への接種の結果を、第17表にまとめて示した。二組の組合せのユリ葉汁液を電子顕微鏡で観察した場合、各組のりん片挿し系統の子球の若い普通葉を供試したものは、観察したメッシュ枠数のそれぞれ100%および84.2%で、紐状のウイルス粒子の存在が認められた。一方、それぞれの組の組織培養系統の子球から得られた若い普通葉の葉汁液を観察したものでは、観察したいずれのメッシュ枠でもウイルス粒子は確認できなかった。

タカサゴユリ実生苗を判別植物として使用した生物検定においても、りん片挿し系統の子球を栽培して抽台してきた茎の若い普通葉の汁液を接種した場合、接種1か月後には、新たに伸長したタカサゴユリ実生の葉に明確な緑色濃淡モザイクを示すものが認められた（第19図）。接種135日目の最終判定では、供試したいずれの組合せのりん片挿し系統でもウイルスに感染していることが確かめられた。組織培養系統

Table 17. Diagnosis of virus in *L. longiflorum* 'Georgia'.

Diagnostic method	Observation with an electron microscope		Sap inoculation to <i>L. formosanum</i> seedlings		
	No. of mesh-grids discerned rod-shape virus particles over no. of observed mesh-grids		No. of virus-infected seedlings over no. of inoculated seedlings		
	Diagnosed line no.				
	1	2	1	2	3
Clone derived from scale propagation of field grown bulbs	16/16	16/19	3/3	3/3	3/3
Clone derived from shoot-tip culture of field grown bulbs	0/12	0/16	0/3	0/3	0/3



Fig. 19. Symptoms of mottling induced in *L. formosanum* seedling by inoculation of leaf sap of a plant derived from scale propagation of field grown bulbs.

Photograph taken 33 days after sap inoculation.

に由来する植物体の葉汁液を接種したタカサゴユリ実生苗では、モザイク状の病徴にやや近い疑いのある葉が1個体でみられたが、これは生育途中での何らかの生理的な症状と推測された。その他の個体は、全て正常な葉を展開・伸長した。

### 第3節 考察

ユリ・ウイルスフリー球根を増殖するためには、茎頂組織の培養により得た幼植物体を土壤に移植し、成球にまで養成した後、さらに、その球根のりん片挿しなどによって繁殖する方法が一般に行なわれてきた。しかし、この方法では、りん片挿しによる種球根の増殖や球根養成などの栽培期間中に、ウイルスの再汚染や病害虫発生のため、ウイルスフリー球根を失ってしまう危険性がある。そこで、茎頂組織の培養によって得られる無菌幼植物体のりん片などを増殖材料として、*in vitro* の無ウイルス・無病害虫環境のもとで、直接、種球根となる小球根の増殖を行なうことができれば、前述のようなウイルスや病害虫汚染の危険性のかなりの部分を避けられることになり、都合が良い。このためには、茎頂組織の培養によって得られる幼植物体が、次代の増殖材料となり得るだけの十分に肥大したりん片を多数有していることが望ましい。

本実験で比較した培地の主要塩類組成の中で、MSの処方が、1/2 KnopやWhite 培養液の処方より、テッポウユリの茎頂組織から形成される葉条や根の生育に適していた。その結果、MS主要塩類組成の培地では、肥大したりん片が得られることも分かった。1/2 KnopやWhite の主要塩類組成の培地の場合、根の分化・生長が不良であり、カルスも全く形成されなかった。なお、1/2 KnopやWhite の主要塩類組成の培地にNAA を添加しても、培養初期から発根を促すことは困難であることも確かめている。森(112)らも、White, Kassanis, Nielsen などの培地でテッポウユリの茎頂組織を培養した結果、発根する茎頂組織が少なく、発根しなかったものはやがて枯死し、また、これらの培地へのIAA、NAA、ジベレリン、カイネチンの添加も効果がなかったと報告している。西沢と西(127)も White, Kassanis, Barker, Nielsen の培地を用い、テッポウユリの茎頂培養を行なっているが、茎頂を取り出し培養後、土壤に植え付けるまでに、早いものでも4か月、遅いものでは2年以上の培養期間を必要とするとしている。本実験の結果とこれらの報告とを考え合わせると、ユリ茎頂培養に関する初期の報告において、茎頂組織の生育が遅く、肥大した小球根が効率よく得られなかった原因として、培地の主要塩類組成にMS処方ではなく、White や1/2 Knop (すなわちKassanis) の処方を用いていたことが大きいと考えられる。

NAA 無添加のMS主要塩類組成培地では、培養45日目で、置床した茎頂組織の90%に発根がみられた。この速やかな発根によって、MS主要塩類組成培地における葉条の生育や肥厚したりん片の形成が促進されて

いる。一方、Kaul と Sabharwal (79) は *Haworthia* の雌ずい組織の培養における、カルスの生長や器官の再分化に、White 培地はココナツミルクの添加を必要とするが、修正MS培地では天然抽出物などの添加を全く必要としなかったと報告している。以前、単子葉植物の組織、特に茎頂を培養する場合、ココナツミルク、カゼイン加水分解物、コウボ抽出物などを添加する例が多かった。しかし、MS培地などを用いるようになってからは、完全な合成培地を用いて、単子葉植物の組織培養に成功する例が増加した。このようなことから、単子葉植物であるユリの茎頂組織の培養には、MS主要塩類組成の培地が適していると考えて良いであろう。実際、ユリにおいて、八鍬ら (232) や Van Aartrijk ら (221) も、それぞれ食用ユリとカノコユリの茎頂組織の培養でMS培地を用い、葉条の生育や根の分化について良い結果を得ている。

MSの主要塩類組成は、塩類濃度(特にN、K)が高く、また、アンモニア態窒素を含むことに特徴がある。しかし、MS組成の窒素源を硝酸態窒素のみとして培養を行なっても、MS組成で培養したものと比較して、茎頂組織の生育にほとんど差はみられなかった。このことから、生長点と葉原基1~2枚程度を含む茎頂組織を培養する際にみられた、MS主要塩類組成培地の生育促進効果は、その窒素形態によるものではなく、窒素などの栄養源を豊富に含んでいることによっていると考えられる。一方、テッポウユリ、カノコユリの球根の肥大・充実期には、カリウムの吸収・集積が盛んで、窒素やリンなどの他の養分と比較してカリウムの吸収割合が最も高いことが報告されている(138, 155, 219)。したがって、茎頂組織の培養によって得られる葉条の基部の肥大・りん片化に対してカリウムが有効であることも予想され、カリウム濃度の高いMS組成がユリの培養に適していた可能性もある。この点について、本実験では明らかにしていないが、形成された球根の肥大効率を、さらに向上させる場合などには、検討する必要がある。

一般に、植物の組織培養に用いられる培地には、数種類のビタミンやアミノ酸が添加されている。イノシトールは *Haworthia* のカルスのクロロフィル含量の増加、生長促進および器官分化に有効であり(80)、チアミンはジャガイモの茎頂培養において、組織を小さく分離した場合、その生存率や再生した幼植物のクロロフィル合成に重要な役割を果たしていることが報告されている(144)。しかし、多くのビタミン、アミノ酸類の培養組織に対する効果については一定せず、それほど明確ではないといえる。本実験の中では、RNの有機物組成を添加した培地と全く添加しなかった培地での、茎頂組織の生育に明確な差は認められなかった。MellorとStace-Smithのジャガイモの茎頂培養における結果(103)と同様、1~2枚の葉原基を有するユリ茎頂組織は、光条件下、オーキシンなどを添加した培地上で培養した場合、生育に必要なビタミン類などを十分に合成できるのかもしれない。しかし、葉原基を全く有しないような小さな茎頂組織を培養する場合や暗黒下で培養する場合などには、これらの有機物質の添加が必要となる可能性はある。

極く小さく分離され、養分含量に乏しい茎頂のような組織を培養するとき、十分な養分量を培地から供

給することが必要であると考えられるので、糖濃度などを通常の組織培養培地のものより高めた方が茎頂組織の生育を促進することが予想される。実際、テッポウユリのりん片小球から得られた茎頂組織においても、農試培地にショ糖  $60 \text{ g} \cdot \text{liter}^{-1}$  を添加することによって、発根が早まり、葉原基の肥大・りん片化も促進されるなどの効果が認められている(112)。また、Allen はユリ・ウイルスフリー球根を増殖するための基本培地として、Sheridanの処方を用い好結果を得たと報告している(5)。Sheridan 培地では、ショ糖が  $40 \text{ g} \cdot \text{liter}^{-1}$  の濃度で添加されており(170)、本実験で良い結果を得たショ糖濃度と一致している。本実験のテッポウユリ茎頂培養においても、一般の組織培養の培地組成表に記されているような糖濃度  $20 \sim 30 \text{ g} \cdot \text{liter}^{-1}$  よりも、少し高めの濃度で葉条が旺盛に生育し、りん片の形成や肥大がみられるなどの良い結果が得られた。特に、ユリ球根では、貯蔵物質としてデンプンが多量に蓄積されることから、糖は、葉や根が分化・機能する際のエネルギー源としてだけでなく、球根の肥大に対しても重要な役割を果していることが予想される。したがって、子球形成後の球根の肥大を考慮すると、ユリの培養にはやや高めの培地糖濃度が適していると考えてよい。一方、組織培養によって形成されたヤマユリ子球では、培地中の糖濃度の上昇とともに球根の休眠が深くなると報告されている(197)。本実験でも、 $80 \text{ g} \cdot \text{liter}^{-1}$  のような高糖濃度の場合、形成された葉条の伸長葉の数が減少する傾向が認められ、球根の生理状態は、休眠相に入りつつあることがうかがえるとともに、根の異常な生育もみられた。この異常な根の生育は、葉条・球根の生育を抑制する結果となったことから、テッポウユリ茎頂組織の培養に用いる培地の糖濃度としては、極端な高濃度を避けて、 $40 \text{ g} \cdot \text{liter}^{-1}$  程度にすることが適当である。しかし、培養するユリの種類によって、その最適濃度に差異のあることも考えられるので、各種ユリの茎頂培養を行なう場合には、それぞれについて再検討しておくべきであろう。

培地pHは、その値によって、特定の養分の溶解度が大きく変化し、植物の生育に影響を及ぼす。植物組織培養用培地の場合、5.5 ~ 5.8 程度のpH値が一般に用いられている。一方、ユリの栽培では、pH 6.0 ~ 6.5 の微酸性土壌で、その生育が良いとされる(54)。実際に、液体培地を用い、オートクレーブ滅菌する前に調整した培地pHのテッポウユリ茎頂組織の生育に及ぼす影響をみると、茎頂から形成された葉条・球根の生育はpH3.7 ~ 7.7 の広範囲で認められ、pH5.7 で最も良好であった。培地のpH値は、培養の経過とともに、各養分の吸収量の差異によってかなり変化することや最終的には一定の値に近づく場合が知られている。本実験では、培養中の培地pHの経時変化は測定されていないが、広範囲の初期pH調整値で茎頂組織が良好な生育を示したことから、ユリ茎頂の培養に際して、培地pHの調整を厳密に行なう必要はないといえる。しかし、寒天などを添加した固体培地の場合、低pHでは寒天培地が軟弱になり、高pHでは硬くなることも知られている。この軟弱な培地では、茎頂組織は培地中に沈み易く、一定方向に置床されにくい。そのため、その生存率が低下したり、カルス形成が旺盛になった。一方、硬い培地では、発根が抑制され、ま

た分化しつつある根も培地に侵入できず、茎頂組織が培地表面から浮き上がって枯死するものがみられた。したがって、固体培地では、その硬軟度の変化を考慮して、pH調整値は5.7を中心として、4.7～6.7の範囲とすればよいと分かった。

培養温度に関してしてみると、テッポウユリの生育に適した温度範囲とされる23～24℃(156,227)において、茎頂組織から形成される葉条や根の生育は良好であり、葉も伸長した。培養温度を、さらに27～28℃まで高めると、葉の伸長は抑制されるが、逆にりん片の肥大は良好となることが分かった。このことから、栽培における場合と同様、培養温度27～28℃は、生育適温を上回る温度であり、この温度では、形成された茎頂培養球根の成熟が進み、休眠状態に入ることによって、球根への栄養分の蓄積が促進されたと推察される。したがって、茎頂培養によって形成された球根のりん片を利用して、次に行なうりん片培養による球根増殖の面からみると、そのりん片培養の材料となる肥大したりん片を多数得るためには、27～28℃で培養する方が有利であることになる。一方、ウイルスの検定を行なう場合、茎頂組織の培養開始後できるだけ早い時期に、ウイルスフリー化できた個体を確認し、そのフリー個体の増殖を開始することが望ましい。この点からすると、茎頂組織から再生された幼植物を用いて、直接ウイルス検定をすることができれば理想的である。ウイルス検定の感度・精度は、葉汁液接種などのための供試材料とする被検定植物の組織・器官によって異なることが報告されており、球根のりん片は伸長期の生葉や花弁などと比較してウイルス検出率が低くなっている(81,82)。したがって、茎頂組織の培養によって得た小球根のりん片よりも、その小球根から伸長してきている葉を検定に用いる方が検定感度が向上する可能性がある。このようなウイルス検定用の伸長葉を得ることを目的とする場合には、23～24℃で培養する方が適切であることになる。

栽培中のユリ球根頂部への光の照射が出葉を促進することが知られているが(96,98,166,167)、茎頂組織の培養においても、培養中の照明は葉の伸長を促した。しかし、400 lxのような低照度あるいは照明時間が短い培養条件(8時間日長)では、葉が細く、その基部は、ほとんど肥大・りん片化しなかった。また、7,000 lx以上の高照度で培養しても、葉条の生育や球根の肥大は促進されなかった。したがって、伸長葉の少ない球根を得るためには、暗条件で培養すればよい。また、球根から葉が伸長しても差し支えない場合、1,500～4,000 lxの室内照明程度の明るさを16時間程度確保できるなら、光が入る場所で培養しても問題はない。一方、通気性の低い培養容器を用いた場合、明期における容器内の炭酸ガス濃度が低下し、高照度下においても培養幼植物体は光合成能力を十分に発揮できず、その生育は促進されないことが報告されている(36,37,88)。このことから考えると、本実験においても、より通気性の高い培養容器を用いた場合、特に葉条が形成され、葉が伸長した段階では、高照度による生育促進が認められるかもしれない。

Earle と Langhans (32) はキクの茎頂培養において、茎頂組織の生長円錐体側を上向きにして培地に置床（正置）すると複数個の葉条が得られ、下向きにして置床（倒置）すると leafy (葉条) カルスが形成されると報告している。本実験のテッポウユリの茎頂組織の培養においても、生長円錐体側を下向きにして置床し培養すると、旺盛に生長するカルスが形成されることを観察した。したがって、茎頂組織からカルスを經由せず、ウイルスフリー個体を直接に得るためには、生長円錐体側を上向きにして培地に置床する必要がある。一方、テッポウユリの茎頂組織の培養では、オーキシンなどの生長調節物質を培地に添加しても、カルス形成の促進に関して、一定の傾向がみられなかった。したがって、カルス形成を目的とする場合、生長円錐体側を下向きにして培養する方が、カルスを効率よく得ることができるので、茎頂組織の置床方向として適している。

Allen (5)、Van Aartrijk ら (221) や八嶽ら (232) は、ユリの茎頂培養の培地に、オーキシンとして NAA を添加し、茎頂組織から形成される球根の肥大を促進した。生長調節物質に関する本実験の結果でも、培地中にオーキシンとして低濃度の NAA を添加することによって、形成される葉条の生育や根の分化が促進され、その結果、肥大した球根が得られた。これらのことから、ユリ類の茎頂組織の培養では、一般に、低濃度の NAA を添加することが、球根の形成・生育を促進し、肥厚したりん片を得ることに有効であるといえる。

一方、イチゴ、キク、ガーベラ、スイセン、オウゴンカズラなどで、培地にサイトカイニン類を添加することによって、腋芽や不定芽を多数増殖する方法が報告されている (21, 32, 33, 59, 60, 118)。ユリ茎頂培養の場合、培地へのサイトカイニン添加の影響は、培養する種によって異なっていた。サイトカイニン類の添加は、テッポウユリなどでは、茎頂組織の生育を抑制する傾向がみられたが、カノコユリ、ヤマユリでは、肥大した茎頂組織の表層から多数の不定芽が分化した「不定芽塊」形成に対する促進効果が認められた。Takayama と Misawa (195, 196) は、ヤマユリのりん片培養において、高濃度のサイトカイニンの添加により「りん片塊」と呼ばれる小さなりん片の集合体を分化させた。そして、その組織切片の観察を行ない、「りん片塊」が多数の小さな葉原基の集合体であることを示した。本実験のサイトカイニン添加培地において、茎頂組織から分化した多数の不定芽様の集合体も、「りん片塊」と同様、多数の小さな生長点とその葉原基が、茎頂組織の表面全体から分化したものであった。この不定芽の集合体である「不定芽塊」は、培養50日目頃にサイトカイニン添加培地あるいは NAA 添加培地へ分割・移植することによって、それぞれ不定芽をさらに増殖したり、球根にまで生育させることも可能であり、りん片と同様、増殖材料として利用できることが分かった。

ハカタユリ茎頂組織の場合、NAA 添加培地での培養期間が長くなるにつれて、肥大した根の基部表面にカルス組織が形成され、そこから小球が多数分化し、これらの小球は栽培2年で正常に開花した。したが



って、ハカタユリでは、このカルス組織を利用して、効率よく球根を増殖する方法も利用できる。また、スカシユリ系の‘清津紅’や‘烏羽玉’では、NAA を添加した培地で、葉原基の腋芽に由来すると思われる複数個の球根を分化した。このことは、スカシユリの系統には分球し易い性質のものが多いとされることとも関連があるのかもしれない。しかし、この場合、形成された球根は小さく、そのりん片の肥大も不良であった。増殖のための培養を効率よく行なうためには、培養材料となる肥大したりん片を多数有する大きな球根が適している。したがって、形成される球根の数は多いものの、その肥大が不良であるこのような種では、今後さらに、球根肥大に適した培地条件などを検討する必要がある。

電子顕微鏡によるウイルス粒子の観察およびタカサゴユリ実生苗への葉汁液接種によるウイルスの検定に関する実験では、球径10mm程度の子球から育てた若い植物体の、伸長しつつある茎の上部の普通葉を被検定材料として供試し、その植物体のウイルスの保毒状態が確認できることが分かった。すなわち、電子顕微鏡観察によると、本実験の圃場で育成した球根には紐状ウイルスが存在しており、また、その葉汁液を接種したタカサゴユリ実生苗は黄色条斑ではなく、緑色濃淡モザイクの病徴を示した。これらの実験結果は、両検定法が被検定植物の比較的早い生育段階から利用できることを示している。ユリに感染する紐状ウイルスとしては、lily symptomless virus、lily mottle virus および tulip breaking virus の3種がある。黄色条斑は cucumber mosaic virus と lily symptomless virus の複合感染が原因となり、一方、lily mottle virus と tulip breaking virus はそれぞれ緑色濃淡モザイクを引き起こすことが知られている。したがって、本実験で確認された紐状ウイルスは、lily symptomless virus であるより lily mottle virus あるいは tulip breaking virus である可能性が高いが、その同定は行なっていない。

被検定植物を育成・管理する設備・労力を省き、また、できるだけ早く無病球根の増殖を開始するためには、茎頂組織の培養によって形成された *in vitro* の幼植物体を被検定材料として直接使い、そのウイルスの保毒状態を判別できることが望ましい。したがって、このような若い培養植物体のウイルスの保毒状態を判別するためには、今後、抗原抗体反応を効率よく利用する検定方法 (225) や、ウイルス濃度が非常に低い試料においてもウイルス粒子を確認できるとして報告されている抗原抗体反応と電子顕微鏡とを組合せた検定方法 (10) などを検討・改良することが必要である。さらに、最近では、特定の遺伝子 (DNA、RNA) を分離するとともに、その検出・定量のために、それらと相補的な塩基対部分を持つ標識した分子との間で雑種を形成させる遺伝子診断法が開発され、ウイルスやウイロイドなどの植物病害の検出にも応用されている (71, 161, 162)。このような新しい検出技術をユリにおいて利用できるようにすることも、精度・感度の高いユリのウイルス検定技術を確立するためには必要であろう。

#### 第4節 摘要

テッポウユリを中心に、数種類のユリについて茎頂組織の培養を行ない、葉条や根の形成と生育に及ぼす培地組成および培養環境条件の影響について検討した。また、茎頂組織の培養に由来する植物体のウィルスの保毒状態についても調査した。

1. 主要塩類組成として、塩類濃度（特に窒素とカリウム）の高いMS処方培地を用いると、茎頂組織の生育が促進され、速やかな発根と、形成される葉条の基部の肥大・りん片化が認められた。また、ビタミン・アミノ酸類を添加しない培地でも、茎頂組織は生育し、葉条基部が肥大してりん片となり、球根化した幼植物体が形成された。

2. 茎頂組織から形成される葉条や根の生育には、寒天  $8\text{g}\cdot\text{liter}^{-1}$  を加え、pHを5.7に調整した培地が適していることが分かった。また、ショ糖濃度については、一般の組織培養に用いられる濃度よりやや高め、 $40\text{g}\cdot\text{liter}^{-1}$  が適した。

3. テッポウユリなどの茎頂組織から得られる葉条の生育とその基部りん片の肥大と球根形成は、生長調節物質として、NAAを $0.1\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$ の濃度で培地に添加することによって促進された。ヤマユリやカノコユリなどでは、BA  $0.1\sim 1.0\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$ あるいはカイネチン  $1.0\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$ を添加すると、茎頂組織の表面全体から多数の不定芽が分化した「不定芽塊」が形成された。この「不定芽塊」は切断・分離して新しい培地に移植されると、培地中の生長調節物質の種類と濃度に応じて、さらに不定芽の増殖や球根形成を行ない、増殖材料として利用できることが分かった。また、「清津紅」や「烏羽玉」などのように、NAAの添加によって生存率が向上し、腋芽由来と考えられる球径2mm程度の小さな球根を複数個形成するユリもあった。

4. 茎頂組織から形成される葉条の生育には、 $23\sim 28^{\circ}\text{C}$ の培養温度が適していた。 $23\sim 24^{\circ}\text{C}$ では、葉条からの葉の伸長が促進され、 $27\sim 28^{\circ}\text{C}$ では、伸長する葉数が減少し、りん片の肥大が促進された。

5. 葉条の葉の伸長は、明条件で促進され、暗条件では抑制された。葉条の生育やりん片の形成・肥大は、18および24時間照明、1,500および4,000lxの照度で促進された。また、暗条件においても、りん片の肥大した球根が得られた。

6. 茎頂組織の生長円錐体側を下にして培地に置床（倒置）した場合、茎頂組織の周囲全体に、旺盛なカルスの形成と増殖がみられた。

7. 電子顕微鏡によるウイルス粒子の観察およびタカサゴユリ実生苗に対する葉汁液接種による生物検定の結果、これらの検定法が被検定植物の比較的早い生育段階から利用できること、また、本研究の茎頂組織の培養に由来する球根は、ウィルスフリーであることが示唆された。

## 第II章 組織培養による球根増殖と培養球根の栽培

前章では、短期間で効率よくウイルスフリー（無病）のユリ幼植物を育成することを目的に、茎頂組織の培養における葉条や根の生育、さらには小球根の形成やりん片の肥大に及ぼす培地組成および培養環境条件の影響を明らかにした。増殖を目的とすれば、茎頂組織をやや大きく採り、葉原基腋芽の生長を促したり(51,116)、前章のカノコユリなどの例のように、不定芽の分化を促す培地条件を用いて、「不定芽塊」を形成させる方法も考えられる。しかし、無病、特にウイルスフリー植物の作出を目的とすれば、できるだけ採取する茎頂組織を小さくする必要があり、通常、1茎頂組織から得られる植物体の数は1個体である。したがって、この場合、ウイルスフリー植物を大量に供給できる増殖体系を確立するためには、茎頂組織の培養で得られた1個体の幼植物を材料として、さらに多数のウイルスフリー（無病）植物を効率よく増殖できる技術を開発することが必要となる。

ウイルスフリーのユリ球根を大量に増殖する場合、その増殖過程でのウイルス再感染や病虫害発生も防止しなければならない。茎頂組織を培養することによってウイルスフリー球根を得ることができたとしても、その増殖方法として、圃場でのりん片挿しなどの従来の栄養繁殖法を用いた場合、栽培の途中で病原ウイルスを媒介するアブラムシの飛来などによりウイルス病に再感染したり、他の病虫害の被害を受けたりすることによって、増殖したウイルスフリー球根が失われる危険性が大きい。このため、寒冷紗を取り付けた隔離栽培施設の利用や土壌殺菌・農薬散布といった栽培管理作業を頻繁に行なうなどの工夫が必要となってくる。このように、従来の栄養繁殖法を無ウイルス球根の増殖に用いた場合、大きな施設や労力を必要とし、また、ウイルス病や病虫害の発生を完全に阻止することは困難である。この点、茎頂組織から得られた無菌の幼植物体を培養の材料として、直接、*in vitro* で球根を増殖する組織培養法は、増殖過程でのウイルスや病虫害による汚染を避け、ウイルスフリー（無病）球根を安全・確実に増殖できるといだけでなく、従来の栽培法による増殖の場合と比較して、施設をコンパクトに集約することができ、増殖期間中の管理労力も少なく済むといった利点がある。また、組織培養では、環境条件を自由に、かつ、厳密にコントロールすることができるので、植物体の極く小さい組織片からでも多数の球根を短期間で形成させ、その生育を促進させることも可能になる。したがって、ウイルスフリー（無病）球根だけでなく、新しい品種や貴重な球根を急速に増殖する手段としても非常に有効である。

このような状況の中で、組織培養でのユリ球根の分化・増殖に関する研究が数多く報告されている(12, 28, 29, 38, 40, 44, 45, 90, 93, 108, 129, 130, 136, 154, 157, 170, 176, 179, 222, 223, 224)。実用的な球根生産まで

考慮したものについても、緒言で述べたように、寒天培養と液体培養とを組み合わせた増殖法を用いた Simmondsら (177, 178)、Takayamaら (195, 196, 201)、その他いくつかの報告 (64, 192, 210) がみられるようになってきたが、その数は多くない。本章では、培養で得られた無菌幼植物のりん片、葉あるいは茎の節などの切片を培養材料として、肥大したユリ小球根を *in vitro* で効率よく増殖できる培養条件を固体 (寒天) 培地を用いて明らかにするとともに、茎頂組織の培養で得られた幼植物体のりん片切片を材料として、寒天培養で無菌的に増殖した小球根を鉢上げ・栽培し、その生育についても調査した。

## 第1節 りん片培養

ユリの球根は、短縮した茎 (disc) に葉の変形・肥厚したりん片が重なり合って付着しているりん片状りん茎である。このりん片を球根から切り離して適当な土壤に挿し込み、子球を形成させるりん片挿しによる繁殖は、木子繁殖の場合と比較して、球根の肥大は遅れるものの、一度に多数の球根が得られ、作業も比較的簡単であるので、ユリ類独特の繁殖法として広く行なわれている。りん片挿しに関する実際の方法とその基礎的理論の研究も数多く報告されている (57, 67, 68, 69, 98, 99, 100, 101, 102, 119, 220, 240)。また、先述したように、組織培養によるユリ球根の増殖に関する研究も盛んであるが、その中でも、りん片を培養の材料に使用している報告が最も多い (224)。

本節では、りん片培養において、肥大したりん片を有する子球を効率よく分化・増殖させる条件を明らかにするため、テッポウユリとカノコユリを用い、以下の実験を行なった。最初に、培地に添加する生長調節物質の効果を調べた。次に、培養環境として温度の影響を調べ、さらに、培養材料に使用するりん片を切断した場合の影響を調べた。最後に、このようにして得られた基本的な培養条件を他のユリのりん片培養にも適用し、それらの球根の増殖と生育に対する効果を調べた。

### 第1項 子球の分化と生育に及ぼす培地中の生長調節物質の影響

培地中に添加する生長調節物質として、茎頂組織からの葉条の生育や不定芽の分化に促進効果を示したオーキシンおよびサイトカイニンを用い、その種類と濃度がりん片からの子球や根の分化と生育に及ぼす影響について検討を行なった。

#### 材料および方法

テッポウユリ 'ジョージア' およびカノコユリ '内田かのご' を供試した。

培養材料を得るための茎頂培養用培地および育成された無菌幼植物体の継代・維持用培地には、主要塩類と鉄源としてMSの処方、微量要素と有機物質としてRNの処方を用い、ショ糖を  $40\text{g}\cdot\text{liter}^{-1}$ 、寒天を

8 g·liter<sup>-1</sup>、生長調節物質としてNAAを0.1 mg·liter<sup>-1</sup>の濃度になるように添加した後、pH 5.7に調整したものを使用した。実験用の培地には、上記培地の生長調節物質のみを以下のように変更したものをを用いた。オーキシンの影響をみた実験の場合、テッポウユリでは、NAA、IAAあるいは2,4-D(各0.01、0.1、1.0、5.0、10.0mg·liter<sup>-1</sup>)を、カノコユリでは、NAA、インドール酪酸(以下IBA)あるいは2,4-D(各0.01、0.1、1.0 mg·liter<sup>-1</sup>)を、括弧内に示した所定濃度になるように培地中に添加した。サイトカイニンの影響をみた実験の場合、テッポウユリでは、カイネチン(5.0、10.0mg·liter<sup>-1</sup>)を単独あるいはNAA(0.01mg·liter<sup>-1</sup>)と組合せて、カノコユリでは、BA(0.01、0.1、1.0 mg·liter<sup>-1</sup>)を、それぞれ括弧内に示した所定濃度になるように添加した。また、生長調節物質無添加の培地を対照とした。培地の滅菌は、1.2 kg/cm<sup>2</sup>・120℃・12分間の条件で行なった。

培養材料となるりん片は以下のような方法で得た。まず、供試する球根の茎頂組織を第1章で記した方法に従い培養した。得られた無菌球根のりん片を、70~120日間継代培養することによって、子球を分化させた。さらに、同様にして70日間隔でりん片培養を行なうことにより増殖・維持した無菌子球の10~30mg程度に肥大したりん片を、殺菌したピンセットとメスを使用して分離・採取した。培養は、直径25mmの試験管に分注した20mlの各培地上に、採取したりん片1枚を、その背面側が培地に接するように置床して行なった。培養条件は、昼光色蛍光灯による照明装置を備えつけた恒温器内で、温度23~24℃、連続照明、照度1,500 lxとした。

## 結果

オーキシン類添加培地上で、テッポウユリ‘ジョージア’のりん片を70日間培養した結果を第20図に示した。生長調節物質を除いた培地上では、発根および子球の分化が少なく、分化した子球数は培養1りん片当たり1.2個であり、その肥大も遅かった。また、子球から伸長した葉も細かった。培地に添加したオーキシン類の中では、NAAが発根および子球の分化と生育に最も適しており、0.1mg·liter<sup>-1</sup>の濃度で培養したとき、肥大したりん片を有する子球を1りん片当たり2.5個分化した。IAAでは、子球の分化と生育に対してNAA 0.1mg·liter<sup>-1</sup>と同程度の促進効果を得るために、より高濃度(10.0mg·liter<sup>-1</sup>)を必要とした。2,4-Dは根の分化と伸長に対する促進効果がほとんどみられず、また、子球の分化と生育に対する促進効果に関しても、NAA、IAAと比較して劣っていた。NAAあるいはIAAを添加した培地では、分化した根の基部付近に緑色カルスが形成されることがあり、2,4-Dを添加した培地で培養したりん片の基部には、黄色カルスが発生する場合もみられた。

カノコユリ‘内田かのご’のりん片培養では、生長調節物質無添加の基本培地上で分化した子球数は1りん片当たり1.8個であり、子球の肥大を含む葉条全体の生育もオーキシン添加培地のものと比較して劣った。テッポウユリの場合と同様、子球の分化と生育に適するオーキシンはNAAであった。NAAを0.1

$\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$ の濃度になるように添加すると、1りん片当たり 3.3個の子球が分化し、その生育も良好であった。その結果、1りん片当たりに分化した子球から採取することができる20mg以上に肥大したりん片の数も、オーキシン無添加培地での 0.7枚に対して、NAA  $0.1\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$  添加培地では4.5枚にまで増加した(第18表、第21図)。IBA 添加培地では、 $1.0\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$  の濃度で1りん片当たり3.2個の子球が分化したが、その生育はNAA  $0.1\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$  添加培地で得られた子球の生育と比較して劣っており、1りん片当たりに分化した子球から採取できる20mg以上のりん片枚数も3.0枚となり、NAA 添加培地のものより減少した。2,4-D の場合、0.01、 $0.1\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$  の濃度では、子球の分化と生育に対する促進効果は認められなかったが、 $1.0\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$ の濃度では、IBA を $1.0\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$  添加した培地で形成された子球と同程度に肥大した子球が3.0個得られた。

カノコユリ ‘内田かのか’ を用い、BAの影響を調べた実験における生長調節物質無添加培地上では、培養1か月で1りん片当たり1.5個の不定芽の分化がみられた。BAの添加は不定芽の分化を促進し、 $1.0\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$ の濃度では、1りん片当たり4.6個の不定芽が分化した。培養70日目では、生長調節物質無添加培地の場合、不定芽分化数の増加はほとんどみられないが、分化した不定芽は肥大して子球となった。一方、BAを0.1あるいは  $1.0\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$  の濃度になるように添加した培地で培養した場合、不定芽の葉原基が肥大・りん片化することによる球根の形成は認められなかった。特に、 $1.0\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$ の濃度では、不定芽の分化数が増加しており、1りん片当たりに少なくとも7.2個以上の不定芽が得られた(第19表、第22図)。これらの多数の不定芽から成る「不定芽塊」の培養をそのまま継続しても、不定芽数は増加することではなく、むしろ褐変するものがみられた。しかし、この「不定芽塊」を切断して得た切片を新たなサイトカイニン添加培地へ移植すると、切片からさらに不定芽が分化した。

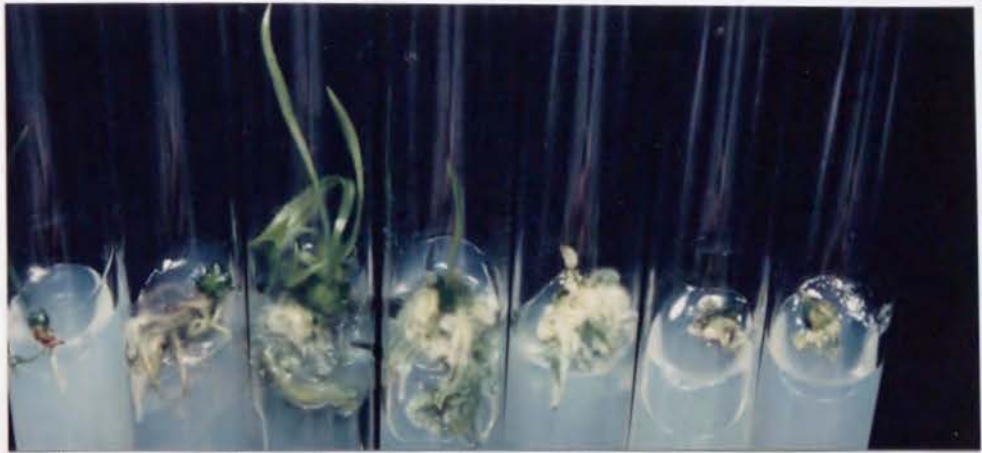
テッポウユリ ‘ジョージア’ のりん片培養においても、サイトカイニンとしてカイネチンを培地に添加することによって不定芽分化の促進効果がみられた。また、低濃度のNAA ( $0.01\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$ )と組み合わせると、その効果は一層明確になった。しかし、サイトカイニン添加によって得られるテッポウユリりん片からの不定芽の分化数は、カノコユリでの場合と比較すると少なく、1りん片当たり5.0個であった(第23図)。

## 第2項 子球の分化と生育に及ぼす培養温度の影響

### 材料および方法

実験には、テッポウユリ ‘ジョージア’ およびカノコユリ ‘内田かのか’ を供試した。無菌球根の育成・維持、そのりん片の採取と培地への置床、培養容器、培地量、培養中の照明などは前項に準じた。

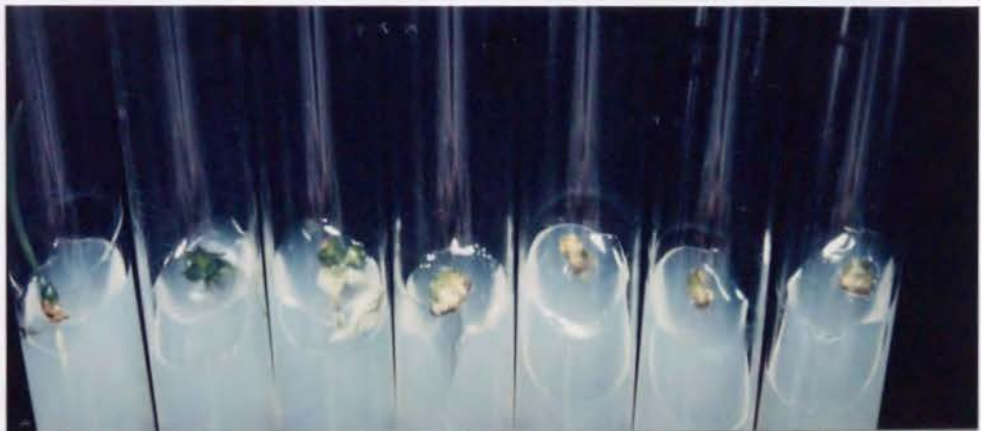
検討する培養温度は、 $17\sim 18^{\circ}\text{C}$ 、 $23\sim 24^{\circ}\text{C}$ 、 $27\sim 28^{\circ}\text{C}$ および $31\sim 32^{\circ}\text{C}$ とし、恒温器の温度設定を変更し



NAA (mg·liter<sup>-1</sup>) 0      0.01      0.1      1.0      3.0      5.0      10.0



IAA (mg·liter<sup>-1</sup>) 0      0.01      0.1      1.0      3.0      5.0      10.0



2,4-D (mg·liter<sup>-1</sup>) 0      0.01      0.1      1.0      3.0      5.0      10.0

Fig. 20. Influence of auxins in the medium on differentiation and growth of plantlets in the culture of scales of *L. longiflorum* 'Georgia'.

(Culture period: 70 days)

Culture medium: MS's macro-elements and Fe, RN's micro-elements and organics, 40g·liter<sup>-1</sup> sucrose, 8g·liter<sup>-1</sup> agar, pH5.7 and 0 ~10.0 mg·liter<sup>-1</sup> auxin (NAA, IAA or 2,4-D).

Culturing conditions: 23°C, continuous light (1,500 lux).

Culture materials: The scales with 10 ~30mg were taken from bulblets regenerated through shoot-tip culture and the abaxial side of the explant was placed in contact with 20ml of the medium in a test tube (25mm diam).

Table 18. Influence of NAA concentration in the medium on differentiation and growth of plantlets in the culture of scale of *L. speciosum* 'Uchida'. (Culture period : 70 days)

NAA concn (mg·liter <sup>-1</sup> )	FW of shoots per scale (mg)	No. of bulblets per scale	No. of harvested scales per scale				FW of root per scale (mg)
			~≥20mg (FW)	>~≥10mg (FW)	10 >~≥5mg (FW)	Total	
0	112.0	1.8	0.7	1.3	1.1	3.1	112.0
0.01	124.5	2.1	0.3	1.4	1.8	3.5	182.0
0.1	865.5	3.3	4.5	3.8	1.4	9.7	1222.5
1.0	115.0	1.5	0	1.5	1.3	2.8	1920.0

Culture medium: MS's macro-elements and Fe, RN's micro-elements and organics, 40g·liter<sup>-1</sup> sucrose, 8g·liter<sup>-1</sup> agar, pH5.7, 0 ~ 1.0 mg·liter<sup>-1</sup> NAA .

For culturing conditions and materials: See Fig.20.



Fig.21. Influence of NAA concentration in the medium on differentiation and growth of plantlets in the culture of scales of *L. speciosum* 'Uchida'. (Culture period : 70 days )

For culture medium: See Table 18.

For culturing conditions and materials: See Fig.20.



Table 19. Influence of BA concentration in the medium on differentiation and growth of bulblets (adventitious buds) in the culture of scale of *L. speciosum* 'Uchida'.  
(Culture period : 70 days)

BA concn (mg·liter <sup>-1</sup> )	No. of bulblets [adventitious buds] per scale <sup>z</sup>	Bulblet [adventitious bud] growth <sup>y</sup>	% of scales with roots	Root growth <sup>x</sup>	% of scales with callus
0	3.1	++	80.0	+++	0.0
0.01	2.2	+++	60.0	+++	0.0
0.1	[3.8]	[+++]	20.0	+	0.0
1.0	[>7.2]	[++]	0.0	-	20.0

Culture medium: MS's macro-elements and Fe, RN's micro-elements and organics, 40g·liter<sup>-1</sup>sucrose, 8g·liter<sup>-1</sup>agar, pH5.7, 0~1.0 mg·liter<sup>-1</sup>BA .

For culturing conditions and materials: See Fig.20.

<sup>z</sup> Numbers and plus signs in brackets indicate the number and growth of adventitious buds, respectively.

<sup>y</sup> Bulblet[bud]growth : += bulblet[bud] with diameter of ~2mm, ++= bulblet[bud] with diameter of 2~4mm, +++= bulblet[bud] with diameter of 4~6mm, ++++= bulblet[bud] with diameter of 6mm~.

<sup>x</sup> Root growth : -= no root formation, += few root formation, ++= several root formation, +++= many root formation,

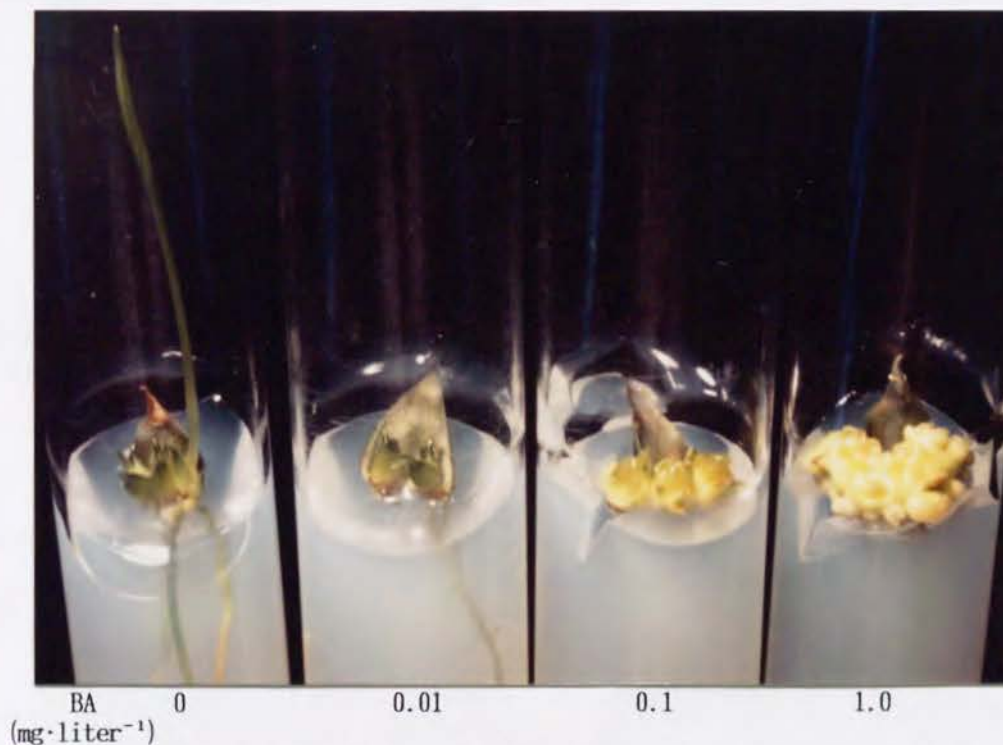
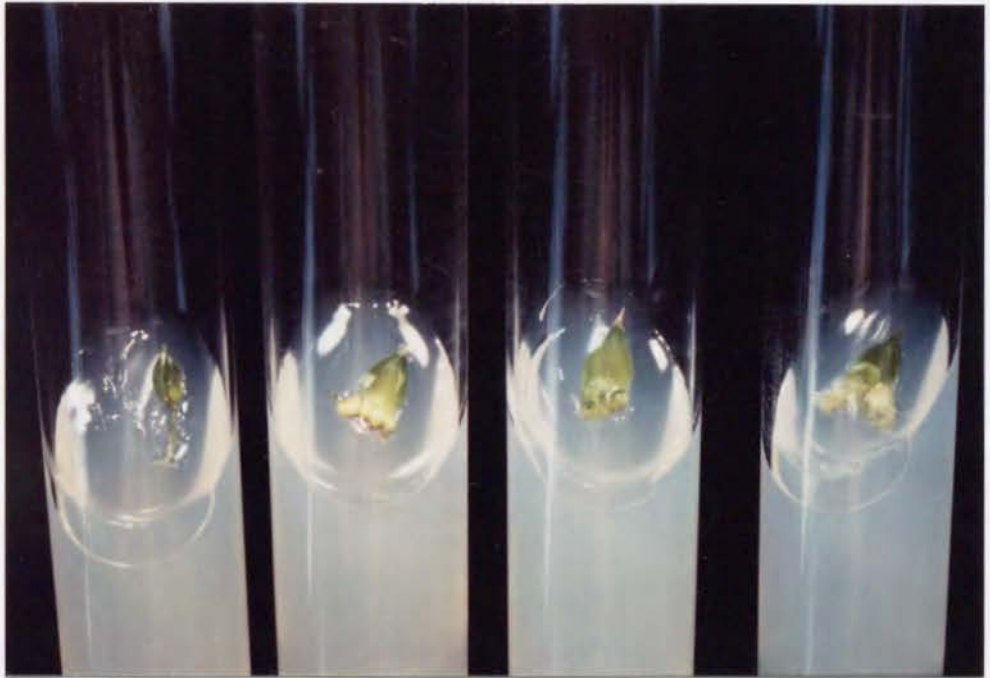


Fig.22. Influence of BA concentration in the medium on differentiation and growth of plantlets in the culture of scales of *L. speciosum* 'Uchida'. (Culture period : 70 days )

For culture medium: See Table 19.

For culturing conditions and materials: See Fig.20.



NAA (mg·liter <sup>-1</sup> )	0	0.01	0.01	0.1
Kin (mg·liter <sup>-1</sup> )	0	5.0	10.0	0

Fig.23. Influence of NAA and kinetin in the medium on differentiation and growth of bulblets in the culture of scales of *L. longiflorum* 'Georgia'. (Culture period : 35 days )

Culture medium: MS's macro-elements and Fe, RN's micro-elements and organics, 40g·liter<sup>-1</sup>sucrose, 8g·liter<sup>-1</sup>agar, pH5.7, combination of 0~0.1mg·liter<sup>-1</sup>NAA with 0 ~10.0 mg·liter<sup>-1</sup>kinetin, as shown above.

For culturing conditions and materials: See Fig.20.

で行なった。

培地には、主要塩類組成および鉄源としてMSの処方、微量元素および有機物質としてRNの処方に加え、生長調節物質としてNAAを $0.1 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ 、ショ糖を $40 \text{ g} \cdot \text{liter}^{-1}$ 、寒天を $8 \text{ g} \cdot \text{liter}^{-1}$ の濃度になるように添加し、pHを5.7に調整したものをを用い、前項と同様の条件でオートクレーブ滅菌した。

## 結果

テッポウユリにおけるりん片培養70日後の結果を第20表に示した。培養温度 $17 \sim 18^\circ\text{C}$ では、りん片からの発根および根の伸長が不良であった。一方、分化した子球は、細い葉を伸長しているものが多く、また、あまり肥大していなかった。 $23 \sim 24^\circ\text{C}$ で培養した場合、分化した子球の肥大が良好であり、子球から伸長した葉も厚く、その葉条の生体重は $560 \text{ mg}$ 程度にまで増加した。 $27 \sim 28^\circ\text{C}$ のやや高温条件で培養すると、分化した子球からの葉の伸長が抑制されたが、子球自体の肥大は最も良好であった。これらの培養温度 $27 \sim 28^\circ\text{C}$ で得られた子球では、採取できる $20 \text{ mg}$ 以上に肥大した新しいりん片の数も、培養1りん片当たり9.0枚と最も多くなった。培養温度を、さらに $31 \sim 32^\circ\text{C}$ まで高めると、他の温度条件での培養結果と比較して、発根および子球の分化と生育が抑制された。

カノユリのおりん片培養においても、テッポウユリ‘ジョージア’の場合と同様の結果が得られた。培養温度 $27 \sim 28^\circ\text{C}$ で培養すると、分化した子球からの葉の伸長や根の生育は抑制された。しかし、子球自体の生育は良好であり、分化した子球を形成しているりん片も、 $23 \sim 24^\circ\text{C}$ で培養して得られる子球のりん片と比較して、より肥大した。

## 第3項 子球の分化と生育に及ぼすりん片切断の効果

### 材料および方法

実験には、カノユリ‘内田かのご’の子球から第1項の方法に従い採取した $20 \sim 30 \text{ mg}$ のりん片を、メスで切断し上部（先端側）と下部（基部側）に2分割あるいは左右に2分割した場合と、上部の左右および下部の左右に4分割した場合に得られる各りん片切片を、それぞれ培養に供試した。無菌球根の育成・維持、りん片切片の培地への置床方法、培養容器、培地量などは第1項に準じた。培養中の温度・照明は、りん片を2分割した実験では第1項に準じ、4分割した実験では、 $27 \sim 28^\circ\text{C}$ 、 $4,000 \text{ lux}$ の連続照明とした。培地には、第2項と同様のものをを用いた。

## 結果

上下に2分割した場合、切片上に分化する子球は、主に各切片の基部にみられた。これらの切片では、りん片を切断せずに培養した場合と比較して、 $300 \text{ mg}$ 以上の子球の分化数は減少したが、それ以下の小さな子球の分化数は増加した。特に、下部（基部側）の切片では、切片基部だけでなく切片頂部の切断面に

も子球を分化することによって、子球の分化総数が増加した(第21表(A))。りん片を縦方向に切断して左右に2分割した場合、子球の分化は切片の基部だけでなく、縦方向の切断面からも多数みられた。その結果、切断しないりん片を培養したときと比較して、分化した子球の数がほぼ2倍となった。これらの分化した子球から得られる新りん片の枚数も、20 mg以上に生育したりん片数では非切断りん片の培養結果と同程度であるが、20 mg以下のものでは2.4倍となった(第21表(A))。

りん片を切断して4分割した場合、いずれの部位の切片においても切断面が肥大し、その切断面の肥大した組織から切断しないりん片を培養したときと同程度以上の子球数が分化した。切断切片から分化した子球の大きさをみると、球重の小さなものの割合が増加し、その子球から採取できるりん片も、20 mg以上に肥大したものの割合が少なくなった。しかし、1りん片当たりには得られるりん片の総数は、4分割したそれぞれのりん片切片で形成された子球から分離した20 mg以上のりん片数を合計すると、非切断りん片を培養した場合よりも増加した(第21表(B))。

#### 第4項 設定培養条件の数種類のユリへの適用

生長調節物質および培養温度を、第1項、第2項においてテッポウユリおよびカノコユリりん片からの子球の分化と生育を促進した  $\text{NAA} 0.1 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$  と  $23 \sim 24^\circ\text{C}$  に設定して、他の数種類のユリについてもりん片培養を行ない、その影響を調査した。

#### 材料および方法

実験には、ササユリ、オトメユリ (*L. rubellum* Baker)、ハカタユリ、タモトユリ (*L. nobilissimum* Makino)、シンテッポウユリ (*L. ×formolongi* hort.)、ヤマユリ、タケシマユリ (*L. hansonii* Leichtle.)、トサヒメユリおよびアジアチックハイブリッド群のミッドセンチュリーハイブリッド系品種である‘エンチャントメント’、‘金扇’と‘烏羽玉’を供試した。

無菌球根の育成・維持、そのりん片の採取と培地への置床、培養容器、培地滅菌、培地量、培養中の温度・照明などの培養条件は第1項に準じた。

培地には、第2項と同様のものを用いた。

#### 結果

いずれのユリ類においても、テッポウユリ、カノコユリでの培養結果と同様、培養りん片から子球が形成され、また、その子球から採取したりん片を培養して、さらに球根を増殖することもできた。

供試したユリ類のりん片培養3か月後の結果を第22表に示した。タモトユリ、シンテッポウユリ、ヤマユリ(第24図(A))、タケシマユリおよびトサヒメユリでは、300 mg以上の子球も形成され、トサヒメユリの場合、各培養りん片から得られる最大子球の球径の平均は、約 8mmであった。1りん片の培養によ

Table 20. Influence of temperature on differentiation and growth of plantlets in the culture of scale of *L. longiflorum* 'Georgia'.  
(Culture period : 70 days)

Temperature (°C)	FW of shoots per scale (mg)	No. of bulblets per scale	No. of harvested scales per scale				No. of leaves per scale	FW of roots per scale (mg)
			$\sim \geq 20\text{mg}$ 20 (FW)	$> \sim \geq 10\text{mg}$ 10 (FW)	$> \sim \geq 5\text{mg}$ (FW)	Total		
17-18	316.0	2.2	0.4	2.6	0.2	3.2	2.6	620.0
23-24	558.5	2.2	5.8	1.8	0.8	8.4	3.6	1186.0
27-28	506.5	2.0	9.0	1.2	0	10.2	0	1110.5
31-32	176.0	1.4	1.2	1.0	0	2.2	0	134.0

Culture medium: MS's macro-elements and Fe, RN's micro-elements and organics, 40g·liter<sup>-1</sup>sucrose, 8g·liter<sup>-1</sup>agar, pH5.7, 0.1mg·liter<sup>-1</sup>NAA.  
Culturing conditions and materials: The same as in Fig.20 except for temperature.

Table 21. Influence of cutting scales into various segments on differentiation and growth of bulblets in the scale culture of  
*L. speciosum* 'Uchida'.  
(Culture period : 70 days)

Treatment	No. of bulblets per scale segment					No. of harvested scales per scale segment			
	$\sim \geq 300\text{mg}$ 300 (FW)	$> \sim \geq 100\text{mg}$ 100 (FW)	$> \sim \geq 50\text{mg}$ 50 (FW)	$> \sim \geq 30\text{mg}$ (FW)	Total	$\sim \geq 20\text{mg}$ 20 (FW)	$> \sim \geq 10\text{mg}$ 10 (FW)	$> \sim \geq 5\text{mg}$ (FW)	Total
(A)									
Intact scale	0.8	2.3	0.7	0.2	4.0	5.7	3.5	0.7	9.9
Upper scale segment cut horizontally	0.2	3.0	0.8	0.5	4.5	4.0	3.3	0.5	7.8
Lower scale segment cut horizontally	0.2	3.0	2.0	2.0	7.2	6.5	6.7	1.7	14.9
Scale segment cut longitudinally	0.7	4.3	2.2	0.8	8.0	6.2	6.7	3.2	16.1
(B)									
Intact scale	1.3	2.2	0.3	0.7	4.5	7.7	2.0	0.3	10.0
Upper one fourth scale segment cut horizontally and longitudinally	0.2	2.8	1.3	2.6	6.9	3.3	2.8	2.3	8.4
Lower one fourth scale segment cut horizontally and longitudinally	0.7	2.3	0.5	1.5	5.0	3.3	3.0	1.0	7.3

For culture medium: See Table 20.  
Culturing conditions: For exp. (A), see Fig.20. For exp. (B), 27-28°C, continuous light (4,000 lx).  
Culture materials: The same as in Fig.20 except that scales with 20~30mg were cultured.

Table 22. Differentiation and growth of bulblets and roots from bulb scales of several lilies cultured in vitro.

(Culture period : 95 days)

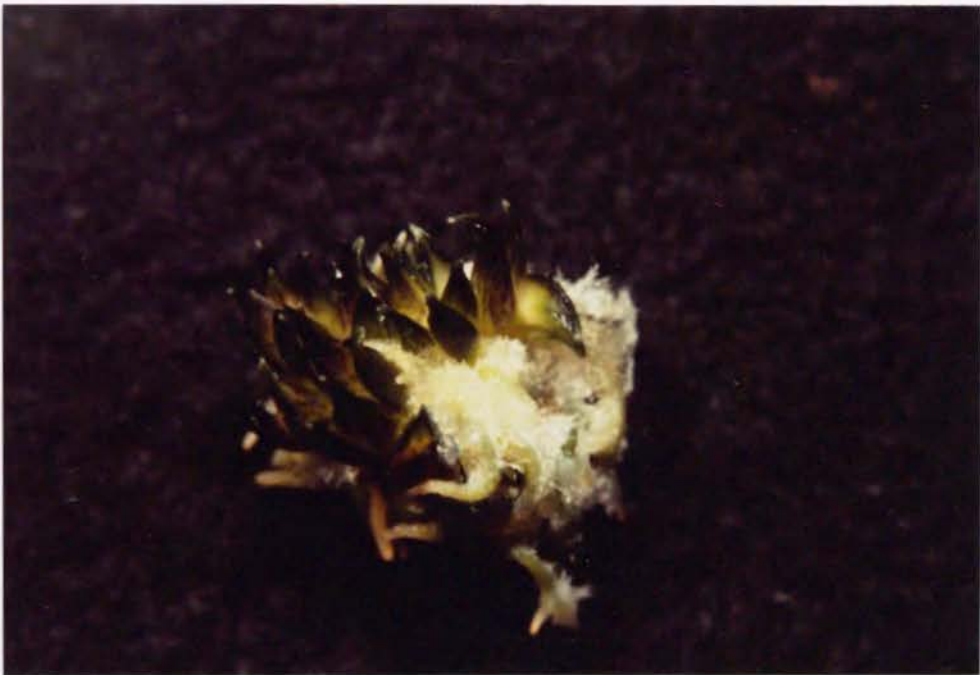
Species and variety	No. of bulblets per scale					Total	No. of harvested scales per scale				Size of largest bulblet		FW of roots per scale (mg)
	~ ≥ 300mg (FW)	300 > ~ ≥ 100mg (FW)	100 > ~ ≥ 50mg (FW)	50 > ~ ≥ 30mg (FW)			~ ≥ 20mg (FW)	20 > ~ ≥ 10mg (FW)	10 > ~ ≥ 5mg (FW)	Total	Diameter (mm)	Height (mm)	
<i>L. japonicum</i>	0	0.8	2.8	1.8	5.4	1.8	9.4	5.2	16.4	5.0 × 3.8	9.8	195.0	
<i>L. rubeilum</i>	0	0	1.0	3.5	4.5	0.7	1.2	1.5	3.4	4.5 × 2.8	7.6	93.3	
<i>L. brownii</i>	0	0	0.5	1.2	1.7	0.9	1.0	0.5	2.4	4.3 × 3.1	6.8	100.8	
<i>L. nobilissimum</i>	0.5	2.3	1.5	1.2	5.5	6.3	4.0	0.5	10.8	7.3 × 7.1	9.0	350.0	
<i>L. × formolongi</i>	0.4	1.8	1.0	2.3	5.5	6.2	5.7	0.6	12.5	7.3 × 7.0	9.1	567.0	
<i>L. auratum</i>	0.2	2.4	2.4	2.6	7.6	2.5	5.0	3.2	10.7	6.1 × 4.6	7.5	355.0	
<i>L. hansonii</i>	0.8	0.8	0.4	1.4	3.4	3.0	1.0	0	4.0	6.1 × 4.7	11.0	263.0	
<i>L. concolor</i>	1.4	2.4	0	1.4	5.2	7.2	1.4	0.6	9.2	7.9 × 5.4	12.8	180.4	
<i>L. × elegans</i>													
Enchantment	0	0	1.5	2.5	4.0	0	2.0	2.5	4.5	4.3 × 2.8	6.1	35.0	
Kinsen	0	1.0	2.0	2.0	5.0	1.5	1.5	4.0	7.0	6.0 × 3.0	7.5	510.0	
Ubatama	0	0.3	0.8	2.3	4.4	0	0.8	0.8	1.6	2.9 × 1.9	4.0	8.0	

For culture medium: See Table 20.

For culturing conditions and materials: See Fig.20.



(A) L. auratum after culturing for 73 days.



(B) L. japonicum after culturing for 73 days.

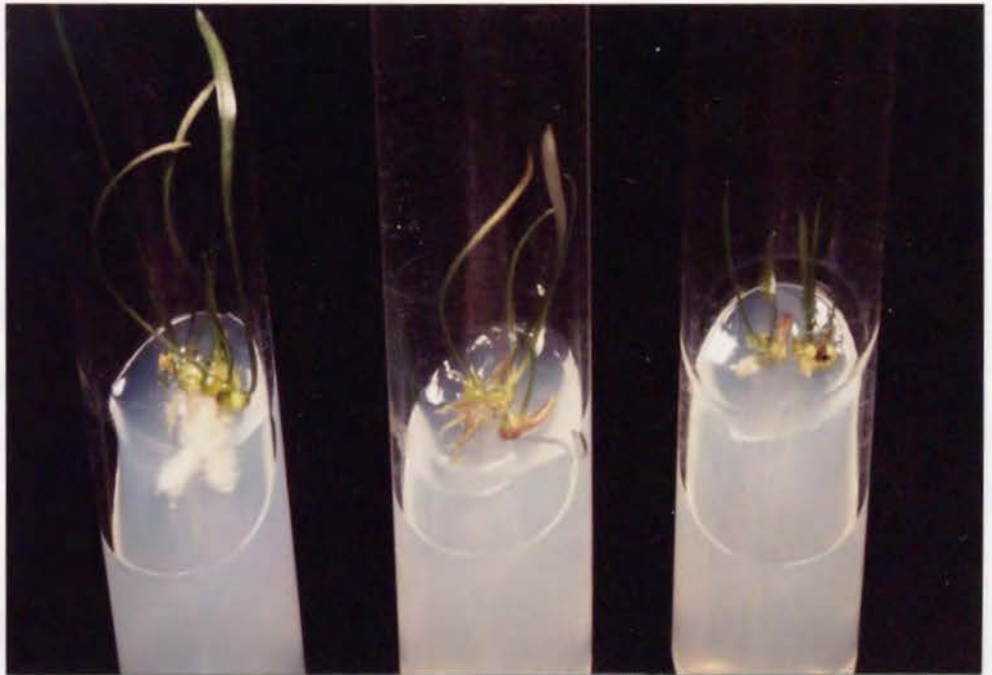
Fig. 24. Differentiation and growth of plantlets from bulb scales of several lilies cultured in vitro.

For culture medium: See Table 20.

For culturing conditions and materials: See Fig. 20.



(C) *L. xformolongi* after culturing for 75 days.



(D) *L. xelegans* 'Enchantment' after culturing for 70 days.



って形成される子球から採取できた10 mg 以上のりん片の枚数は、ササユリ、タモトユリ、シンテッポウユリ、ヤマユリ、トサヒメユリで、それぞれ11.2、10.3、11.9、7.5、8.6枚であった。なお、ササユリの場合、5～6 mgの小さなりん片でも10～20 mg のりん片と同様に子球を形成することができることを確認している。したがって、ササユリ球根の増殖のための培養材料となるりん片を、5mg 以上のものとすれば、その数は1りん片当たり16.4枚となった(第24図(B))。また、シンテッポウユリ、トサヒメユリの子球は葉を盛んに伸長する傾向を示した(第24図(C))。ササユリ、オトメユリおよびハカタユリでは、主に100 mg 以下の小さな子球が形成され、葉の伸長はみられなかった。また、ハカタユリでは、りん片から直接形成された子球は小さく、分化数も1りん片当たり1.7個と少なかったが、その茎頂組織や第2節における子球の培養の場合と同様、長期間培養を続けると、分化した根の周囲にカルス様の組織が増殖し、その組織から多数の小球根が分化した。ミッドセンチュリーハイブリッド系の3品種については、それぞれ1りん片当たり4～5個の子球が形成された。‘金扇’の場合、子球の肥大は良好であり、100 mg 以上に肥大したのもも得られたが、‘エンチャントメント’と‘烏羽玉’では、形成された子球はあまり肥大せず、したがって、それらの子球から採取できる新りん片は小さく、その枚数も少なかった(第24図(D))。

## 第2節 子球培養

前節では、りん片培養によって子球を効率よく分化・増殖するための条件を検討した。分化した子球の肥大を、さらに促進することができれば、その子球から、増殖材料として利用可能なりん片を多数採取でき、ウイルスフリー球根の無菌的な生産効率が一層向上することになる。また、土壌へ移植した後の成球までの養成期間を短縮できる可能性もある。一方、植物の組織培養においては、幼植物体の分化に適した条件と、その生長に適した条件とが異なる場合もしばしばみられるところである(97)。

本節では、無菌的に増殖した球根の外側りん片を取り除いた後に残る中心の小さな球根状の部位の培養(以下、子球培養とした)において、十分に肥大した球根が得られる条件を明らかにするために、以下の実験を行なった。最初に、子球培養に使用する培地について、添加するショ糖濃度および生長調節物質としてNAAの影響を検討し、次に、培養環境として温度の影響を検討した。さらに、その結果、子球の生長を促進した培地中のショ糖濃度、NAA濃度および培養温度を基に培養条件を設定し、数種類のユリの子球培養を行ない、その子球の生育を調査した。

### 第1項 子球の生育に及ぼす培地中のNAAの影響

## 材料および方法

実験には、テッポウユリ‘ジョージア’とカノコユリ‘内田かのご’を供試した。

培養材料となる子球は、以下のような方法で得た。第1節第1項と同様にして、茎頂組織の培養から開始し、りん片培養によって増殖・維持した無菌小球根の外側りん片を、滅菌したメスとピンセットで取り除き、分離できずに残った小さなりん葉を有する径 1~2mm の球根状の子球中心部位を、本実験の子球培養に供する子球として使用した。この子球の基部を、直径25mmの試験管に分注した20mlの培地に埋め込むように置床して培養を行なった。

培地には、主要塩類および鉄源としてMSの処方、微量要素および有機物質としてRNの処方を用い、ショ糖を $40\text{g}\cdot\text{liter}^{-1}$ 、寒天を $8\text{g}\cdot\text{liter}^{-1}$ 、生長調節物質としてNAAを0、0.01、0.1  $\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$ の濃度になるように添加した後、pH 5.7 に調整したものを使用した。培地の滅菌は、 $1.2\text{ kg}/\text{cm}^2 \cdot 120^\circ\text{C} \cdot 12$  時間の条件で行なった。培養条件は、昼光色蛍光灯による照明装置を備えつけた恒温器内で、温度 $23\sim 24^\circ\text{C}$ 、照度1,500 lx、連続照明とした。

## 結果

テッポウユリ子球の培養70日後の生育を第25図(A)と第23表に示した。NAAを除いた培地上では、子球からの発根数が少なく、また、その子球の生体重は100 mg程度であった。子球の肥大を含めた葉条の生育および根の分化・伸長は、培地中にNAAを添加することによって促進され、 $0.1\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$ の濃度では、葉条の生体重が1,000 mg以上になった。また、この場合、葉状りん片の上端部を除いて測定した球根部位だけの生体重も、500mg程度にまで増加した。なお、別のテッポウユリ‘ジョージア’の子球培養に関する実験において、 $1.0\text{ mg}\cdot\text{liter}^{-1}$ の培地濃度でも培養したが、発根が非常に旺盛となるため、子球の生育は、むしろ抑制される傾向を示した。

カノコユリ‘内田かのご’では、NAA無添加の培地でも子球からの根の分化と伸長が認められ、子球の肥大も良好であった。培地へのNAA添加によって、さらに子球の肥大が促進され、 $0.1\text{ mg}\cdot\text{liter}^{-1}$ を添加した培地で70日間培養した場合、824 mgの子球が得られた(第25図(B))。

## 第2項 子球の生育に及ぼす培地中のショ糖濃度の影響

### 材料および方法

実験には、テッポウユリ‘ジョージア’およびカノコユリ‘内田かのご’を供試し、培養材料となる子球の採取と培地への置床、培養容器、培地量、培養中の照明・温度などの培養条件は前項に準じた。

培地には、主要塩類組成および鉄源としてMSの処方、微量要素および有機物質としてRNの処方を加え、生長調節物質としてNAAを $0.1\text{ mg}\cdot\text{liter}^{-1}$ 、寒天を $8\text{g}\cdot\text{liter}^{-1}$ およびショ糖を所定の濃度になるように

添加し、pHを5.7に調整したものをを用い、前項と同様の条件でオートクレーブ滅菌した。

検討するシヨ糖濃度は、カノコユリ‘内田かのか’では20、40、60、80、100、120、140 g·liter<sup>-1</sup>、テッポウユリ‘ジョージア’では20、40、60、80、100 g·liter<sup>-1</sup>とした。

### 結果

カノコユリ子球の培養70日後の生育を第24表と第26図に示した。培地中のシヨ糖濃度が高くなるにつれて、子球の肥大は良好となった。子球の生体重は、20g·liter<sup>-1</sup>のシヨ糖濃度で培養したときの465 mgに対して、100g·liter<sup>-1</sup>の濃度では1,450mgにまで増加していた。さらに、シヨ糖濃度を140g·liter<sup>-1</sup>まで高めて培養を試みた場合、子球の生体重は120g·liter<sup>-1</sup>の濃度で最大となった。また、シヨ糖濃度の増加にしたがって、子球からの葉の伸長が抑制され、60g·liter<sup>-1</sup>以上のシヨ糖濃度では、葉の伸長は全くみられなかった。なお、シヨ糖濃度40g·liter<sup>-1</sup>の場合でも、内径5cm、容積200mlのガラス容器を用い、培地量を80mlに増加して長期間(190日間)培養を続けると、子球の生育・肥大がさらに進み、球重4,860mg、球径2.0×1.8cm、球周7.5cmの大きな子球が得られた(第27図)。

テッポウユリの子球培養の場合、シヨ糖濃度20～100 g·liter<sup>-1</sup>の範囲で培養した結果、60g·liter<sup>-1</sup>の濃度が子球の肥大に最適であることが分かった。シヨ糖濃度をさらに高めて培養すると、葉の伸長が抑制されると同時に根の分化・生育が非常に旺盛となった。このため、100g·liter<sup>-1</sup>では、子球の肥大がむしろ抑制された。

## 第3項 子球の生育に及ぼす培養温度の影響

### 材料および方法

実験には、テッポウユリ‘ジョージア’およびカノコユリ‘内田かのか’を供試し、培養材料となる子球の採取と培地への置床、培地の滅菌、培養容器、培地量、培養中の照明などは第1項に準じた。

培地には、主要塩類組成および鉄源としてMSの処方、微量元素および有機物質としてRNの処方に加え、生長調節物質としてNAAを0.1 mg·liter<sup>-1</sup>、シヨ糖を40 g·liter<sup>-1</sup>、寒天を8g·liter<sup>-1</sup>の濃度になるように添加し、pHを5.7に調整したものをを用いた。

恒温器の設定温度を23～24℃および27～28℃とし、培養温度が子球の生育・肥大に及ぼす影響を検討した。

### 結果

テッポウユリ子球の培養70日後の生育を第25表と第28図に示した。培養温度23～24℃では、子球からの根の分化・生育が良好であると同時に、葉の伸長が盛んになった。一方、27～28℃では、根の生育がやや劣り、また、葉の伸長は認められなかった。23～24℃で培養して得られた葉条から、伸長した葉を除いた



NAA 0  
(mg·liter<sup>-1</sup>)

0.01

0.1

(A) *L. longiflorum* 'Georgia'



NAA 0  
(mg·liter<sup>-1</sup>)

0.01

0.1

(B) *L. speciosum* 'Uchida'

Fig. 25. Influence of NAA concentration in the medium on growth of bulblets of *L. longiflorum* 'Georgia' (A) and *L. speciosum* 'Uchida' (B) cultured *in vitro*. (Culture period : 70 days )

For culturing conditions, medium and materials: See Table 23.

Table 23. Influence of NAA concentration in the medium on growth of bulblet of *L. longiflorum* 'Georgia' cultured *in vitro*. (Culture period: 70days)

NAA (mg·liter <sup>-1</sup> )	FW of shoot [bulblet] <sup>∗</sup> (mg)	Size of bulblet (mm)		FW of roots (mg)
		Diameter	Height	
0	98.6 [ 74.3]	6.0 × 3.1	6.2	23.6
0.01	774.6 [344.3]	9.1 × 6.2	9.3	864.3
0.1	1127.1 [492.9]	12.0 × 9.0	12.1	3021.4

Culture medium: MS's macro-elements and Fe, RN's micro-elements and organics, 40g·liter<sup>-1</sup>sucrose, 8g·liter<sup>-1</sup>agar, pH5.7, 0 ~0.1 mg·liter<sup>-1</sup>NAA .  
 Culturing conditions: 23 ~24°C, 1,500 lux (continuous light).

Culture materials: The outer scales of bulblets, regenerated through shoot-tip culture, were removed and then their inner parts ,which had a diameter of 1 ~2 mm and were called by the name bulblet , were cultured *in vitro*.

<sup>∗</sup> Prior to weighing the bulblets, any existing leaves and roots were removed.

Table 24. Influence of sucrose concentration in the medium on growth of bulblet of *L. speciosum* 'Uchida' cultured *in vitro*. (Culture period: 70days)

Exp. no.	Sucrose (g·liter <sup>-1</sup> )	FW of shoot [bulblet] <sup>∗</sup> (mg)	Size of bulblet (mm)		FW of root (mg)
			Diameter	Height	
1	20	545.7 [ 465.0]	9.9 × 7.1	13.2	290.0
	40	520.0 [ 520.0]	11.1 × 8.2	14.3	1405.7
	60	678.6 [ 650.5]	11.0 × 8.0	15.1	1900.0
	80	1038.6 [1038.6]	13.2 × 9.8	18.2	2127.1
	100	1484.3 [1450.0]	13.2 × 11.1	22.0	2152.9
2	40	730.0 [ 682.5]	10.0 × 6.8	15.9	2400.7
	100	1163.3 [1100.0]	12.1 × 10.0	19.0	2105.3
	120	1360.5 [1360.5]	12.1 × 10.2	22.1	1310.0
	140	1231.7 [1231.7]	10.0 × 8.9	22.0	911.7

Culture medium: MS's macro-elements and Fe, RN's micro-elements and organics, 8g·liter<sup>-1</sup> agar, pH5.7, 0.1 mg·liter<sup>-1</sup>NAA, 20~100g·liter<sup>-1</sup>sucrose for Exp.1 and 40~140g·liter<sup>-1</sup>sucrose for Exp 2.

For culturing conditions, materials and <sup>∗</sup> : See Table 23.



Fig.26. Influence of sucrose concentration in the medium on growth of bulblets of *L. speciosum* 'Uchida' cultured *in vitro*. ( Culture period : 70 days )

For culturing conditions, medium and materials: See Table 24.



Fig.27. Growth of a bulblet of *L. speciosum* 'Uchida' cultured *in vitro* for 190 days.

For culturing conditions, medium and materials: The same as in Table 24 except that the volume of the medium and the culture vessel was 80 ml and 200 ml, respectively.

Table 25. Influence of temperature on growth of bulblet of *L. longiflorum* 'Georgia' cultured *in vitro*. (Culture period: 70days)

Temperature (°C)	FW of shoot [bulblet] <sup>∇</sup> (mg)	Size of bulblet (mm)		FW of roots (mg)
		Diameter	Height	
23~24	780.0 [ 476.7]	12.0× 8.9	11.2	2495.0
27~28	790.0 [ 790.0]	14.1×12.0	12.2	1530.0

Culture medium: MS's macro-elements and Fe, RN's micro-elements and organics, 8g·liter<sup>-1</sup>agar, 40g·liter<sup>-1</sup>sucrose, 0.1 mg·liter<sup>-1</sup>NAA, pH5.7.

Culturing conditions and materials: The same as in Table 23 except for changing the temperature.

For <sup>∇</sup> : See Table 23.



Temperature 23~24  
(°C)

27~28

Fig.28. Influence of temperature on growth of bulblets of *L. longiflorum* 'Georgia' cultured *in vitro*.

For culturing conditions, medium and materials: See Table 25.

球根部位の生体重は 477mg であった。これに対して、葉を伸長せず子球のみが肥大した27~28℃で培養して得た球根の生体重は 790mgであり、球根の肥大が、高温で一層良好になることが分かった。

カノコユリで行なった同様の実験では、テッポウユリの場合と同じく、27~28℃で培養した子球では、その肥大が23~24℃で培養したものより良好であり、また、葉の伸長は抑制された。一方、培養温度23~24℃においては、子球から葉が伸長したが、その枚数は、テッポウユリ子球の場合と比較すると少なかった。

#### 第4項 設定培養条件の数種類のユリへの適用

第1項~第3項において、テッポウユリおよびカノコユリの子球の生育を促進した NAAとショ糖の濃度および培養温度に設定した条件で数種類のユリの子球培養を行ない、その効果を調査した。

##### 材料および方法

実験には、ササユリ、オトメユリ、ハカタユリ、タモトユリ、マドンナリリー (*L. candidum* L.)、シンテッポウユリ、ヤマユリ、オニユリ (*L. lancifolium* Thunb.)、タケシマユリ、トサヒメユリおよびアジアチックハイブリッド群のミッドセンチュリーハイブリッド系品種である‘エンチャントメント’、‘金扇’と‘烏羽玉’を供試した。

培養材料となる子球の採取と培地への置床、培地の滅菌、培養容器、培地量、培養中の照明・温度などの培養条件は第1項に準じた。

培地には、主要塩類組成および鉄源としてMSの処方、微量元素および有機物質としてRNの処方に加え、生長調節物質としてNAAを  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ 、ショ糖を  $40 \text{ g} \cdot \text{liter}^{-1}$ 、寒天を  $8 \text{ g} \cdot \text{liter}^{-1}$ の濃度になるように添加し、pHを5.7に調整したものをを用いた。

##### 結果

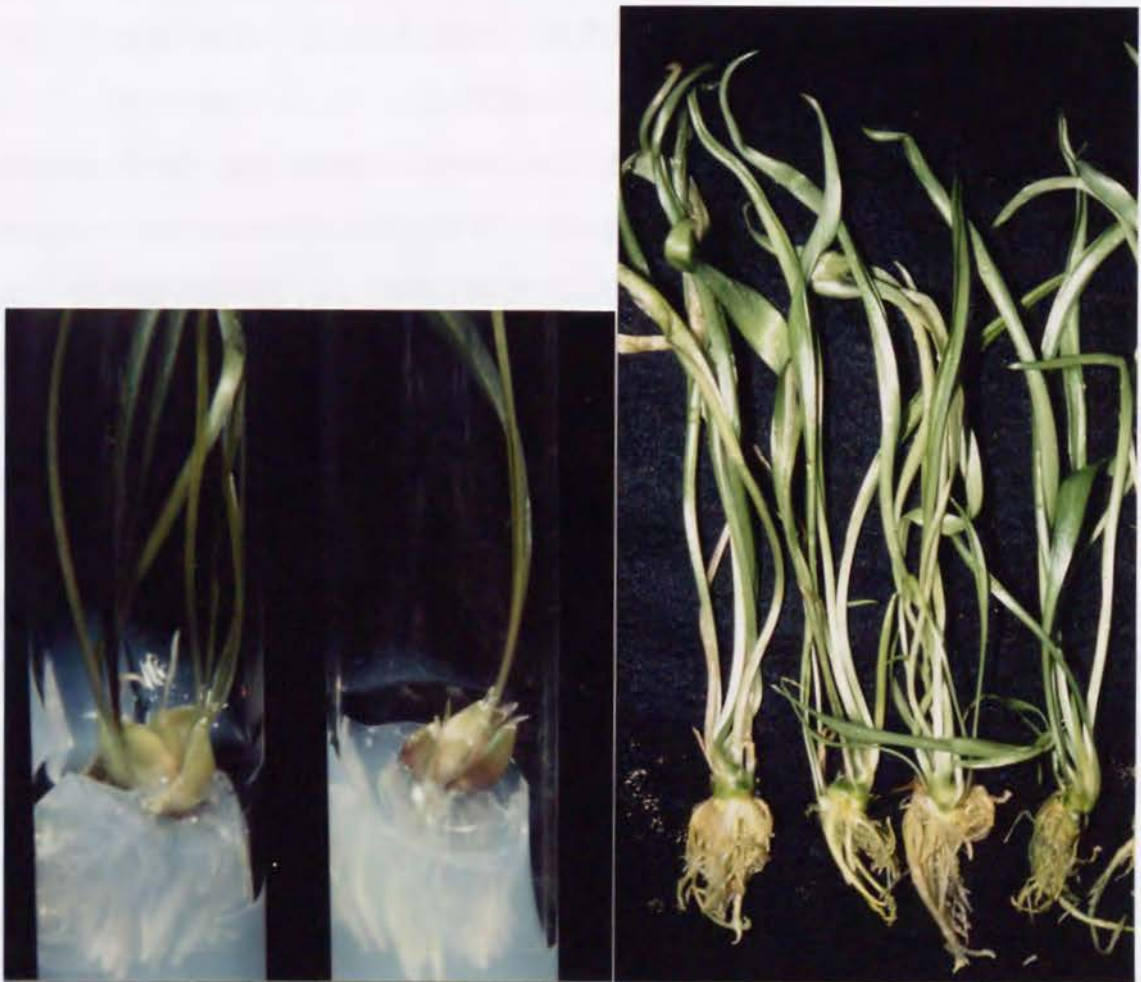
供試したユリ類の子球培養3か月後の結果を第26表に示した。ミッドセンチュリーハイブリッド系品種の子球の生育は、やや遅い傾向があり、特に‘烏羽玉’の子球は、発根および根の伸長が不良であった。このため、培養3か月後に得られた‘烏羽玉’の子球の球径は  $5.0 \times 3.7 \text{ mm}$  であり、他のユリ類での培養結果と比較して小さかった。その他のユリ類の子球の肥大は良好であり、平均球径は7.6mm以上、平均球周は23mm以上になった。特に、マドンナリリーとトサヒメユリの子球は生育が旺盛で、それぞれ球径  $12.0 \times 9.1 \text{ mm}$ 、球周43mmの球根と球径  $11.1 \times 9.3 \text{ mm}$ 、球周43mmの球根が得られた(第29図(A))。シンテッポウユリの子球の生育も良好であり、平均15cmにまで伸長した多数の葉を有し、その葉条生体重はおおよそ4,000mgになった。また、伸長した葉と根を除いた球根自体の生体重は550mgであった(第29図(B))。タケシマユリの子球から伸長した葉は幅が広く厚みがあり、これらの葉は鉢上げの際にも枯死することが



Table 26. Growth of bulblets of several lilies cultured in vitro. ( Culture period: 95 days)

Species and variety	Size of bulblet (mm)			No. of leaves per bulblet	FW of shoot and roots (mg)
	Diameter	Height	Circumference		
<i>L. japonicum</i>	7.6 × 6.5	11.9	25.0	0	578.9
<i>L. rubellum</i>	8.3 × 5.4	12.7	23.0	0	722.5
<i>L. brownii</i>	10.5 × 7.8	9.2	30.7	0.3	1228.3
<i>L. nobilissimum</i>	11.1 × 9.1	12.5	36.9	0.2	1850.0
<i>L. candidum</i>	12.0 × 9.1	13.0	43.0	4.1	3580.5
<i>L. × formolongi</i>	11.0 × 9.3	11.1	33.2	7.6	4078.0
<i>L. auratum</i>	10.3 × 9.0	11.6	33.2	2.1	1234.2
<i>L. lancifolium</i>	9.9 × 6.6	10.4	30.3	0.3	957.5
<i>L. hansonii</i>	11.2 × 6.5	15.5	32.6	1.3	1917.0
<i>L. concolor</i>	11.1 × 9.3	14.5	42.8	6.6	3086.1
<i>L. × elegans</i>					
'Enchantment'	7.6 × 6.3	7.0	24.8	2.8	774.2
'Kinsen'	8.8 × 6.0	12.0	27.2	0.2	673.3
'Ubatama'	5.0 × 3.7	5.6	not measured	3.4	128.8

Culturing conditions, medium and materials: The same as in Table 23 except for temperature (23~24°C).



(A) *L. concolor*

(B) *L. × formolongi*

Fig. 29. Growth of bulblets cultured in vitro. ( Culture period : 95 days )

For culturing conditions, medium and materials: See Table 26.

なかった。本実験に供試したササユリとオトメユリでは、子球からの葉の伸長がみられなかった。

### 第3節 葉片培養および茎の節培養

全葉、葉切片あるいは葉柄をつけた葉を親株から切り離して挿し床に挿し、芽と根を分化させ新しい個体をつくる葉挿しによる繁殖方法は、古くから多数の植物種で利用されてきている。また、組織培養においても、葉片の培養例が報告されている(13, 14, 17, 20, 31, 66, 77, 78, 239)。ユリ球根のりん片は葉の肥大したものであることから、りん片挿しは葉挿しの一種であり、in vitroにおけるりん片培養は葉片培養の一種ともいえる。したがって、培養の材料として、ユリの葉片自体を利用することも考えられる(129)。

一方、茎の節部位には節間の伸長をひきおこす *intercalary meristem* (節間分裂組織) が存在し、特に単子葉植物でその発達が認められている。この分裂活性が高い *intercalary meristem* を利用して不定芽を形成させる節培養の例も報告されている(58, 59, 60)。ユリの場合、テッポウユリ、スカシユリ、カノコユリなど多くの種で、地中にある茎の節に形成される木子と称する小球根も球根増殖に利用している。また、オニユリのように、地上の茎の葉腋に珠芽が形成される種もある。一方、テッポウユリでは、挿し穂を用いた通常の挿し木繁殖の可能性も報告されている(164)。このようなことから、茎の節部位を球根増殖のための培養材料として利用することも、試みる価値がある。

本節では、不定芽を形成・肥大させて球根を得るための培養材料として、in vitroで無菌的に増殖した幼植物の葉身部位と茎の節部位を用いた場合について、その子球の分化・増殖効率を検討した。

#### 第1項 葉片培養

##### 材料および方法

実験には、テッポウユリ 'ジョージア' を用いた。

培養材料となる葉片は、以下のような方法で得た。第1節第1項と同様にして、茎頂組織の培養から開始し、りん片培養によって増殖・維持した無菌幼植物を用い、その葉状りん片の肥大基部を切除した。切除後に残る5~7cmの長さに伸長した葉身下部から約5mm角の葉切片を切り採り、培養に供した。葉切片の置床は、直径25mmの試験管に分注した20mlの培地表面に、葉身の背面側を接するようにならせた。

培地には、主要塩類および鉄源としてMSの処方、微量要素および有機物質としてRNの処方を用い、NAAを  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ 、ショ糖を  $40 \text{ g} \cdot \text{liter}^{-1}$ 、寒天を  $8 \text{ g} \cdot \text{liter}^{-1}$  の濃度になるように添加した後、pH 5.7に調整したものを使用した。培地の滅菌は、 $1.2 \text{ kg/cm}^2 \cdot 120^\circ\text{C} \cdot 12$ 分間の条件で行なった。培養条件は、昼光色蛍光灯による照明装置を備えつけた恒温器内で、温度23~24°C、照度1,500 lx、連続照明と

した。

## 結果

培養60日目の観察では、置床した葉切片は全て生存しており、その80%が子球を、90%が根を分化し、第30図に示したような幼植物体を得られた。また、葉切片1枚当たりの子球分化数は平均1.4個であった。なお、本項の実験に先立ち、葉身部の先端側と基部側を培養して、その器官分化などに対する影響を予備的に調査した試験では、先端側から作成した葉切片では褐変するものがあり、また、切片からの子球の分化は、先端側切片よりも基部側の切片でやや多くみられる傾向があることも分かった。

## 第2項 節培養

### 材料および方法

実験には、テッポウユリ 'ジョージア' を用いた。

培養材料となる節切片は、以下のような方法で得た。前項と同様に、茎頂組織の培養から開始し、りん片培養によって増殖・維持した無菌幼植物の子球を、生長調節物質として、NAA に替えてカイネチンを添加した継代用培地に移植し、10℃で40日間、その後23℃で30日間培養した。カイネチン5 および10 mg·liter<sup>-1</sup> の濃度の培地で培養した場合、抽台した茎の平均節数は共に4.7であったが、5mg·liter<sup>-1</sup> の方が茎の伸長が良く、節を含む茎切片を作成し易いので(第27表、第31図)、この培地で得られた茎を節培養の培養材料とした。

培地には、生長調節物質無添加およびNAAに替えてBA(0.1、1.0、2.0、5.0 mg·liter<sup>-1</sup>)を所定濃度で添加した以外、前項と同様のものを用い、培地の滅菌、培養容器、培地量、培養中の照明・温度などの培養条件も前項に準じた。節切片の置床は、抽台した茎の節の上下にそれぞれ3~5 mmの長さの節間部を残すように切片を調整した後、その基部側を培地に埋め込むようにして行なった。

## 結果

培養60日後の結果を第28表と第32図に示した。BA 1.0mg·liter<sup>-1</sup>以上の濃度では、節の葉腋部位だけでなく、切片の基部全体が肥大し、多数の不定芽が分化した。特に、2.0mg·liter<sup>-1</sup> 添加培地上では、節切片当たり8個以上の不定芽を得られた(第33図)。これらの「不定芽塊」を切断・分割し、BA濃度を0.1 mg·liter<sup>-1</sup>とした培地へ継代すると、さらに「不定芽塊」を増殖することができた。また、生長調節物質無添加あるいはBAに替えてNAAを0.1mg·liter<sup>-1</sup>の濃度で添加した培地へ「不定芽塊」切片を移植した場合には、発根や不定芽からの葉の伸長がみられ、葉の基部の肥大・りん片化による球根形成も認められた。



Fig.30. Differentiation and growth of plantlets in the culture of leaf segments of *L. longiflorum* 'Georgia'.

Culture medium: MS's macro-elements and Fe, RN's micro-elements and organics,  $40\text{g}\cdot\text{liter}^{-1}$  sucrose,  $8\text{g}\cdot\text{liter}^{-1}$  agar,  $0.1\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$  NAA and pH5.7.

Culturing conditions:  $23\text{ }^{\circ}\text{C}$ , continuous light (1,500 lx).

Culture materials: Apical foliar parts of foliage scales taken from plantlets regenerated through scale culture were cut into several segments ( $5\text{mm}\times 5\text{mm}$ ). The abaxial side of the explant was placed in contact with 20ml of the medium in a test tube (25mm diam).

Table 27. Influence of kinetin concentration in the medium on bolting of chilled bulblets of *L. longiflorum* 'Georgia' cultured *in vitro*. (Culture period : 70 days)

Kinetin (mg·liter <sup>-1</sup> )	Bolting (%)	Stem length (cm)	No. of node
0	0	—	—
1	80	9.8	3.0
5	100	5.1	4.7
10	100	3.9	4.7

Culture medium: The same as in Fig.30 except for substituting Kinetin for NAA.

Culturing conditions and materials: Bulblets with a diameter of 5-7mm, differentiated through *in vitro* scale culture, were cultured *in vitro* at 10 °C for 40 days, and then at 23°C in continuous light of 1,500 lux for 33 days.

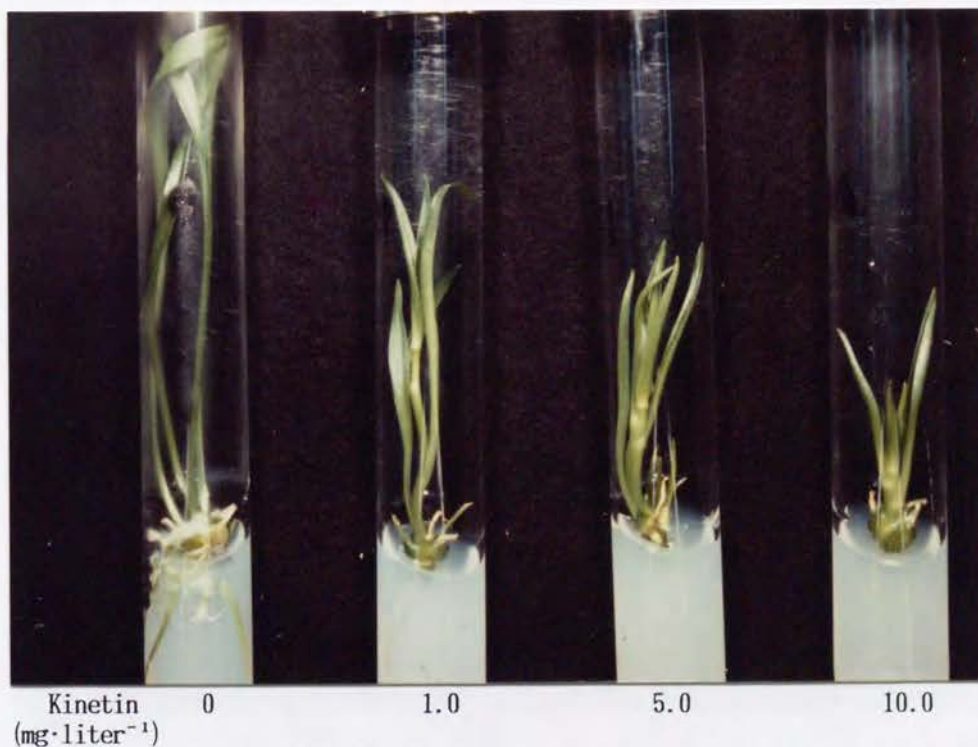


Fig.31. Influence of kinetin in the medium on bolting of chilled bulblets of *L. longiflorum* 'Georgia' cultured *in vitro*. (Culture period : 33 days )

For culturing conditions, medium and materials: See Table 27.

Table 28. Influence of BA concentration in the medium on growth of stem-node segment of *L. longiflorum* 'Georgia'. (Culture period : 60 days)

BA (mg·liter <sup>-1</sup> )	% of segments with differentiated bulblets [adventitious buds] <sup>z</sup>	No. of bulblets [adventitious buds] <sup>z</sup> per segment	% of segments with roots
0	90.0	1.3	80.0
0.1	100.0	2.5	40.0
1.0	[100.0]	[6.0]	10.0
2.0	[100.0]	[>8.0]	0.0
5.0	[100.0]	[5.0]	0.0

Culturing conditions and medium: The same as in Fig.30 except for substituting BA for NAA.  
 Culture materials: Elongated stems of bulblets on the medium containing 5mg·liter<sup>-1</sup> kinetin (Table 27) were cut into stem-node segments (3~5mm long).

<sup>z</sup> Numbers in brackets indicate the differentiation-percent and number of adventitious buds, respectively.

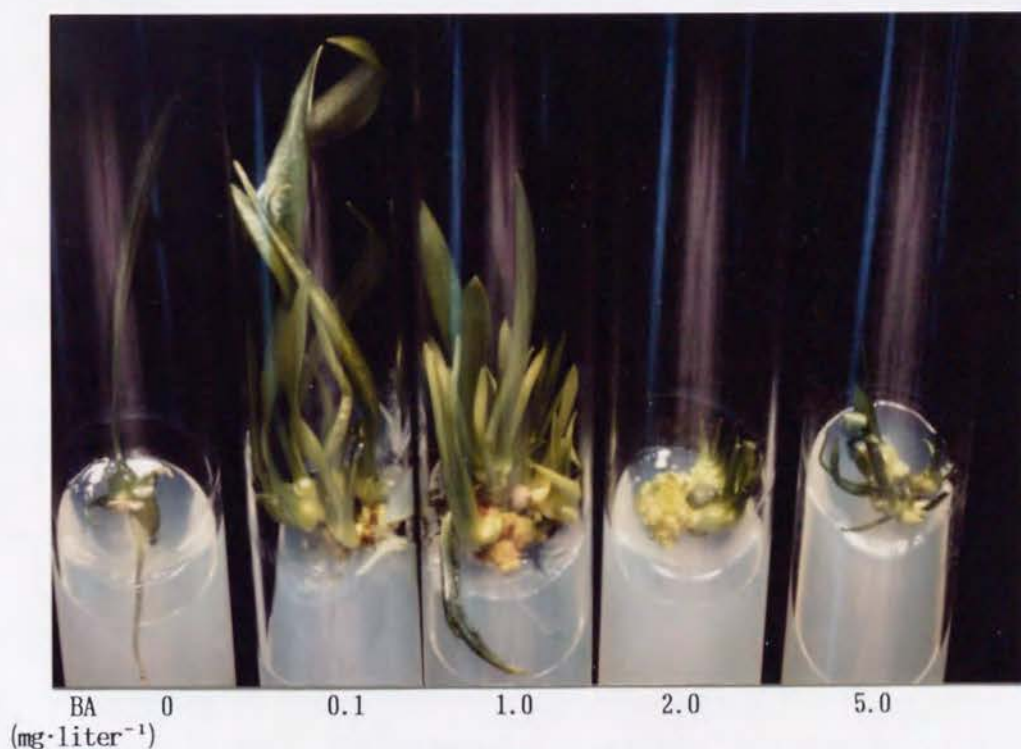


Fig.32. Influence of BA concentration in the medium on differentiation and growth of adventitious buds and plantlets in the culture of stem-node segments of *L. longiflorum* 'Georgia' cultured in vitro. (Culture period : 60 days )

For culturing conditions, medium and materials: See Table 28.



Fig.33. 'Multiple adventitious bud' formation from stem-node segments of L. longiflorum 'Georgia' cultured on the medium containing  $2.0 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$  BA. (Culture period : 40 days )

For culturing conditions, medium and materials: See Table 28.

#### 第4節 培養球根の栽培

組織培養を利用した増殖方法が実用化しているキク、カーネーション、イチゴなどの園芸植物では、培養で得られた幼植物の土壤移植後の生育調査も詳しく行なわれている。キクでは、森田ら(113)が数品種の茎頂組織培養株を2~4作し、その茎の太さ、柳芽発生率、切り花本数、上物率などについて在来株のものと詳しく比較調査している。カーネーションでは、武田(206)が、茎頂培養によって得られた幼苗の鉢上げ時期や鉢上げ後の生育特性を調査し、無病苗育成の実用化を試みている。ユリ培養球根に関しても、その休眠との関連で、培養温度や培養終了後の低温処理が土壤移植後の出葉に及ぼす影響について、いくつかの報告がみられる(2, 53, 131, 181, 182, 183, 184)。また、土壤へ移植した培養球根の生育・肥大については、テッポウユリ(137, 197)、シンテッポウユリ(163)、ヤマユリ(141)、オリエンタルハイブリッド系品種(65)、スカシユリ(7)などで報告がみられる。しかし、その開花までの生育あるいは球根収量などを考慮して調査したものは少ない(53, 137, 141)。第1章および本章で確立した寒天培養によるユリ球根の無菌増殖技術を、さらに、実際の栽培現場に適用していくためには、培養で得られた球根の栽培試験を行ない、その生育特性を明らかにする必要がある。

本節では、茎頂組織の培養が再生植物の鉢上げ後の生育に及ぼす効果と、実用的なユリ球根の養成・生産への本培養技術利用の可能性を明らかにするため、寒天培養によって増殖した球根の鉢栽培試験を行ない、その植物体の生育・開花および球根収量などについて調査した。

##### 材料および方法

本節の栽培試験には、テッポウユリ‘ジョージア’、カノコユリ‘内田かのこ’、シンテッポウユリおよびトサヒメユリを用い、第2節と同様にして行なった子球培養で得られた幼植物体を供試した。子球培養の培地および培養条件は第2節・第4項に準じた。また、茎頂培養由来株の生育調査では、市販のテッポウユリ‘ジョージア’球根を、圃場で二作して得た二作球根を対照として用いた。

子球培養で得られた幼植物体の根や伸長した葉を切除した後、重量を測定した球根を直径15cmの素焼き鉢あるいはポリポットに鉢上げした。栽培は寒冷沙を取り付けた無加温のビニルハウス内で行なった。なお、従来の球根栽培の場合と同様、以下の培養球根の栽培試験においても、培養球根から成球を養成するための第1回目、第2回目、第3回目の栽培および、その結果得られた球根を、それぞれ第一作目、第二作目、第三作目および一作球根、二作球根、三作球根とした。テッポウユリ、カノコユリ、トサヒメユリの第一作目の栽培試験では、1鉢に3球植えとし、他の栽培試験では全て1球植えとした。鉢の培養土としては、田土、ピートモス、パーミキュライト、川砂をそれぞれ等量に配合し、緩効性化成肥料(N,P,K=10,10,10)を $2\text{g}\cdot\text{liter}^{-1}$ の割合で加え、苦土石灰でpHを6.3に調整したものを用いた。出葉後、追肥



としてハイポネクス1,000 倍液を、月に2~3回(秋~冬)、2~4回(春~夏)与えた。また、適宜、殺虫剤としてスミチオン、マラソン、オルトラン、ディブテレックスなどを、殺菌剤としてベンレート、トップジンM、マンネブダイセン、ダコニール、オーソサイドなどを、それぞれローテーションしながら適宜に組合せて散布した。培養中の幼植物体あるいは鉢上げした培養球根の低温処理は、京都大学農学部環境条件制御温室の10℃室で42~45日間行なった。なお、ミスト噴霧やビーカーなどで鉢を覆って湿度を高めるなどの順化処理や夏季の遮光は行なわなかった。

適宜、出葉(葉状りん片の地上への伸長)や抽台の観察をするとともに、開花時に草丈(鉢土表面から(第1花の)小花梗先端まで)、茎径(最下位節間部の)、葉数(苞葉を除く)、最大葉長、最大葉幅、花数、花の大きさ(花径;相対する外花被片反転位置間の距離、花長;花被片の着生位置から反転位置までの距離)の調査を行なった。また、球根掘り上げ時には、球数、球形、球周、球重などについても調査した。

### 結果

テッポウユリ‘ジョージア’の子球(球重 400~600mg、球径 8~10mm)を9月に鉢上げし、栽培した結果を第29表に示した。テッポウユリの子球では、低温処理を行なわなくても出葉が速やかに認められ、開花時の草姿や掘り上げ時の球根収量についても、鉢上げ前に低温処理を行なった子球と比較して明確な差はみられなかった。すなわち、低温処理の有無に係わらず、鉢上げ後第一作目で、開花率92%、草丈28~29cm、花数1~2輪の株に生育した。また、およそ1年間の栽培を終了した翌年10月の球根掘り上げ時には、木子を含めて10g以下の球根が約4.5個および10g以上の球根が約3個得られ、各掘り上げ株から得られた最大球根の球周と球重の平均は、それぞれ11cmと30gを超えた(第34図)。これら一作球根の第二作目の生育も旺盛であり、球重30~40gの一作球根の場合、開花率100%、花数11.3輪、草丈87.8cm、葉数78.5枚、茎径1.4cmの株に生育した。さらに、購入球根を圃場で二作して得られた球根と茎頂組織の培養に由来する隔離栽培一作球根との生育を、同じ球根重量(15~20g)のもので比較したところ、それぞれ草丈(41.0cmに対して64.2cm)、葉数(38.1に対して48.3枚)、葉長(9.8cmに対して14.2cm)、茎径(0.8cmに対して1.1cm)、花数(1.9輪に対して3.6輪)、花径(10.3cmに対して12.1cm)などの全ての調査項目で、茎頂組織の培養に由来する球根の生育がまさった(第35図)。

カノユリ‘内田かのご’の子球(700~900mg)を鉢栽培した結果を第30表に示した。培養中に10℃、45日間の低温処理を行なった後、9月に鉢上げした子球は、速やかに抽台した。鉢上げ50日目の観察では、茎長が6cm、葉数は5.6枚となった(第36図)。無加温ビニルハウス内の夜温が0℃付近まで低下した1~2月には、これら抽台個体の普通葉は黄化・落葉した。しかし、3~4月の気温の上昇とともに、低温処理の有無に係わらず再び抽台がみられ、第30表に示したように、第2回目の抽台となった低温処理

子球では、鉢上げ後9ヶ月で約30%の株が開花した。第一作目の栽培終了後、掘り上げられた球根の大きさや数などの球根収量も低温処理を行なった子球では、無処理の子球を栽培して得られた収量を上回っており、20gに肥大した球根もあった(第37図)。また、無低温処理の鉢上げ第一作目の栽培によって得られた5~10gの一作球根を栽培した第二作目の結果を第31表に示した。草丈57cm、葉数22枚程度に生育した株が得られ、その開花率は38%であった。また、掘り上げた各株の最大球根の平均球重はおよそ33gとなった。

95日間の子球培養によって得られたシンテッポウユリの小球根(球重400~600mg、球径8~11mm)を5月5日に鉢上げし、栽培を行なった。第32表に示したように、48枚の葉を有する草丈80cm程度の株に生育し、8~9月には、全ての株で1~2輪の開花がみられた。

トサヒメユリの栽培試験では、子球培養で得られた球重1,000~2,000mgの球根を低温処理して、3月に鉢上げした。鉢上げ後、5~6枚のロゼット葉が出葉・展開し、11月に掘り上げたところ、球重8.3g、球周7.5cmに肥大した球根が得られた(第38図)。さらに、この球根を新しい鉢に移植して栽培することによって、翌年6月には、平均6.2輪の花数を有する草丈90.2cm、葉数67.3枚に生育した株が得られた(第33表、第39図)。また、3,000~5,000mgの子球(伸長した葉と根を含む重量、球径:1.0~1.5cm)を秋に鉢上げした場合、第一作目でも抽台がみられ、草丈58cm、花数2輪程度の株を得ることができた。

なお、本章第3節の実験で得られた各種ユリ類の培養球根を予備試験として鉢上げした結果、その活着率はほぼ100%であり、また、球径3mm程度の小さな子球でも十分に鉢上げできることも確認している。

## 第5節 考察

従来の栽培技術によるユリ球根の増殖に関しては、多数の報告があり、増殖を開始する時期(季節)、増殖材料として使用する植物体の部位、生長調節物質の利用、あるいはりん片切断処理などによって、子球の増殖率は変動することが認められている(57, 67, 68, 69, 240)。組織培養を利用してユリ球根を増殖する場合にも、露地の自然条件で栽培した植物体から得た培養材料では、その培養時期や培養切片に用いる部位の齢などによって、切片が子球を分化する能力や培地に添加した生長調節物質の効果が異なることが報告されている(154, 177)。一方、本研究におけるように、*in vitro*で形成された植物体を増殖に利用すれば、一定の生理状態の培養材料を得ることが可能であり、また、培養条件を最適化することによって高い増殖率を保持することもできるはずである。したがって、この*in vitro*での培養の増殖体系を実用化すれば、ユリ球根を安定的に供給する技術が開発されることになる。

本章の第1節と第3節では、無菌の培養植物体から採取したりん片、葉片および抽台した茎の節を培養

Table 29. Growth of bulblets of *L. longiflorum* 'Georgia' transplanted to soil from *in vitro* culture.

Treatment of bulblets	Avg growth of plants			No. of harvested bulbs per one potted bulblet			Weight and size of the largest bulb							
	Flowering (%)	No. of flowers	Plant ht (cm)	No. of leaves	No. of Stem diam (cm)	~ $\geq 20g$ (FW)	~ $\geq 10g$ (FW)	~ $\geq 5g$ (FW)	FW (g)	Diam (cm)	Ht (cm)	Circum (cm)		
Bulblets planted directly after end of culturing	92.0	1.5	28.0	20.0	0.6	0.8	2.3	2.0	2.8	33.3	3.7	3.0	3.6	11.1
Bulblets chilled at 4 °C for 45 days	92.0	1.5	28.9	20.8	0.6	1.7	1.0	1.8	2.7	37.2	4.2	3.3	3.7	11.7

Bulblets with fresh weight of 400-600mg were produced in an *in vitro* culture. Three bulblets were transplanted to each 15cm-diameter pots on 27 September, 1977. Prior to transplanting the bulblets into pots, any existing leaves and roots were removed. Growth and flowering of the plants was observed in June, 1978. Bulbs were harvested on 22 October, 1978.

Table 30. Growth of bulblets of *L. speciosum* 'Uchida' transplanted to soil from *in vitro* culture.

Treatment of bulblets	Avg growth of plants			No. of harvested bulbs per one potted bulblet			Weight and size of the largest bulb						
	Flowering (%)	No. of flowers	Plant ht (cm)	No. of leaves	No. of Stem diam (cm)	~ $\geq 10g$ (FW)	~ $\geq 5g$ (FW)	~ $\geq 5g$ (FW)	FW (g)	Diam (cm)	Ht (cm)	Circum (cm)	
Bulblets planted directly after end of culturing	0	0	12.8	7.3	0.3	0	1.5	1.8	8.1	2.3	1.6	3.1	6.4
Bulblets chilled at 4 °C for 45 days	28.6	1.0	42.2	12.5	0.5	1.5	1.7	1.8	20.4	3.0	2.2	3.8	8.5

Bulblets with fresh weight of 700-900mg were produced in an *in vitro* culture. Three bulblets were transplanted to each 15cm-diameter pots on 24 September, 1977. Prior to transplanting the bulblets in pots, any existing leaves and roots were removed. Growth and flowering of the plants was observed in June, 1978. Bulbs were harvested on 8 November, 1978.



Fig. 34. Bulbs harvested after first cultivation in pots of in vitro bulblets of L. longiflorum 'Georgia' .

For cultivation of in vitro bulblets: See Table 29.



Shoot-tip culture line

Field-grown line

Fig. 35. Comparison of growth and flowering between a shoot-tip culture line<sup>z</sup> and a field-grown line<sup>y</sup> of L. longiflorum 'Georgia' bulbs.

Bulbs with fresh weight of 15 ~20g were planted in 15cm-diameter pots on 10 October, 1979. Photograph was taken on 14 June, 1980.

<sup>z</sup> Bulbs harvested after first cultivation of bulblets derived from shoot-tip culture in a pipe house with cheese cloth.

<sup>y</sup> Bulbs harvested after second cultivation of marketed bulbs in the field.



Fig.36. Start of first bolting of chilled bulblets<sup>z</sup> of *L. speciosum* 'Uchida'.

<sup>z</sup> See Table 30.

Photograph was taken on 16 November, 1977.



Fig.37. Bulbs of *L. speciosum* 'Uchida' harvested after first cultivation in pots of the *in vitro* bulblets .

Chilled bulblets as described in Table 30 were transplanted to pots.

For cultivation of the bulblets: See Table 30.

Table 31. Growth of bulbs of *L. speciosum* 'Uchida' after their second transplantation to soil.

Flowering (%)	Avg growth of plants		No. of harvested bulbs per one potted bulblet		Weight and size of largest bulb						
	No. of flowers	Plant ht (cm)	No. of leaves	Stem diam (cm)	FW (g)	Ht (cm)	Circum (cm)				
38.1	1.0	57.1	22.3	0.5	1.2	0.0	2.8	32.9	3.8 × 3.2	4.0	11.9

Bulbs with fresh weight of 5 ~ 10 g derived from cultivation of non-chilled bulblets in the experiment described on Table 30 were replanted in 15cm-diameter pots on 15 September, 1977. Growth and flowering of the plants was observed in June, 1978. Bulbs were harvested on 9 November, 1978.

Table 32. Growth of bulblets of *L. X formolongi* transplanted to soil from in vitro culture.

No. of potted bulblets	Flowering (%)	No. of flowers	Flower size (cm)	Plant ht (cm)	No. of leaves	Stem diam (cm)	
40	100	1.5	10.1	16.3	79.9	48.4	0.7

Bulblets with fresh weight of 400-600mg were produced in an agar culture and transplanted to pots on 5 May, 1982. Growth and flowering of the plants was observed from 23 August ~ 22 September, 1982.

Table 33. Growth of bulblets of *L. concolor* transplanted to soil from in vitro culture.

No. of potted bulblets	Date of planting	Weight (g)	Diam (cm)	Ht (cm)	Circum (cm)	Date of replanting	Flowering time	Flowering (%)	No. of flowers	Diam of flowers (cm)	Plant ht (cm)	No. of leaves	Stem diam (cm)
18	15 March, 1981	8.3	2.2 × 1.9	2.8	7.5	8 Nov., 1981	6-17 June, 1982	100	6.2	7.2	90.2	67.3	0.5

Fresh weight and size of harvested bulbs were measured on 8 November, 1981. Growth and flowering of the plants was observed from 6 to 17 June, 1982.



Fig. 38. Bulbs of *L. concolor* harvested after first cultivation in pots of the *in vitro* bulblets.

Bulblets with fresh weight of 1,000~2,000 mg were produced in an agar culture. They were chilled at 4 °C for 45 days and then transplanted to pots on 15 March, 1981. After cultivation, bulbs were harvested on 3 November, 1981 and a photograph was taken on that day.



Fig. 39. Flowering of *in vitro* propagated bulblets of *L. concolor* following the second transplantation into pots.

Bulbs showed in fig. 38 were retransplanted into pots on 8 Nov., 1981. Photograph was taken on 12 June, 1982.

し、いずれの部位からも子球を再生できることを確認した。

りん片培養では、分化する子球の数およびその生育の促進に対して、生長調節物質としてオーキシン類であるNAAを培地中に添加することが有効であった。サイトカイニン類を添加した場合、これらは不定芽の分化に対して促進効果を示したが、その球根への生育を抑制する傾向があった。サイトカイニン類添加培地で分化した不定芽を球根にまで生育させるためには、生長調節物質を添加していない培地あるいは低濃度のNAAを添加した培地へ移植することが必要であった。培地に添加した生長調節物質が子球の分化と生長に及ぼすこのような効果は、第1章におけるカノコユリの茎頂組織の培養やTakayamaら(196)のヤマユリのりん片培養での報告と一致した。さらに、Hacket(45)のテッポウユリりん片培養の結果と同様に、オーキシンとサイトカイニンの濃度を適切に組み合わせて培地に添加することによって、不定芽の分化数を増加させることも可能であった。一方、従来のにん片繁殖では、りん片1枚から得られる子球の総数を増加させるために、りん片の表面に切傷を付けたり、りん片を切断・分割する方法が知られている(57,68,69)。in vitro のりん片培養でも、りん片を傷付けることによって、分化子球数が増加することが報告されている(223)。本章の実験においても、in vitroの培養で形成された無菌子球から採取した小さなりん片をさらに切断して培養すると、その切断面が肥大し、そこから多数の不定芽が形成されることが分かった。これらの結果から、りん片培養での子球増殖率を高めるためには、十分に肥大したりん片を有する子球を無菌的に形成させた後、その子球から採取したりん片を切断して得た切片を適切なホルモン条件の培地で培養することが最も有効であることが分かる。

第3節の結果に示したように、葉切片や節切片もユリ子球を増殖する材料として利用できる。特に、節の培養では、ユリの挿し木繁殖(164)や黄化伸長した茎の節培養(230)、あるいはオウゴンカズラの節培養(58,60)などの場合と同様、サイトカイニンによる不定芽の分化促進効果が顕著であった。しかし、「不定芽塊」を形成している多数の不定芽を球根へと生育させるためには、新たな球根生育用培地への移植を必要とし、また、無菌の培養材料となる節切片を得るためには、in vitroの培養子球から茎を抽台させるべく、低温処理およびサイトカイニン添加培地での培養プロセスを必要とした。一方、葉切片培養では、りん片培養と比較して子球を分化する切片の割合がやや低く、また、培養切片当たり分化する子球の数も少なかった。したがって、その培養効率や培養プロセスの点を考慮すると、増殖材料としてりん片を使用するりん片培養が実用的な増殖方法として、より適しているといえる。なお、優良な開花株を選抜し、これを親として培養を開始する時点では、その雑菌汚染も考慮して、できるだけ多数の培養材料を得ることが望まれる。この場合、球根のりん片などとともに、抽台した茎の節やその普通葉から得られる切片を利用することも考えてよい。しかし、一旦無菌球根が得られると、その後の増殖過程では、子球の分化数も多く、増殖効率の良いりん片を培養材料とするだけで、十分に高い増殖率が期待できる。



ユリのカルスでは、長期間培養しても再生した個体に変異が認められず、カルス培養は効率の良い増殖法として利用できることが報告されている (171, 178)。しかし、一般に、カルス培養では、変異個体を生じたり、培養が長期間に及ぶと、その植物体を再生する能力が減少する可能性のあることも報告されている (145, 151, 189, 191, 213, 214) ので、りん片培養を利用した効率の良い増殖法を確立することができれば、りん片培養を用いる方がむしろ望ましい。本研究を続ける過程において、1972~1983年のおよそ11年間、実験材料として、りん片培養によるテッポウユリ 'ジョージア' の子球の維持・増殖を続け、その培養や栽培のデータを収集してきた。その間、りん片の子球分化能力は低下せず、また、栽培中の変異個体の発生も認められなかったことから、りん片が球根増殖のための培養材料として優れていることが示唆されている。一方、花被片や花柱、子房などの培養例 (40, 93, 108, 130) も報告されているが、ウイルスフリーの種球根となるべき子球を *in vitro* の系内で大量に増殖しようとする本研究の増殖方法に、これらの生殖器官を培養材料として利用することは困難である。

以上に記したことや本研究で行なった数種類のユリの培養結果などを合わせて考慮すると、ユリ類全般において、りん片を培養材料としたりん片培養が、*in vitro* における球根増殖の手段として最も適切であると結論される。なお、テッポウユリにおける無菌化した球根のりん片培養による増殖でも、ウイルスを高率で除去できるといった実験結果が報告されているが、そのウイルス除去の機構については不明である (234)。しかし、この現象に再現性があるとするれば、無菌球根のりん片は培養材料として一層適しているといえる。このりん片培養による球根増殖を、真に実用化するためには、さらに培養法の簡便化と、そのスケールアップを図ることが重要であり、この点については次章で検討を加えている。

一方、カルス培養については、茎頂組織の培養だけではウイルスフリー化が困難であった場合に、これを利用することが考えられる。すなわち、Pillai と Hildebrandt (145)、Abo El-Nil と Hildebrandt (1) らは、ゼラニウムのカルスから分化した植物体がウイルス病の徴候を示さず、また、旺盛な生育をすることをみた。西ら (126) もイチゴの葯由来のカルスから分化した植物体がウイルスフリーであることを報告した。一方、Kassanis (72) によると、ウイルスに感染したタバコカルス組織のタバコモザイクウイルスの濃度は、土壌で育成したウイルス罹病植物体の葉における濃度の約1/3であった。また、Hansen と Hildebrandt (48) も4~9代継代培養したタバコカルスで同様の現象をみた。さらに、カルス組織中のウイルスは、継代培養の経過とともに減少したり、感染力を失ったりするとの Reinert (152) の研究や、カルス組織中のウイルス濃度は不均一であるとの報告もある。したがって、茎頂組織の培養に由来するカルスから分化し、変異を起こしていない子球を利用すれば、ウイルスフリー化の効率をさらに向上させることができるかもしれない。

培養球根を鉢上げした後、短期間で商品価値のある花を開花させるためには、*in vitro* 培養において、

十分に生育・肥大した子球を得るための方法を確立することが重要である。第2節における子球培養の実験では、培地中のショ糖濃度や培養温度が、培養中の子球の生育・肥大に対しても影響を及ぼすことが分かった。それぞれの項目について行なった試験範囲内でみると、かなり高い糖濃度(60 ~120g·liter<sup>-1</sup>)あるいは比較的高い培養温度(27 ~28℃)で子球の生育・肥大が良好となった。一般に、ユリ類は温度の高い時期を経過するとともに地上部の生育を停止して、地上部の同化物質を地下部に転流・蓄積し、球根を肥大させる。すなわち、植物体地上部の生育活性の低下とともに球根の肥大が促進されるともいえる。この点で、不定芽が分化・生育し、球根化を開始した段階以降から、高糖濃度の培地を用いて、比較的高い温度条件下で培養することは、新球の生長点が分化・生育し、開花後の高温時期に茎葉から新球へと養分が転流していく自然条件下での球根と類似した生理状態を培養子球中に生じ、その結果、子球の肥大が促進されたと考えられる。Aguettaz (2)、Stimart ら (53,181,182,183,184) やTakayamaら (197)は培養温度や培地中の糖濃度がユリ培養球根の休眠の深さに影響を及ぼすことを報告した。本研究でも、高糖濃度あるいは比較的高い温度条件下で培養されたテッポウユリとカノコユリの子球では葉の伸長が抑制されており、子球生長点の生育活性はある程度低下していることが示唆されたが、この現象と休眠との関連について十分に考察するためには、さらに実験を進めることが必要である。また、矢澤ら (236)はテッポウユリ木子のサイトカイニン処理が、その抽台を促すことを報告している。本章の第3節においても、カイネチン添加培地に置床した子球を、40日間の低温処理を行なった後、23℃で培養すると、培養中、速やかに抽台を開始し、節切片を得ることができた。このように、休眠現象も含めた生長の制御が培養球根の形態形成、特にその肥大と密接に関連していると考えた場合、エチレン、アブシジン酸 (以下ABA)のような成熟あるいは休眠と関係した生長調節物質や B- ナイン、CCC、アンシミドールなどの生長抑制剤、さらにクマリンや休眠中のテッポウユリ球根中に認められているフェルラ酸 (173)などのフェノール類を培養の適当な段階で利用することによって、培養球根の肥大を促進できる可能性も考えられる。特に、子球の肥大が不良である‘烏羽玉’のような品種では、今後このような肥大を促進する培養技術を確立する必要がある。したがって、休眠を含めた培養球根の生理解明は、今後、是非とも明かにしなければならない課題である。

また、培養球根の鉢上げ後の生育状態についても、その休眠の深さと関連して、十分な調査を行なう必要がある。テッポウユリでは、糖濃度4%、温度23℃の培養条件で得られた子球は、球根からの出葉や抽台が起こるために低温を必要とせず、その生長点は生育可能な生理状態にあったと考えられる。一方、カノコユリの場合、テッポウユリと同じ培養条件で得られた球根でも、鉢上げ後の出葉・抽台に冬季の低温期間が必要であり、実際、低温(10℃)処理を6週間与えることによって抽台がみられた。このことから、本章の培養条件で得られたカノコユリ培養球根の生長点は、テッポウユリの場合と異なり生育停止

(休眠)状態にあり、さらに抽台にも低温が必要であると推察された。オトメユリにおいても、24℃の培養温度で得られた子球を試験管から取り出して、そのまま育苗箱に移植しても出葉はみられず、子球の休眠を十分に打破するためには、4℃で12週間以上の低温処理を必要とすることが報告されている(131)。これらのことから、休眠現象などで表現される培養球根の生理状態には、培養するユリの種によって差異があると考えられる。

以上の点を考え合わせると、栽培現場での球根生産や切り花生産までの段階をも含めた総合的な観点から、*in vitro*培養によるユリ球根の増殖法を確立するためには、培養条件と培養球根の休眠との関連を明らかにすることが非常に大切であり、そのためにも、それぞれのユリ類が有している生理・生態的な特性を十分に把握しておくことが必要であるといえる。

さらに第4節の栽培試験では、培養球根を利用した実用的な成球生産技術を開発することも考慮している。テッポウユリの場合、前記のように、その培養球根の生長点は生育可能な状態にあり、低温処理を行わなくても、鉢上げ後、速やかに出葉し抽台もみられた。これらの球根は第一作目で開花し、その開花率は92%であった。この開花率や草丈などを含めた生育程度は、広い根圏を占めることができる地床栽培を行なうなど、栽培方法や環境条件を工夫することによって、さらに向上させることができると考えられる。また、掘り上げ調査した結果、球周11~12cm、球重およそ35gに肥大した球根が得られた。このような球根では、第二作目の栽培において品質の優れた切り花を採ることができ、また、10~20gの球根でも切り花生産に十分に供することができることが分かった。すなわち、販売球を得るまでに一作の養成期間で十分であり、栽培技術の向上によっては、一作目で切り花を採ることも可能である。なお、Weilerら(229)は、最低温度21℃の温室で栽培したテッポウユリの無冷蔵球根では、抽台しても開花がみられず、1.6~18.4℃の温度がバーナリゼーション温度として作用していると報告している。これらことは、テッポウユリにおける温度(低温)がバーナリゼーション効果すなわち開花効果として作用しており、休眠打破や抽台の必要条件ではないことを示唆している。したがって、この点からも、本研究の培養条件で培養して得られたテッポウユリ子球の出葉や抽台誘導のために、低温処理は必要なかったと考えられる。

一方、カノコユリ‘内田かのご’の培養球根では、出葉および抽台を誘導するために低温処理を必要とした。‘内田かのご’の選抜親であるカノコユリでは、開花後の球根の充実・成熟時期が、高温とはいえ、むしろ気温が低下していく時期にあたり、また、その自生地の冬季の気温がテッポウユリ自生地の場合と比較すると、より低くなるといった自然条件から、球根の成熟や抽台に対して低温が必要であると推察される。したがって、‘内田かのご’培養球根の低温処理による出葉および抽台促進は、この選抜親における球根成熟や抽台に対する低温要求性を培養球根が受け継いでいることを示唆している。低温処理培養球根の場合、抽台した茎の普通葉が冬季の低温で黄化・落葉するまでに同化した養分は、シンク機能を

有する球根にほとんど蓄積され、さらに、冬季の低温を経験した後の第2回目の抽台によって形成された茎葉の同化作用で、球根の充実が一層促進された結果、球重20g にまで肥大した球根が得られたと考えられる。低温処理を行なわなかったために、抽台が翌春の1回だけであった場合、10g 以上の球根は収穫できなかった。この無低温処理の子球から収穫された5~10g の一作球根を鉢栽培(第二作目)しても、開花率は38%であり、低温処理球の第一作目の生育程度とほぼ同様であった。したがって、低温処理したカノユリの培養球根は、通常の秋植え、翌秋掘り上げといった1年の栽培期間の間に、生育サイクルを2回繰り返したことになる。このように、ユリの種類によっては、低温処理などを行ない、その生育サイクルを短縮し、早期に開花個体を得る栽培技術を開発することも可能であろう。

マドンナリリーやトサヒメユリの場合、培養段階における球根の肥大が良好であり、子球培養によって、球径11~12mm、球周43mm程度の子球が得られた。トサヒメユリでは、球径15mm程度の球根で2輪開花すると報告されている(124)ことから、培養条件を工夫することによって、*in vitro*で切り花用球根にまで養成することも可能である。実際、本研究においても、3~5gにまで生育させた培養球根(伸長した葉と根を含む、球径:10~15mm)を鉢上げすることによって、草丈はやや低いものの、第一作目で2輪開花させることができた。また、1~2gの培養球根では、春に鉢上げし、秋まで栽培して球根を養成することにより、良品質の切り花を採花できる球根を得ることが可能であった。この場合、春に鉢上げた子球はロゼット葉を5~6枚展開するだけであるので、栽培面積も小さく、育苗用の隔離施設を利用することも容易である。したがって、中山間地の空いている育苗ハウスなどで春に鉢上げ育苗して、夏の間球根を養成し、さらに、秋に圃場へ定植して切り花を収穫するといった実質的に圃場での栽培一作で切り花を生産する作型の開発も可能である。

最近、夏場の切り花として需要の伸びているシンテッポウユリについても、直径8~11mmの培養子球を鉢上げすると、栽培4か月で草丈が80cmにまで伸長し、開花率は100%となった。一定の培養条件で培養して得た球根の生理状態は一定であると予想されるので、鉢上げ時期を調節し、栽培管理技術を検討・工夫することによって、シンテッポウユリ切り花の周年生産を実現することも可能であろう。なお、今回の栽培試験では、開花する時期が1か月間におよんだ。これは、培養材料に用いた実生由来の球根が複数個であったため、その形質自体にバラツキがあり、その結果、生育や開花時期にやや不揃いを生じたことによると考えられる。したがって、1個の優良な形質の選抜球根から培養を開始すれば、品質が良く、さらに、生育や開花時期のより斉一な切り花が得られるはずである。

このように、トサヒメユリやシンテッポウユリなど、種子繁殖で球根を増殖するため、その形質にバラツキを生じたり、小球でも開花する能力の認められるユリ類での組織培養球根の利用は、均一な形質を示し、また、培養や球根養成の期間が比較的短くてよい可能性がある。この点で、これらのユリ類は、組織

培養による実用的な球根生産を目的とする場合の対象品目として特に有望である。しかし、この場合でも、培養球根を利用した生産コストと種子繁殖や従来の繁殖法を利用した生産コストとの比較、生産コストと切り花などの市場価値（価格）とのバランスなどを十分に考慮しておかねばならない。さらに、培養球根を栽培の生産現場に直接導入するとき、培養球根の大きさとその開花能力との関係や栽培管理技術に対応した培養球根の生育・肥大の様相などについて、十分に調査し明確にしておく必要があることはいまでもない。

## 第6節 摘要

テッポウユリ、カノコユリを中心に数種類のユリについて、茎頂組織の培養によって得られた無菌幼植物の子球りん片、葉あるいは茎の節を培養材料として、肥大した子球を *in vitro* で効率よく増殖できる培養条件を明らかにするとともに、無菌的に増殖した子球の鉢上げ後の生育特性についても調査した。

1. 培地に添加する生長調節物質として、オーキシシン、特に  $0.1\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$  の濃度のNAA は培養切片からの子球の分化および生長を促進した。サイトカイニン類は不定芽の分化を促進したが、その促進程度は培養するユリの種によって異なった。また、不定芽から子球への生育に対して、培地中のサイトカイニン類は抑制効果を示した。

2. 子球りん片を切断・分割して培養すると、切片の切断面が肥大し、そこから子球が分化することによって、1りん片当たりには得られる子球の総数が増加した。

3. 切片からの子球の分化と生長は、培養温度が  $30^{\circ}\text{C}$  を超えると抑制されたが、 $23\sim 28^{\circ}\text{C}$  の温度範囲では良好であった。また、培地中の高いショ糖濃度 ( $60\sim 120\text{g}\cdot\text{liter}^{-1}$ ) あるいは  $27\sim 28^{\circ}\text{C}$  の温度条件では、子球からの葉の伸長が抑制されたが、分化した子球自体の生長は促進される傾向があった。

4. 葉片あるいは節切片は子球増殖の培養材料として利用できるが、培養効率や培養プロセスの煩雑さの点などを考慮すると、りん片培養が、最も効率よく子球を増殖できる実用的な培養法であることが分かった。

5. 寒天培養で増殖した子球の鉢栽培を行なった。テッポウユリの培養球根は、鉢上げ後、速やかに出葉して草丈約  $30\text{cm}$  まで伸長し、その  $92\%$  が開花した。また、掘り上げられた  $10\text{g}$  以上の一作球根は、切り花生産用球根として十分に販売可能であった。カノコユリの培養球根では、出葉および抽台に低温が必要であった。鉢上げ前の低温処理によって抽台が誘導された結果、葉数が増加し、球根の生長も促進され、販売球根を得るまでの栽培期間を短縮できる可能性を見出せた。また、シンテッポウユリやトサヒメユリの培養球根からは、鉢上げ後、第一作目で切り花を得ることが可能であった。このような実生系・小球性の

ユリは、短期間で一定形質の球根あるいは切り花を生産できる組織培養系を利用した実用的な対象品目として、特に有望であると考えられた。

6. 以上の結果から、茎頂組織の培養で得られた小球のりん片を培養材料として、無菌的に固体（寒天）培地上で培養・増殖を繰り返すことによって、短期間で多数のウイルスフリー（無病）の優良球根を生産できること、また、これらの培養球根を適切な条件で栽培して、成球養成期間を短縮できることが明らかになり、組織培養系を利用したユリ球根増殖方法の実用化の可能性が示唆された。

### 第Ⅲ章 組織培養を利用した生産の体系化

第Ⅰ章では、肥大したりん片を多数有するウイルスフリーの小球根を、短期間に形成させる茎頂組織の培養法に関する諸条件を明らかにした。また、第Ⅱ章では、茎頂組織の培養によって得られた小球根のりん片などを培養の材料として、*in vitro*で子球を大量に分化・増殖させ、さらに効率よく生長させる諸条件を明らかにするとともに、得られた培養球根を栽培し、その生育特性についても調査した。その結果、寒天培養を利用してウイルスフリー（無病）であり、且つ優良な形質を有するユリ球根を効率よく増殖できる増殖体系を、基本的に確立することができた。しかし、この増殖体系をスケールアップして、さらに実用技術とするためには、培養に供する球根材料から切片を大量に作成し、これらを一度に培地に植え込むことができ、また、培地中の栄養分などの補給も容易にできるような簡便な培養方法を確立する必要がある。

組織培養を利用した園芸植物の増殖に関する研究は、これまでも多数報告されてきた(160)。その多くは、寒天培養などの固体培地を使用したものである。それらの報告文献中には、培養室のフラスコ試験で得られた幼植物体の分化率や生育のデータから増殖効率を試算し、年間数十万から数千万本もの培養苗を生産可能であるとしているものがみられる。しかし、寒天などを支持材とした固体培地を用いる場合、培養材料となる芽や植物体の切片を人手により一つ一つ切り分けて培地表面に置床し、また、栄養分の補給や新たな培地組成を利用するために、移植などの作業が必要であることを考慮すると、文献に記されているような高い増殖の数値を実現することは不可能であるといつてよい。ユリにおいても、1個の球根を材料として、りん片切片的寒天培地による培養と継代を行ない、1年間で1万から100万倍に増殖できるとするNovak (136)らの報告や半年間で約10万倍に増殖できるとしているAnderson (12)の報告などがあるが、同様のことがいえるであろう。

一方、カルス細胞の培養には液体培地が用いられることが多い。この場合、培養のスケールをかなり大きくすることも可能であり、また、増殖したカルスから植物体を再分化させる条件が明らかにされておれば、効率の良い種苗増殖の方法として利用できる可能性がある。しかし、カルス培養の場合、既に述べたように、長期間にわたって培養・継代を続けていると、その再分化能力が低下することがあり、変異個体の発生する可能性もあることが一般に報告されている。したがって、カルス培養法を苗や球根増殖の実用技術として利用するためには、この変異発生の可能性が大きな障害となる。この点で、テッポウユリ、ササユリや交雑品種など、各種のユリにおいて、効率が良く、変異の発生もみられなかった増殖法として報告されているカルス培養を利用した方法 (145, 147, 177, 178, 180)も、実際に球根や切り花を生産する現場

では、なかなか導入し難い技術であろう。

本章では、以上のような観点から、組織培養系を利用した実用的なユリ生産体系の開発を目的に、簡便な培養方法を用い、大きなスケールで球根切片から直接子球を分化させ、さらに、短期間でその小球根から成球（開花株）を生産する技術の確立に関する実験を、ササユリをモデルとして行なった。

なお、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たユリである。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、栽培に関する報告も少なく、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（175）。このため、ササユリ球根の組織培養による増殖試験が各地で試みられているところでもある（50, 106, 132）。

### 第1節 液体培養による子球の増殖

植物種苗の組織培養による増殖の現状は、パート労働の手作業によるフラスコ内増殖である。この場合、苗の生産コストに占める人件費の割合は非常に大きく、一般に60～70%に達するともいわれている。したがって、培養の各プロセスにおいて、手作業の占める割合をできるだけ小さくし、そのうえ培養をスケールアップできる簡便な培養方法であることが、実用的な増殖技術を開発するうえで非常に重要である。

このような組織培養による実用的な増殖技術の開発が望まれる状況の中、セラミックウールやロックウールあるいはプラグトレイなどを支持材として利用し、培地には液体培地を使用する培養方法なども盛んに研究されるようになってきた（39, 66, 120, 122, 207, 208, 211, 212）。また、植物組織培養による種苗生産をめざして、農水省と民間企業の共同プロジェクト研究による「バイオナーサリーシステムの開発に関する研究」が実施され、同一の容器内で培養幼植物の発根・順化過程まで行なうことのできる培養装置の開発にも力が注がれている（123, 125, 215）。本節では、ユリ球根の実用的な大量増殖技術の基礎データを得るために、以下の実験を行なった。まず、培養プロセスを省力化でき、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した。次に、その結果をもとにして、液体培地中におけるりん片切片からの子球の分化や分化した子球の生育に及ぼす培養条件などの種々の要因について検討するとともに、培地養分の経時変化についても調べた。

#### 第1項 スケールアップに適した簡便な培養方法の検討

外植体の植え付けや培地交換に必要な労力を軽減し、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、液体通気培養について、切片からの子球の分化と生育に及ぼすその影響を比較検討した。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、非無菌条件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についても同時に検討した。

#### 材料および方法

以下の全ての実験項目において、供試するユリの種類としてはササユリを用いた。

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から採取したりん片を、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分間滅菌した後、滅菌水で3回洗浄した。滅菌したりん片を23℃、暗黒、寒天培地上で培養し、無菌子球を分化させた。その後、得られた無菌子球を、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 5mm程度の子球のりん片（10~20mg）を上部（先端部）と下部（基部）に分割し、得られた切片を一对として実験に供した。

供試材料となる無菌球根増殖用の寒天培地には、主要塩類および鉄源としてMSの処方、微量要素および有機物質としてRNの処方を用い、ショ糖  $40\text{g}\cdot\text{liter}^{-1}$ 、寒天 $8\text{g}\cdot\text{liter}^{-1}$ 、生長調節物質としてNAA  $0.1\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$  を添加した後、pH 5.7に調整したものをを用いた。培地の蒸気滅菌は、 $1.2\text{kg}/\text{cm}^2 \cdot 120^\circ\text{C} \cdot 12$  分間の条件で行なった。培地50ml当たり16切片（8りん片の各上下切片）を植えつけた。

比較した培養法の液体培地には、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倍としたものをを用い、寒天培地と同様に滅菌した。培養は23℃、暗条件として、8 ~15週間行なった。

液体培養の方法は、1)液体培地20mlを含浸させたポリエステル繊維支持材に 5りん片の上下切片（合計10切片）を、その背面側が支持材に接するように置床した液体支持材培養、2)水平旋回（82rpm）した液体培地20ml中に 5りん片の上下切片（合計10切片）を投入して培養した液体振盪培養、3)エアーポンプによって毎分約9.6ml の大気を、 $0.2 \mu\text{m}$  のマイレクスFGフィルター（日本ミリポア工業株式会社製）に通して無菌通気している液体培地30ml中に、 9りん片の上下切片（合計18切片）を投入して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パーミキュライト上に、りん片切片を包埋した直径7mm程度のカプセルを 8個（4りん片の各対切片）置床した。カプセルは、りん片の各切片1個、アルギン酸ナトリウム1.5 %およびNAA $0.1\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$ と殺菌剤として8ヒドロキシキノリン  $10\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$  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 200ml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 100mlの三角フラスコ、液体通気培養には60mlの円筒ロート型ガラス濾過器

(細孔記号G4)をそれぞれ使用した。

りん片培養における分化程度の調査は、培養8 週後(液体培養、カプセル培養)あるいは15週後(カプセル培養)に行なった。りん片から分化したコブ状の組織を突起物、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。

## 結果

りん片切片からの子球の分化と生長は、検討したいずれの培養方法においても認められた(第34表)。しかし、カプセル培養では、子球の分化と生長が遅く、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、培養15週後に調査した子球の分化数と肥大程度(球径)でも、他の培養法の培養8 週後の結果を上回らなかった(第40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、切片の生存率も低かった。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く培養4 ~5 週頃であったが、分化した子球の生長は劣った。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が、さらに生育して球根を形成するものの割合は30%弱と低かったため、得られた子球の数は他の液体培養法の場合と変わらなかった。一方、液体通気培養での結果は、分化点数に対する子球形成率が高かった以外、子球の分化数と生長は、液体振盪培養と同様の結果が得られた。なお、本実験の液体通気培養では、培養4 週を経過した段階で、恒温器のトラブルのため、35℃程度の高温に1~2日間遭遇した。

## 第2項 液体通気りん片培養における子球の分化と生育に及ぼす培地中の主要塩類濃度、ショ糖濃度および生長調節物質の影響

前項の結果から、後述(第4節考察)のようにスケールアップに適する培養法と考えられた液体通気培養について、培養条件の検討などを本項から第5項で行なった。

外植体の一部が培地と接しているだけの固体(寒天)培養と外植体の表面組織全体が培地と接している液体培養では、培地中の養分などの吸収・利用効率が異なることが予想される。そこで、本項では、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適した主要塩類濃度、ショ糖濃度および生長調節物質の種類と濃度を明らかにするため、実験を行なった。

## 材料および方法

無菌球根の維持・増殖、実験材料とするりん片切片の作成と培地への投入、培養容器、培地量、培養条件、分化程度の調査基準などは前項に準じた。

培地は、前項で使用した液体培地を基本とした。主要塩類濃度の影響をみた実験では、基本培地のMS主要塩類組成濃度を 1/2倍、3/4 倍、1.0倍（標準濃度）および 5/4倍、ショ糖濃度の影響をみた実験では、同じく培地中のショ糖濃度を20、40、60および80g $\cdot$ liter $^{-1}$  とし、いずれの実験においてもNAA 濃度は0.01mg $\cdot$ liter $^{-1}$ とした。生長調節物質の影響をみた実験では、基本培地中の生長調節物質の種類と濃度を、NAA 0.01mg $\cdot$ liter $^{-1}$ 、カイネチン 0.5mg $\cdot$ liter $^{-1}$ 、ABA 0.02あるいは0.1mg $\cdot$ liter $^{-1}$  とし、また、生長調節物質無添加培地を対照に用いた。さらに、NAA については、培地中の濃度を 0、0.001、0.01、0.1 mg $\cdot$ liter $^{-1}$ として、液体通気培養に適する濃度を検討した。

酸素濃縮機（山陽電子工業製）を用いて、酸素濃度95%のガスを毎分約9.6ml の速度で培地へ通気しながら培養を行なった。

### 結果

各主要塩類濃度の培地における培養 8週後の結果を第35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り、この濃度より高くても、また、低くても、子球の分化と生育は促進されなかった。特に、5/4 倍まで高めると、分化する子球数が減少し、培養期間が長くなるにつれて褐変・枯死する切片が増加する傾向も観察された。

各ショ糖濃度の培地における培養 8週後の培養状況を第41図に示した。りん片切片からの子球の分化数はショ糖濃度40 g $\cdot$ liter $^{-1}$ で最も多く、1りん片当たり 7.6個の子球が得られた。また、60g $\cdot$ liter $^{-1}$  のショ糖濃度でも、分化した突起物からの不定芽形成や子球までの生育は抑制されなかった。しかし、ショ糖濃度を80g $\cdot$ liter $^{-1}$  まで高めると、分化点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 個になった。

生長調節物質としてNAA、カイネチンあるいはABAを添加した培地における培養 5週後の結果を第42図に示した。対照の生長調節物質無添加の培地では、培養1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、カイネチン添加培地では、培養1りん片当たりの分化点総数は、対照培地のものと比較して 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、子球数自体の数は 0.2個と、むしろ対照培地の場合より少なくなった。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1りん片当たり得られる子球の数は、対照の生長調節物質無添加培地で 3.6個、NAA 添加培地で 7.6個、カイネチン添加培地で 1.8個、ABA 0.02 および 0.1mg $\cdot$ liter $^{-1}$ 添加培地でそれぞれ3.6 個および2.4 個であった。

Table 34. Influence of various cultural methods on differentiation and growth of bulblets in scale culture of *L. japonicum*.

Culture method	Culture period (weeks)	% of survival	% of protuberances and buds per scale(A)	No. of buds per scale(A)	No. of bulblets per scale(B)	% of bulblet formation (B/A+B×100)	Diam of bulblet (mm)
Liquid medium culture							
Polyester fiber support	8	100		2.8	3.2	53.3	1.6
Horizontal rotation (68rpm)	8	100		8.0	3.2	28.6	2.4
Aeration by air-pump (9.6ml·min. <sup>-1</sup> )	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, MS's Fe, RN's micro-elements and organics, 0.1mg·liter<sup>-1</sup>NAA, 40mg·liter<sup>-1</sup>sucrose, pH 5.7.

Culturing conditions : 23°C, Darkness.

Culture materials : The scales of 10 ~ 20 mg were taken from bulblets obtained by in vitro agar culture of scale segments and cut horizontally into two segments.

Table 35. Influence of MS macro-elements strength on differentiation and growth of bulblets in an aerated liquid culture of in vitro scale segments of *L. japonicum*.

Strength of MS macro-elements (x)	No. of protuberances and buds per scale(A)	No. of buds per scale(B)	% of bulblet formation (B/A+B×100)	Diam of bulblet (mm)
1/2	3.6	5.0	58.1	2.1
3/4	3.2	8.4	72.4	2.5
1	3.4	4.8	58.5	2.1
5/4	5.0	0.4	7.4	2.0

Culture medium : 1/2 ~ 5/4 strength of MS macro-elements, MS's Fe, RN's micro-elements and organics, 0.1mg·liter<sup>-1</sup>NAA, 40g·liter<sup>-1</sup>sucrose, pH 5.7.

Culturing conditions : 23°C, darkness, 9.6ml·min<sup>-1</sup>aeration of 95% O<sub>2</sub> by O<sub>2</sub> Enricher (Sanyo Electronic Industries Co.), a 60ml cylindrical vessel (contained 30ml medium) with a glass filter (pore size grade:G4).

For culture materials : See Table 34.



Fig.40. Differentiation and growth of bulblets in capsule culture of scale segments of *L. japonicum*. ( culture period : 15 weeks )

Capsules with medium and a segment were planted on sterilized vermiculite containing water.

For culturing conditions, medium and materials: See Table 34.

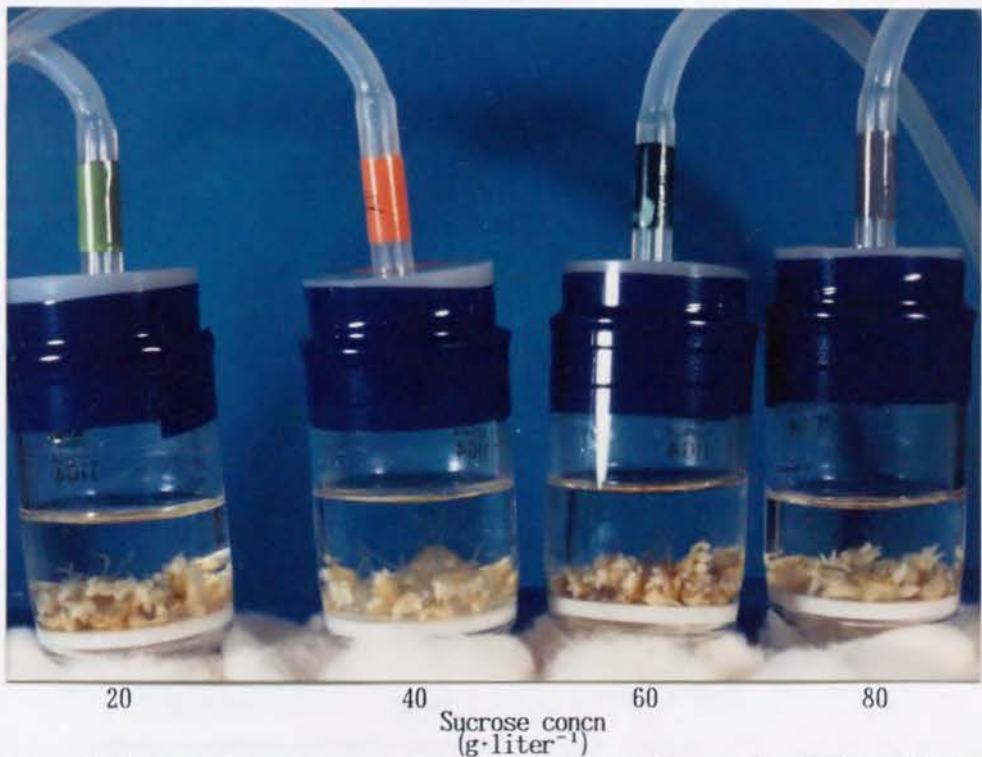


Fig.41. Influence of sucrose concentration in the medium on the differentiation and growth of bulblets in an aerated liquid culture of *in vitro* scale segments of *L. japonicum*. ( culture period : 8 weeks )

Culture medium : 3/4 strength of MS macro-elements, MS's Fe, RN's micro-elements and organics,  $0.01\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$ NAA,  $20 \sim 80\text{g}\cdot\text{liter}^{-1}$ sucrose, pH 5.7 .

For culturing conditions: See Table 35.

For culture materials : See Table 34.

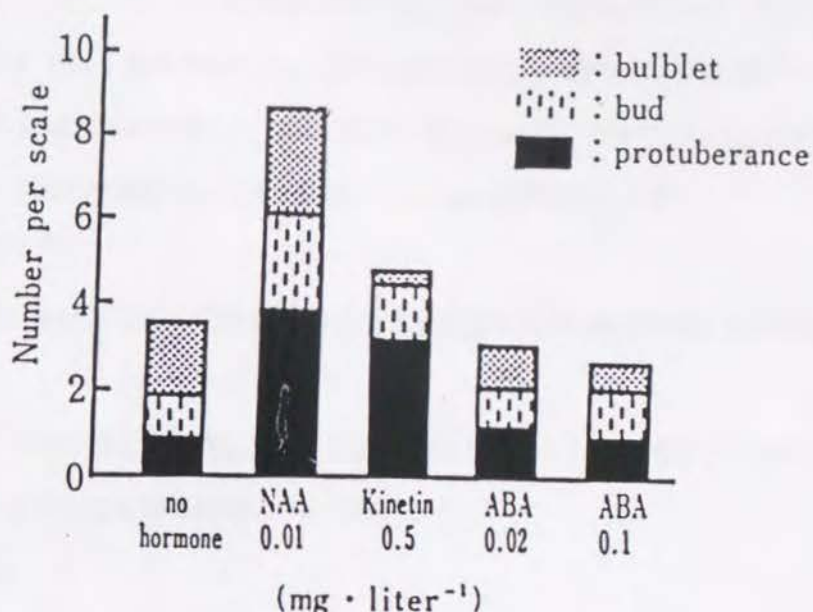


Fig.42. Influence of growth regulators in the medium on differentiation of bulblets in an aerated liquid culture of *in vitro* scale segments of *L. japonicum*. ( Culture period : 5 weeks )

Culture medium : 3/4 strength of MS macro-elements, MS'Fe, RN's micro-elements and organics, 40g·liter<sup>-1</sup>sucrose, pH 5.7 and the above mentioned growth regulators.

For culturing conditions: See Table 35.

For culture materials : See Table 34.

Table 36. Influence of NAA concentration on differentiation and growth of bulblets in an aerated liquid culture of *in vitro* scale segments of *L. japonicum* . ( Culture period : 8 weeks)

NAA (mg·liter <sup>-1</sup> )	No. of roots per scale	No. of bulblets per scale	Diam of bulblet (mm)
0	2.8	3.6	2.2
0.001	1.5	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, MS's Fe, RN's micro-elements and organics, 40g·liter<sup>-1</sup>sucrose, 0~0.1mg·liter<sup>-1</sup>NAA, pH 5.7 .

For culturing conditions : See Table 35.

For culture materials : See Table 34.

りん片切片からの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36表に示した。NAA を0.01あるいは0.1mg・liter<sup>-1</sup> 添加した培地で、りん片当たりの子球分化数は、それぞれ7.8 と8.0 個に増加した。これらの培地では、根の分化も促進され、特に0.1mg・liter<sup>-1</sup> 添加培地のりん片当たりの根数は11.0本となり、培地中全体に根が広がった状態であった。一方、分化した子球は、いずれの培地においても球径およそ2.0mm 程度に生長した。

### 第3項 液体通気りん片培養における子球の分化と生育に及ぼす通気ガス中の酸素濃度、培養温度および照明の影響

本項では、りん片切片からの子球の分化と生育に及ぼす培養中の環境条件として、培地中に通気するガスの酸素濃度、培養中の気温および光の有無の影響について検討した。

#### 材料および方法

無菌球根の維持・増殖、実験材料とするりん片切片の作成と培地への投入、培養容器、培地量、培地の滅菌、分化程度の調査基準などは第1項に準じた。

培地には、NAA の濃度を0.01mg・liter<sup>-1</sup>に変更した以外、第1項と同様の液体培地を用いた。培養は、23℃、暗条件、エアーポンプによる毎分約9.6ml の大気通気を基本とした。

通気中の酸素濃度の影響をみた実験では、エアーポンプと酸素濃縮機（山陽電子工業製）を単独あるいは組合せて得た所定の酸素濃度（20.9%（大気）、65%および95%）のガスを、毎分約9.6ml の速度で通気した。また、寒天培地50mlに対して18切片を置床した寒天培養も行ない、これらの液体通気培養の結果と比較した。

培養温度の影響をみた実験では、液体通気培養中の培養容器の外気温を18℃、23℃および28℃とした。

さらに、明条件として、昼光色蛍光灯による16時間日長、3,500lx の照明を行ない、暗条件での培養と比較した。

#### 結果

寒天培養および各酸素濃度での通気培養の培養8週後の結果を第37表と第43図に示した。20.9%の酸素濃度ガス（大気）を通気した場合、球径2mm程度の子球がりん片当たり8.8 個分化し、寒天培養と同様の結果が得られた。また、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傾向がみられた。しかし、通気ガス中の高酸素濃度による子球の分化に対する促進効果は認められず、逆に、培養切片や分化した根の一部に褐変がみられた。

各培養温度での培養5週後の結果を第44図に示した。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℃

でも順調に子球は形成されており、23℃と比較して、ほぼ同程度に肥大した子球が得られた。28℃では、発根が少なく、切片の切断部位付近が褐変しているものもみられた。培養8週後の観察では、23℃でのりん片当たりの分化子球数8個に対して、18℃では6個となり、分化した突起物から子球へと生育したものの数や形成された子球の肥大程度のいずれについても23℃が上回った。

明条件および暗条件で8週間培養した結果を第38表に示した。暗条件と同様、明条件においても、りん片切片からの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が、明条件では、切片から分化した子球の約7%が葉を伸長した。また、明条件で分化した子球の球径は、やや小さくなる傾向があった。なお、培養をさらに続けて培養期間が長くなると、暗条件で分化・生育した球根にも、葉を伸長するものがみられるようになった。

#### 第4項 液体通気りん片培養における子球の分化と生育に及ぼす供試球根の齢とりん片の部位の影響 材料および方法

無菌球根の維持・増殖、実験材料とするりん片切片の作成と培地への投入、培養容器、培地量、培地の滅菌、分化程度の調査基準などは第1項に準じた。培養も同様に、23℃、暗条件、エアーポンプによる毎分約9.6mlの大气通気とした。

供試球根の齢に関する実験では、液体通気培養に供する齢の異なる球根を得るために、実験直前の寒天培地上でのりん片培養の期間を、3、7、9および12か月間とし、第1項の液体培地組成からNAAを除外して、生長調節物質無添加とした培地で液体通気培養した。

りん片の切片部位に関する実験では、第1項の液体培地組成のNAA濃度を $0.01\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$ に変更した培地で培養し、培養3、5および8週間後の観察の際、りん片の先端部切片と基部切片に分別して、それぞれにつき子球の分化と肥大程度を調査した。

#### 結果

液体通気培養に供するりん片採取用球根を得るための寒天培養の期間について検討した結果、培養期間が長くなるほど、液体通気培養における、りん片切片からの子球の分化率が低下する傾向がみられた(第45図)。すなわち、寒天培養3か月で得られた子球のりん片切片では、液体通気培養中に分化した突起物が芽、さらには子球へと生育した結果、分化点数の30%が子球となった。寒天培養7か月のものにおいても、分化点数の17%で子球の形成が認められた。一方、寒天培養9および12か月で得られた球根のりん片切片では、突起物は多く分化したが、これらの突起物で、芽から、さらに子球へと生育するものは、ほとんどみられなかった。

りん片の先端部切片と基部切片における子球の分化・肥大の培養8週までの経時変化(第39表)と培養



Table 37. Influence of O<sub>2</sub> concentration in the aeration gas on differentiation and growth of bulblets in an aerated liquid culture of *in vitro* scale segments of *L. japonicum*.  
(Culture period : 8 weeks)

O <sub>2</sub> concn in aeration gas (%)	% of survival	No. of protuberances and buds per scale (A)	No. of bulblets per scale (B)	% of bulblet formation ((B/A+B) × 100)	Diam of bulblet (mm)
Solid medium culture					
Agar (Air:20.9)	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 of MS macro-elements, MS's Fe, RN's micro-elements and organics, 40g·liter<sup>-1</sup>sucrose, 0.01mg·liter<sup>-1</sup>NAA, pH 5.7 .

Conditions of aeration : The same as in Table 32 except for changing the concentration of O<sub>2</sub> in aeration gas, 20.9% O<sub>2</sub> by ambient air, 95% O<sub>2</sub> by O<sub>2</sub> Enricher (Sanyo Electronic Industries Co.), 65% O<sub>2</sub> by mixing of ambient air and 95% O<sub>2</sub>.

For culture materials : See Table 34 .

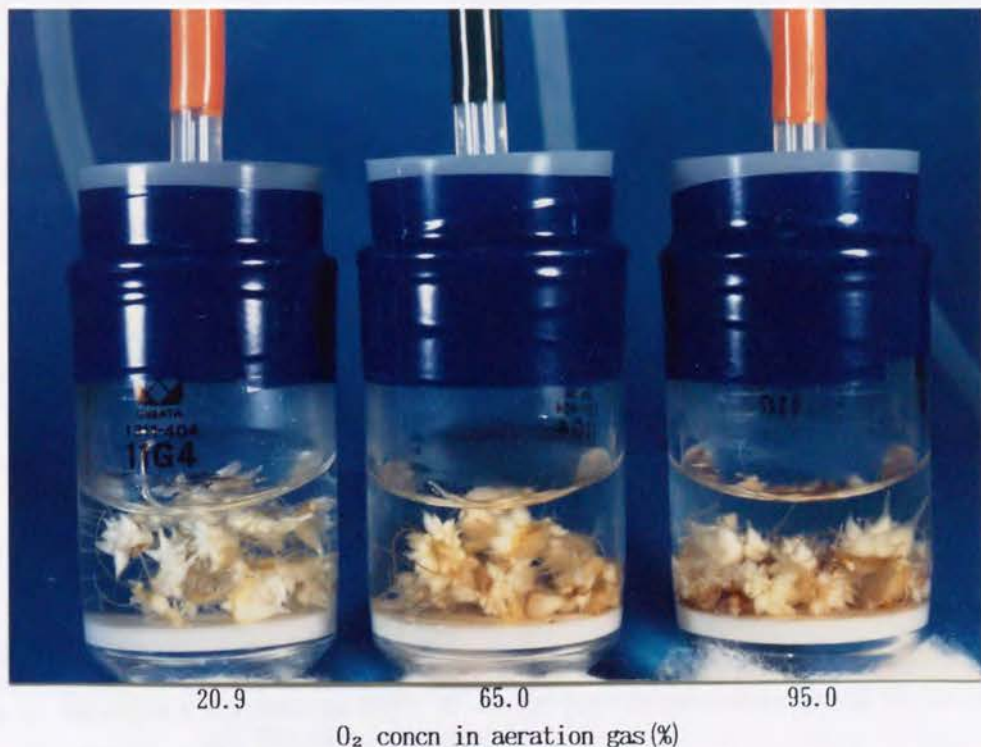


Fig.43. Influence of O<sub>2</sub> concentration in the aeration gas on differentiation and growth of bulblets in an aerated liquid culture of *in vitro* scale segments of *L. japonicum*.  
(Culture period : 8weeks)

For culturing conditions and medium: See Table 37.  
For culture materials: See Table 34.

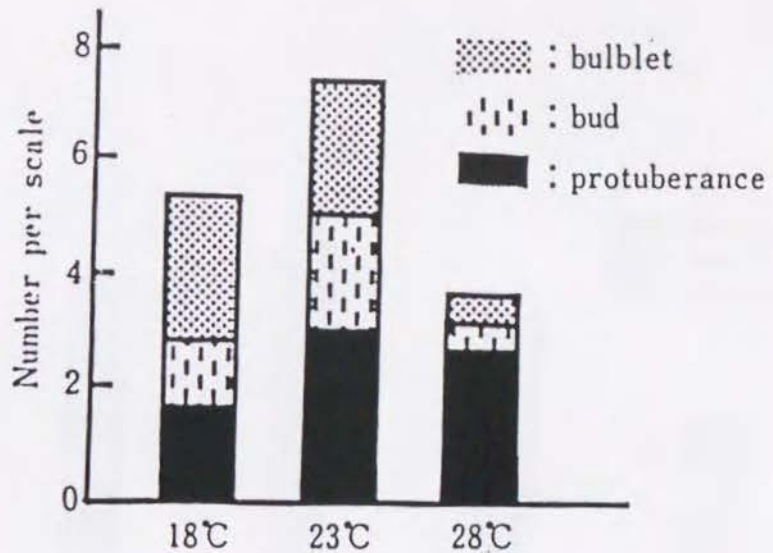


Fig.44. Influence of temperature on differentiation of bulblets in an aerated liquid culture of *in vitro* scale segments of *L. japonicum*. ( Culture period : 5 weeks )

For culture medium : See Table 37.

Culturing conditions : The same as in Table 35 except for the concentration of O<sub>2</sub> (20.9%, ambient air) and culture temperature (18, 23 or 28°C).

For culture materials: See Table 34.

Table 38. Influence of light condition on differentiation and growth of bulblets in an aerated liquid culture of *in vitro* scale segments of *L. japonicum*. (Culture period : 8 weeks)

Light condition	No. of root per scale	No. of protuberances and buds per scale	No. of bulblets per scale	Diam of bulblet (mm)	% of leaf longating 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

For culture medium : See Table 37.

Conditions of aeration : The same as Table 35 except for the concentration of O<sub>2</sub> in aeration gas (20.9% ambient air).

Conditions of lighting : 16hr·day<sup>-1</sup> and intensity of 3,500 lux.

For culture materials : See Table 34 .

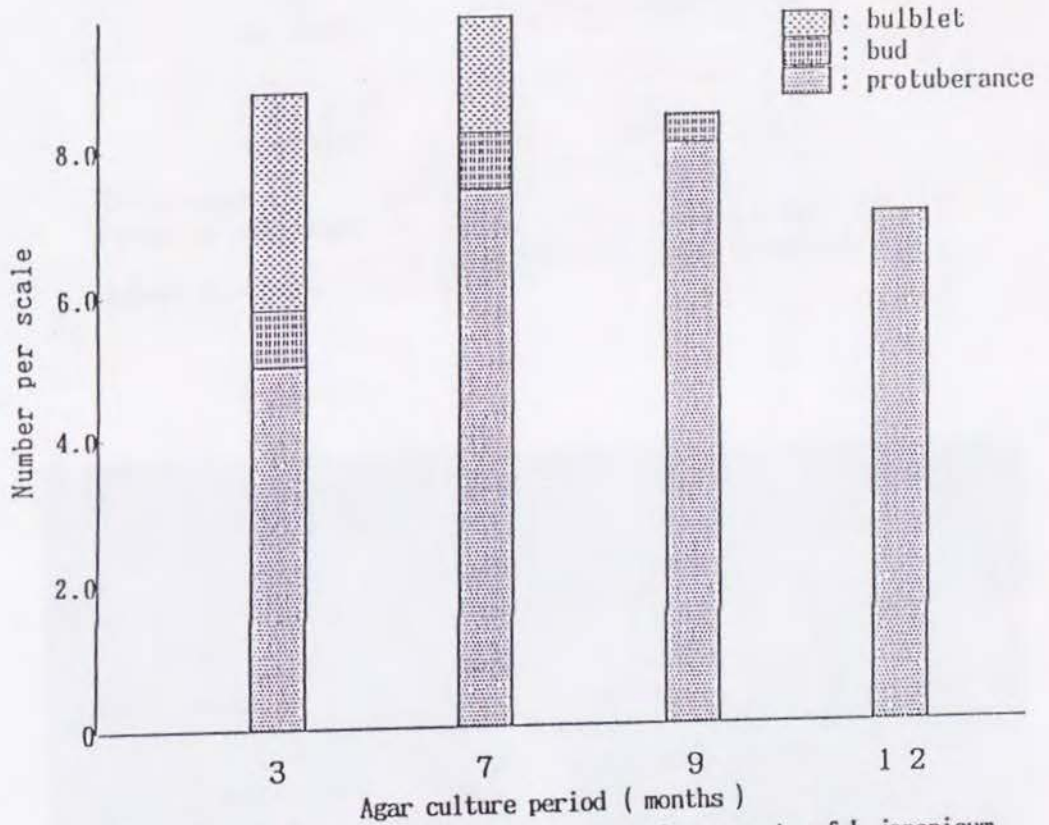


Fig. 45. Influence of agar culture period of scale segments of *L. japonicum* on differentiation of bulblets after culturing for 8 weeks in the following aerated liquid culture.

- Culture medium : The same as in Table 37 excluding NAA.  
 Culturing conditions: The same as in Table 35 except for the concentration of  $O_2$  (20.9%, ambient air).  
 Culture materials : Scales were taken from bulblets obtained by *in vitro* scale culture for 3, 7, 9 or 12 months and cut horizontally into two segments.

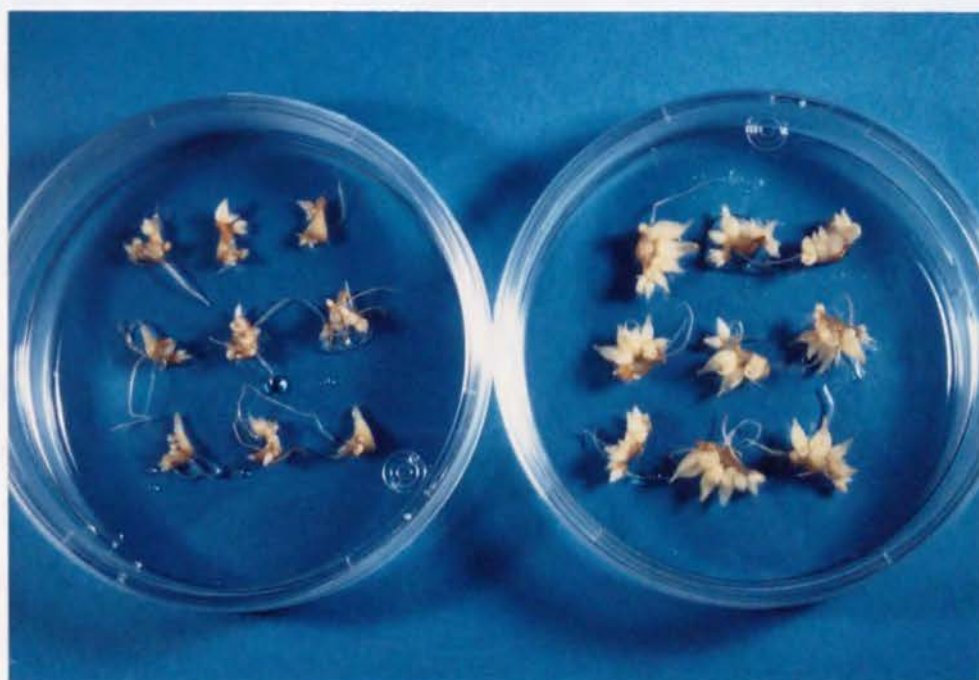
Table.39. Influence of the polarity of a scale on differentiation of bulblets in an aerated liquid culture of *L. japonicum*.

Part of the scale	No. of bulblets/scale segment		
	Culture period (weeks)		
	3	5	8
Apical part	0.0	0.2	1.9
Basal part	0.2	2.7	4.3

Culture medium : See Table 37.

Culturing conditions: The same as in Table 35 except for the concentration of O<sub>2</sub> (20.9% ambient air).

Culture materials : See Table 34.



Segments from apical part of scales

Segments from basal part of scales

Fig.46. Differentiation and growth of bulblets in an aerated liquid culture of segments derived from apical and basal parts of scales of *L. japonicum*. (Culture period : 8 weeks)

For culturing conditions, materials and medium : See Table 39.

8週間後の生育状況（第46図）を示した。基部切片では、培養3週の段階で既に子球の分化が認められ、分化した子球の数は、5週で2.7個、8週では4.3個にまで増加し、その平均球径は1.8mmとなった。一方、先端部切片での子球の分化は、培養5週の段階になって最初に認められ、培養8週の段階においても、分化した子球の数は1.9個であり、その子球の分化時期や肥大は、基部切片でのものと比較して遅れた。また、さらに培養がすすんだ時点での観察でも、先端部切片では子球の分化数がやや少ない傾向がみられた。

#### 第5項 液体通気りん片培養における子球の分化数と球径および培地養分の経時変化

液体通気培養において分化する子球の数とその平均球径について、培養期間中の経時変化を調べた。また、培地中の $\text{NO}_3\text{-N}$ 、 $\text{NH}_4\text{-N}$ 、 $\text{PO}_4$ 、K、Mg、Caおよび糖などの養分濃度についての経時変化も測定した。

#### 材料および方法

無菌球根の維持・増殖、実験材料とするりん片切片の作成と培地への投入、培地の滅菌、分化程度の調査基準などは第1項に準じた。培地も第1項の液体培地組成を基本とし、23℃、暗条件、毎分約9.6mlの通気速度で培養した。

子球増殖の経時変化に関する実験では、培養容器、培地量および培養切片数も第1項と同様であり、培地のNAA濃度を $0.01\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$ 、通気酸素濃度を20.9%（大気）とした場合とそれぞれを $0.1\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$ 、95%とした場合の2種類の条件で培養して調査した。なお、前者の培養条件での液体通気培養では、NAA  $0.01\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$ を添加した寒天培地50mlに対して18切片を置床した寒天培養も行ない、培養3、5および8週後の結果を比較した。後者の培養条件の場合、分化程度の調査は、培養3、5、8および13週後に行った。

また、培養中の養分の経時変化に関する実験では、容量100 mlの円筒ロート型ガラス濾過器（細孔記号G4）を用い、りん片18枚を上下に切断して得た切片を、NAA濃度を $0.01\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$ とした培地60mlで通気培養（酸素濃度20.9%（大気））した。培養1、2、3、4、5、6、8、10、13および15週間後に、各0.8 mlの培地をサンプリングし、培地中の養分濃度を以下の方法で測定した。無機イオン濃度は、富士平工業株式会社製の培養液分析セット（ハイドロテスタ）を用い、 $\text{NO}_3\text{-N}$ （亜鉛末還元アゾ色素法）、 $\text{NH}_4\text{-N}$ （インドフェノール法）、 $\text{PO}_4$ （マーフィー・ライリー法）、K（カリボール比濁法）、Ca（オルトクレゾール・フタレイン・コンプレキソン法）およびMg（ブリリアントイエロー法）について簡易分析した。糖濃度の分析は、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）により行った。分析方法は、アセトニトリル水（75:25）を移動相に、流速1ml/min、30℃の条件のもと、島津製作所製の示差屈折計検出器RID-6A

と株式会社ワイエムシイ製カラムYMC-Pack Polyamineを用いることによって行なった。

## 結果

大気通気の液体培養と寒天培養における子球分化の様子を、培養 8週まで調査・比較したところ、いずれの培養法においても、培養 3週頃から子球の分化が認められた。しかし、培養開始後、速やかに分化を始めた切片の割合は、寒天培養の方が多い傾向がみられ、また、培養 5週でのりん片当たり分化した子球数は、寒天培養で 4.0 個、液体通気培養で 2.2 個となった。培養 5週から 8週にかけては、逆に通気培養におけるりん片切片の方が子球を盛んに分化した。培養 8週後の観察では、液体培養と寒天培養での子球の分化数は、ほぼ同様となり、りん片当たりおよそ 8個の子球が得られた。

第47図には、通気酸素濃度 95%における培養 13週までのりん片からの子球の分化数と子球球径の平均の経時変化を示している。大気を通気した場合と同様、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週まで子球の数は増加した。しかし、培養 8週以後に切片から分化した子球の数は少なく、培養 1りん片当たりの分化子球数は培養 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、分化した子球の平均球径の経時変化をみると、培養 3～5週に分化した子球は生長・肥大したが、培養 5～8週にかけては、子球が盛んに分化してくるため、子球全体の球径の平均でみると、ほぼ一定となった。しかし、新たな子球の分化が少ないことによって、子球の総数がほとんど増加しなかった培養 8週以降も、その平均球径は大きくならなかった。

第48図と第49図に各無機イオン組成の初期濃度に対する残存割合の経時変化を示した。アンモニア態窒素とリン酸は速やかに減少し、特にリン酸でその傾向が著しく、培養 5週で培地から消失した。また、アンモニア態窒素は培養 8週でほぼ消失した。硝酸態窒素は、アンモニア態窒素が 10%台に低下した培養 6週頃から減少速度が速まった。カリウムは、切片からの子球の分化が少なくなる培養 8週頃から減少が顕著となり、マグネシウムの減少についても、やや遅れるものの同様の傾向がみられた。これらの養分は、培養 10週には初期濃度の 20～30%程度まで減少し、培養 13～15週で、ほぼ認められなくなった。しかし、カルシウムは、培養 15週を経過しても初期濃度の 80%以上が残存しており、特に、子球が盛んに分化する培養初期においても、その培地中の濃度はほとんど減少しなかった。

第50図には、培地中の糖濃度の経時変化を示した。培養 0週すなわちオートクレーブ直後においても、既にブドウ糖と果糖の存在が認められた。ショ糖は培養 2週以降急激に減少し、6週から 8週後には、培地からほぼ消失していた。一方、ブドウ糖と果糖は、ショ糖の減少につれて増加したが、ショ糖が培地から消失した後、減少を開始した。その結果、糖濃度をショ糖濃度に換算してみた場合、子球の分化が認められるようになる培養 4週頃からその濃度は減少し、培養 10週後の分析では、0.1%が残存しているに過ぎず、13週後には全くみられなかった。

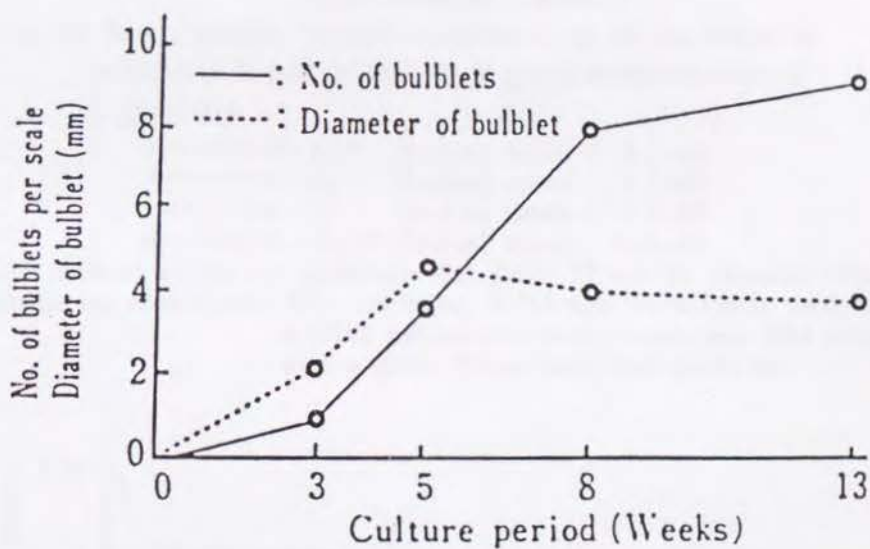


Fig.47. Weekly changes in differentiation and growth of bulblets in an aerated liquid culture of in vitro scale segments of L. japonicum.

Culture medium: The same as in Table 37 except for the concentration of NAA ( $0.1\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$ ).

For culturing conditions and materials: See Table 35 and Table 34, respectively.

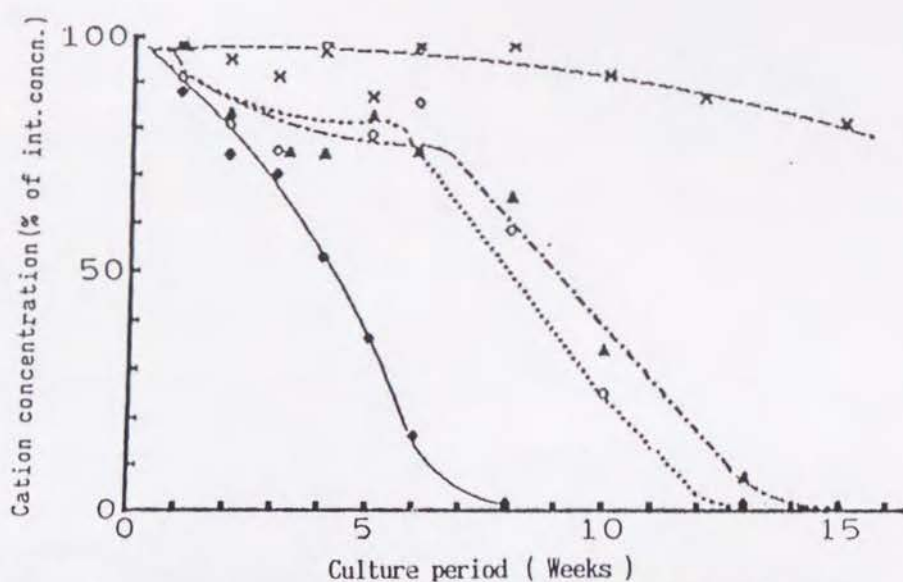


Fig.48. Weekly changes in cation concentration of the medium of an aerated liquid culture of *in vitro* scale segments of *L. japonicum*.

X---X :  $\text{Ca}^{++}$  (Initial concn : 2.3 mM)  
 ▲---▲ :  $\text{Mg}^{++}$  (Initial concn : 1.1 mM)  
 ○····○ :  $\text{K}^{+}$  (Initial concn : 14.9 mM)  
 ●—● :  $\text{NH}_4\text{-N}^{+}$  (Initial concn : 15.5 mM)

For culture medium and materials: See Table 37 and 34, respectively.  
 Culturing conditions: 23°C, darkness, 9.6ml·min<sup>-1</sup> aeration by ambient air, a 100ml cylindrical vessel (contained 60ml medium) with a glass filter (pore size grade;G4).

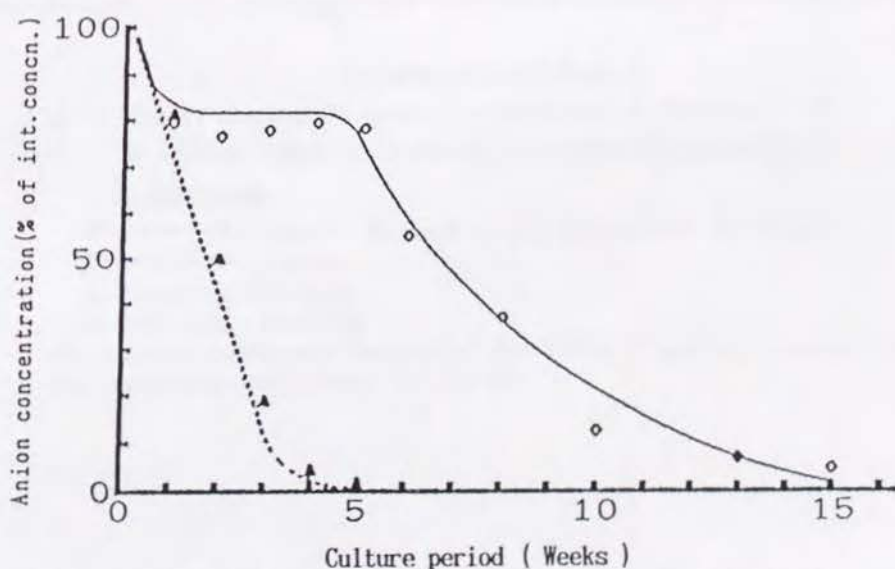


Fig.49. Weekly changes in anion concentration of the medium of an aerated liquid culture of *in vitro* scale segments of *L. japonicum*.

○—○ :  $\text{NO}_2\text{-N}^{-}$  (Initial concn : 29.6 mM)  
 ▲····▲ :  $\text{PO}_4^{---}$  (Initial concn : 0.9 mM)

For culture medium and materials: See Table 37 and 34, respectively.  
 For culturing conditions: See Fig.48.



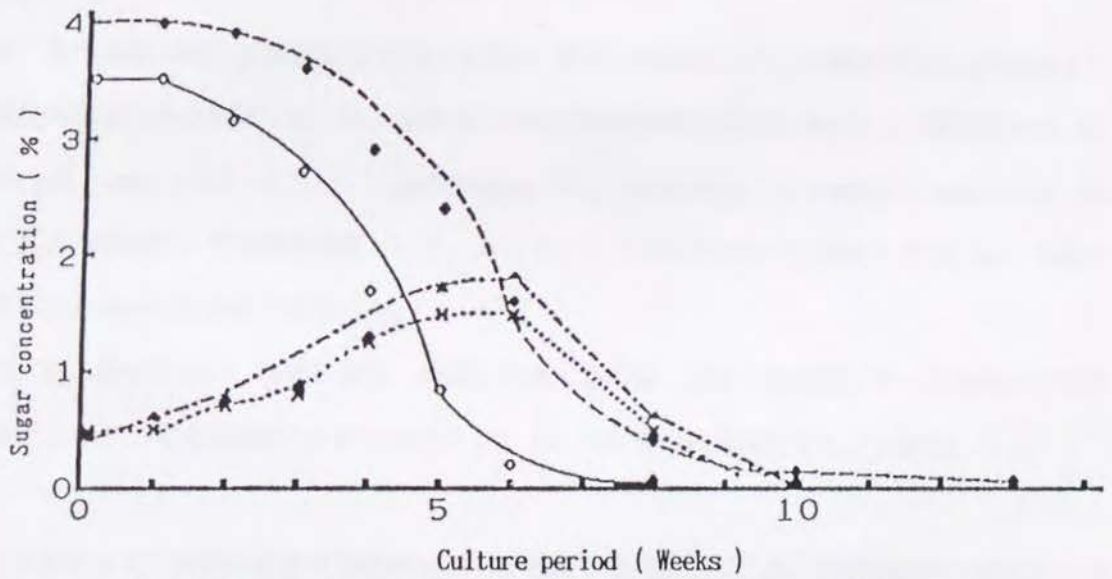


Fig.50. Weekly changes in sugar concentration of the medium of an aerated liquid culture of in vitro scale segments of L. japonicum.

- ◆-----◆ : Sugar ( Sucrose + 1/2 [Glucose + Fructose] )
- : Sucrose
- ▲-----▲ : Glucose
- ×-----× : Fructose

For culture medium and materials: See Table 37 and 34, respectively.  
For culturing conditions: See Fig.48.

## 第6項 液体振盪子球培養における子球の生育に及ぼす培地中のショ糖濃度と生長調節物質の影響

植物における分化と生長を考えると、それぞれの生育段階に適した条件が異なっていることが予想される。りん片切片からのユリ子球の分化と生長といった生育現象についても同様のことがいえるであろう。本項および次項では、りん片切片から分化した不定芽が子球へと生育した後の生長・肥大に適した条件について検討した。

### 材料および方法

第1項と同様にして寒天培養で維持・増殖した無菌球根を供試した。寒天培地上でのりん片培養8週後に得られた19~35mgの子球10球を用い、水平旋回(68rpm)した100ml フラスコ内の液体培地30ml中で液体振盪培養した。

NAAを除き、標準濃度のMS主要塩類組成を用いた以外、培地は第1項に記した液体培地組成を基本とした。ショ糖濃度の影響をみた実験では、NAAを除外した生長調節物質無添加培地中のショ糖濃度を40、60、80あるいは80、100、120g $\cdot$ liter $^{-1}$ とした。生長調節物質に関する実験では、ショ糖濃度を80あるいは100g $\cdot$ liter $^{-1}$ に高めた培地に、生長調節物質として、カイネチン0.5mg $\cdot$ liter $^{-1}$ とABA0.02、0.1mg $\cdot$ liter $^{-1}$ を、それぞれ単独あるいは組合せて添加した。

培養は23℃、暗条件で行ない、培養8週後、伸長した葉・根の数、長さや生体重、葉・根を除いた球根部位の生体重と大きさ、培養開始時の子球生体重を100としたときの球重増加率などを調査した。

### 結果

ショ糖濃度を变化させた実験の培養8週後の結果をまとめて第40表に示した。培養開始時における子球生体重に対する伸長した葉や根を除いた球根自体の生体重の増加率は、ショ糖濃度80g $\cdot$ liter $^{-1}$ と100g $\cdot$ liter $^{-1}$ の培地で800%以上になった。なお、これらの培地では、球径も6~8mmにまで肥大していた。また、いずれのショ糖濃度でも、平均1.5枚前後の葉を伸長していたが、その伸長程度は、ショ糖濃度が高まるほど小さくなる傾向がみられた。したがって、第37表に示したように、葉の生体重もショ糖濃度が高まるほど小さくなった。

カイネチンとABAを単独あるいは組合せて添加した培地での、培養8週後の結果を第41表に示した。

カイネチンを添加した場合、植物体全体の生体重の増加が大きく、培養開始時の子球生体重と比較して、1,700%以上にもなった。これらの植物体では、出葉数も増加し、それらの葉はやや肥大して厚かった。また、葉の生体重は100mg程度で、植物体生体重の約25%を占めていた。しかし、伸長している葉や根を除いた子球自体の生長も盛んであり、その子球部位だけでみた生体重の増加率は、約1,300%であった。一方、根の分化と伸長は、カイネチンによって抑制される傾向を示した。ABA0.02mg $\cdot$ liter $^{-1}$ を添加した場合、生長調節物質無添加のショ糖濃度80g $\cdot$ liter $^{-1}$ の培地での結果と比較して、植物体全体の生体

重、球根部位だけの生体重ともに小さくなった。また、伸長した葉の枚数やその伸長程度も減少する傾向があった(第41表および第51図:実験-1)。

カイネチン  $0.5\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$ にABA  $0.02\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$ を組合せて添加した場合、子球の肥大は良好であったが、伸長した葉も厚く、葉の生体重も大きくなった。一方、カイネチン  $0.5\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$ に ABA  $0.1\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$ を組合せて添加した場合、約1,300 %の子球生体重の増加が認められ、しかも、カイネチン単独添加培地でみられるような旺盛な葉の伸長や肥大をかなり抑制することができた(第41表および第51図:実験-2)。

## 第7項 液体振盪子球培養における子球の生育に及ぼす培養温度の影響

### 材料および方法

実験に供する子球の準備および液体振盪培養の方法は第6項に準じた。第6項の液体培地組成の生長調節物質をカイネチン  $0.5\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$ とABA  $0.1\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$ 、ショ糖濃度を  $80\text{g}\cdot\text{liter}^{-1}$ とした培地を用いた。暗条件で液体振盪培養中の培養容器の外気温を $18^{\circ}\text{C}$ 、 $23^{\circ}\text{C}$ および $28^{\circ}\text{C}$ とし、培養8週後、伸長した葉、根、葉や根を除いた球根部位の生体重、培養開始時の子球生体重を100としたときの球重増加率などを調査した。

### 結果

培養8週後の結果を第42表に示した。設定温度のうち、第3項において子球の分化に対して好適であった温度 $23^{\circ}\text{C}$ が、子球生体重を最も増加させた。しかし、子球の分化に対しては抑制的な影響のみられた $28^{\circ}\text{C}$ においても、子球の生長は順調に進み、その子球生体重は、培養開始時のものと比較して、856 %増加し、 $18^{\circ}\text{C}$ での球重増加率723 %を上回った。一方、 $28^{\circ}\text{C}$ では、子球からの出葉および出葉した葉の伸長が抑制された。

## 第2節 液体通気培養の実用化試験

前節では、培養プロセスを省力化でき、かつ、培養をスケールアップできる可能性が高い液体培養によるササユリ球根の増殖について検討し、りん片切片からの子球の分化と生長に適した培養条件を明らかにした。しかし、この培養技術を実用的なものとするためには、簡便な方法で培養材料となるりん片切片を得ることや、大きなスケールでも効率よく球根を増殖できることが必要である。

これまでにも、培養における増殖のスケールアップについては、培養容器として数ℓのジャーファーマンターを利用したニオイテンジクアオイ、イチゴ、グラジオラスなどでの試験結果が報告されている(73、

Table 40. Influence of sucrose concentration in the medium on growth of bulblets in a rotated liquid culture of *L. japonicum*. ( Culture period : 8 weeks )

Experiment	Sucrose concn (g·liter <sup>-1</sup> )	Initial FW of bulblet (mg)	Final FW of plantlet (mg) { Gain in weight (%) }		
			Root	Leaf	Bulblet
1	40	34.9	16.7	27.9	205.0 { 587.4 }
	60	34.9	17.5	24.4	276.5 { 792.3 }
	80	34.1	12.6	11.3	282.5 { 828.4 }
2	80	21.1	17.7	31.7	206.7 { 979.6 }
	100	21.4	8.4	15.4	165.6 { 819.8 }
	120	19.4	5.1	7.4	115.6 { 595.8 }

Culture medium : MS's macro-elements and Fe, RN's micro-elements and organics, pH 5.7,

40 ~ 120 g·liter<sup>-1</sup> sucrose.

Culturing conditions : 23 °C, darkness. 100 ml Erlenmeyer flask (contained 30 ml medium) with 10 bulblets, horizontal rotation of 68 rpm.

Culture materials : Each bulblet with 19 ~ 35 mg, produced through an agar culture of scale segments of 8 weeks, was isolated and cultured in liquid medium.

Prior to weighing of initial FW of bulblets, any existing leaves and roots were removed.

Table 41. Influence of kinetin and ABA in the medium with high sucrose concentration on growth of bulblets in a rotated liquid culture of *L. japonicum*. ( Culture period : 8 weeks )

Experiment	Growth regulator (mg·liter <sup>-1</sup> )	Initial FW of bulblet (mg)	Size of bulblet (mm)	Diameter	Height	No. of			Final FW of plantlet (mg) { Gain in weight (%) }			
						roots	length (cm)	leaves	Root	Leaf	Bulblet	Total
1 (suc. 8%)	-	25.2	6.9 × 4.7	10.4	4.9	1.5	1.7	1.9	8.6	13.5	165.1 { 696.6 }	187.2 { 789.9 }
	kin. 0.5	25.5	8.0 × 5.2	13.5	2.5	0.5	2.5	3.5	4.5	100.7	317.3 { 1284.5 }	422.5 { 1710.5 }
	ABA 0.02	26.2	5.5 × 4.0	8.6	4.2	0.9	0.7	0.5	4.3	1.7	102.0 { 380.6 }	108.0 { 403.0 }
2 (suc. 10%)	-	20.2	6.2 × 4.4	10.9	3.7	1.4	1.6	2.5	8.4	15.4	165.6 { 819.8 }	189.3 { 936.1 }
	kin. 0.5+ABA 0.02	21.4	7.5 × 5.4	12.9	0.4	0.3	1.3	2.4	0.1	42.6	281.4 { 1315.1 }	324.0 { 1514.6 }
	kin. 0.5+ABA 0.1	20.6	7.4 × 5.1	11.6	0.0	-	1.1	1.7	-	28.5	264.1 { 1282.0 }	292.6 { 1423.8 }

Culture medium : MS's macro-elements and Fe, RN's micro-elements and organics, pH 5.7, combination of kinetin with ABA as above, 80g·liter<sup>-1</sup> sucrose for exp.1 and 100g·liter<sup>-1</sup> sucrose for exp.2.

For culturing conditions and materials: See Table 40.

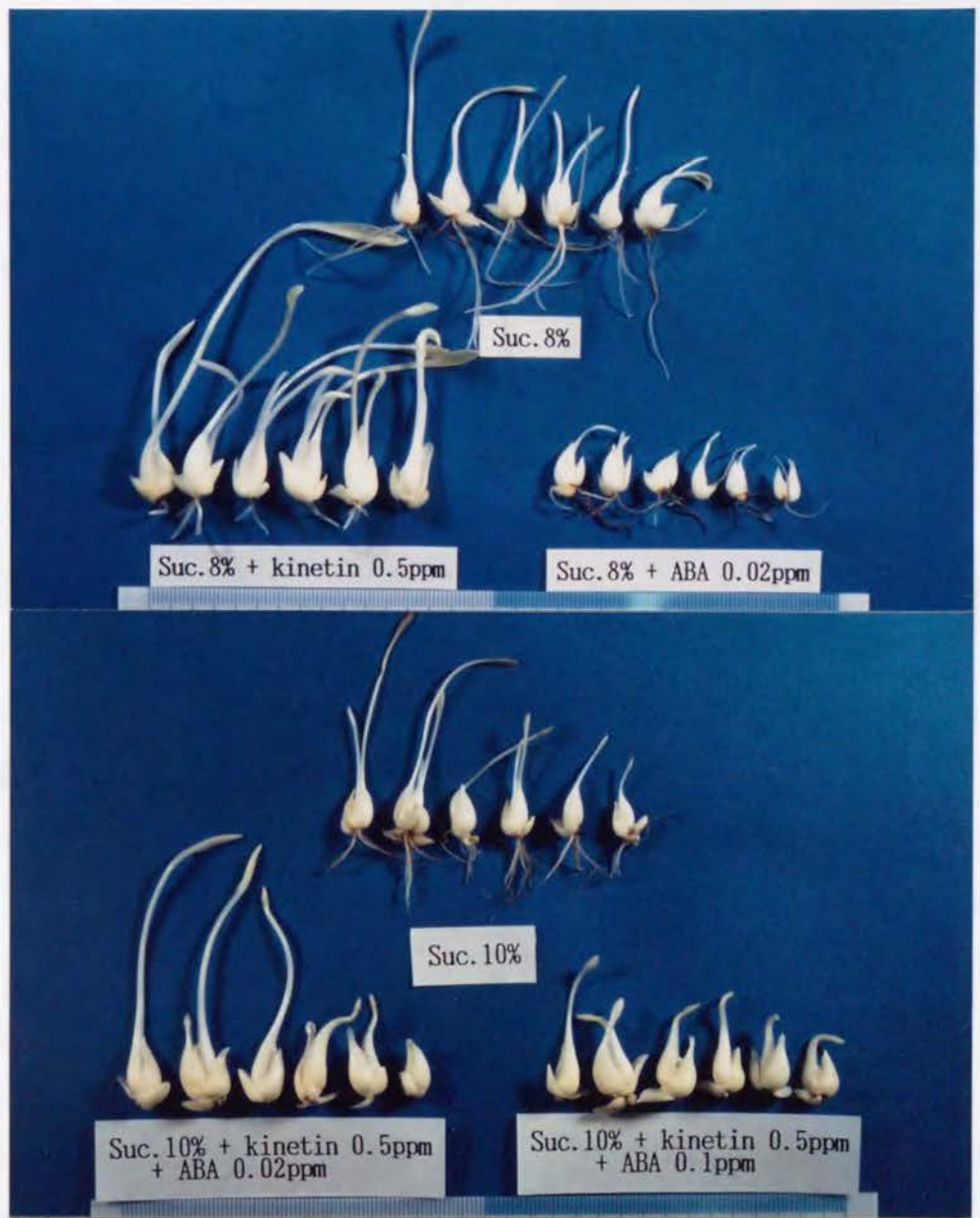


Fig. 51. Influence of Kinetin and ABA in the medium with high sucrose concentration on growth of bulblets in a rotated liquid culture of *in vitro* bulblets of *L. japonicum*. ( Culture period : 8 weeks )

For culture medium: See Table 41.

For culturing conditions and materials: See Table 40.

Table 42. Influence of temperature on growth of bulblets in a rotated liquid culture of *L. japonicum*. ( Culture period : 8 weeks )

Temperature (°C)	Initial FW of bulblet (mg)	Final FW of plantlet (mg) { Gain in weight (%) }			
		Root	Leaf	Bulblet	Total
18	13.2	0.2	12.2	95.5 { 723.5 }	107.9 { 817.4 }
23	14.5	0.0	18.8	149.4 { 1030.3 }	168.2 { 1160.0 }
28	13.8	0.0	4.3	118.2 { 856.5 }	122.5 { 887.7 }

Culture medium: MS's macro-elements and Fe, RN's micro elements and organics, 80g·liter<sup>-1</sup> sucrose, 0.5mg·liter<sup>-1</sup>kinetin, 0.1mg·liter<sup>-1</sup>ABA

Culturing conditions and materials: The same as in Table 40 except for temperature (18~28°C).

198, 200)。培養のスケールアップ用の培養槽についても、金属製タンクやこれらの実験のように既成の培養ジャーなどを使用すると、数ℓから10ℓ程度の培養スケールでもかなりの費用を必要とするので、簡易な培養槽を工夫して、設備コストを低減することが望まれる。本節では、以上のような観点から、子球ごとメスで切断して得た切片を培養材料として用いた場合や、簡易な切断道具を使用して一度に多数の子球を切断して切片を作成した場合の影響などを調べた。また、低コストの培養槽を製作するべく、市販のポリプロピレン製コンテナボックスの培養槽への転用の可能性を検討し、さらに培養のスケールを培地量 5 ℓ (培養槽容積10ℓ) にまで拡大して、ユリ球根を培養・増殖する実用的な技術の開発をめざした。

### 第1項 液体通気培養における培養切片からの子球の分化と生育に及ぼす培養切片作成方法および培養切片密度の影響

本項では、簡便な培養切片作成法の一つとして、子球をメスによって横方向に切断する方法を用い、子球から1枚ずつ分離したりん片を横方向に切断して得た切片での培養結果と比較した。

また、外植体の生長や器官分化に対して、外植体と培地量との比率すなわち外植体密度が影響を及ぼす場合がある。そこで、一定の培地量に対する培養球根数が、切断した球根切片からの子球の分化・増殖に及ぼす影響を調査した。

#### 材料および方法

本節の全ての実験項目に供試するユリとしては、ササユリを用いた。

前節と同様にして、70~90日間隔で継代しながら寒天培地上で維持・増殖した径5mm程度の無菌子球を用い、培養切片作成の材料とした。

培養切片作成方法の影響をみた実験では、無菌子球3球(合計320mg)から分離・採取したりん片8枚を横方向に約2mm幅で切断して得られた切片21個とそのりん片採取後に残った中心部の小球3個を培養に供した区(りん片切断試験区)および無菌子球3球(合計300mg)をメスにより横方向に約2mm幅で切断して得られた41個の切片を培養に供した区(球根切断試験区)を設定した。

培養切片密度の影響をみた実験では、同様にして球根のまま切断して培養する子球の数を、培地30ml当りに1、3、4および6球(それぞれの生体重156、472、621および912mg)まで変化させた。

通気培養の容器として、60mlの円筒ロート型ガラス濾過器(細孔記号G4、培地量30ml)を用いた。通気は家庭用小型エアープンプを用い、大気(酸素濃度、20.9%)を $9.8\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ の速度で0.2 $\mu\text{m}$ のマイレクスFGフィルター(日本ミリポア工業株式会社製)に通すことによって行なった。

培地には、主要塩類濃度をMS処方の標準濃度の3/4倍、鉄源をMS処方、微量元素および有機物質をRNの処方、ショ糖を $40\text{g}\cdot\text{liter}^{-1}$ とし、切片作成法に関する実験では生長調節物質としてNAA  $0.01\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$

を添加し、培養密度に関する実験では生長調節物質無添加とした後、pH5.7 に調整したものをを用いた。

培養は23℃、暗条件で行なった。分化程度の調査基準は、切片から分化したコブ状の組織を突起物、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て球根の形状が認められたものを子球とした。

## 結果

培養切片作成法を比較した実験において、各切片から子球の分化が認められるようになる時期は、りん片切断区で培養3週間目頃、球根切断区で4～5週間目頃以降であることが観察され、りん片を子球から分離・切断して培養した方が、子球の分化は1～2週間早かった。第43表に示したように、培養10週間で子球を分化していた切片の割合は、りん片切断区では100%、球根切断区では78%となり、球根切断区の方が劣った。子球の肥大に関しても、分化した子球のうち、球径2mm以上あるいは球重10mg以上のものの割合が、それぞれ、りん片切断区では79%、59%であるのに対し、球根切断区では、42%、32%となり、子球分化の場合と同様の傾向を示した。しかし、球根切断区では、培養に供する切断切片数が多く得られたため、培養3球根あたりに形成された子球の総数でみると、りん片切断区で得られた子球総数よりも増加し、球径1mm以上のもも含めた球根増殖倍率（培養1球根当たりの分化球根数）は24倍となった。

培養切片と培地量の比率の影響をみた実験では、第44表に示したように、生長調節物質無添加培地を用いたため、突起物の分化と突起物からさらに子球まで生育するものが少なかった。試験設定した培養球根切片量約5～30mg/培地1mlの範囲において、培養8週後での切断した球根1球当たりの分化子球数（球根増殖倍率）は、培養切片量の増加につれて、5.0球（5.0倍）から6.8球（6.8倍）と、やや増加する傾向がみられた。したがって、同じ培地量30mlの培養容積内で生産される子球数で比較すると、およそ30mg/ml（6球/30ml）の培養切片量の試験区で、最も多数の子球が得られ、約40球が生産できた。なお、第3項での培養試験の観察結果から、培地交換を行ない、その後、培養をさらに続けると、分化した突起物の多くが子球へと生長してくる傾向が認められている。そこで、切断して培養した1球根当たりの突起物を含む全ての分化点数で、その生産性を比較した場合、培養切片約16mg/ml（3球/30ml）の試験区の分化点数が、切断球根1球当たり約41個となり、その前後の培養切片量で得られた分化点数よりも多かった。

## 第2項 簡易培養槽による液体通気培養

### 材料および方法

第1項と同様にして、70～90日間隔で継代しながら寒天培地上で維持・増殖した径5mm程度の無菌子球90～100球（生体重合計の平均：12.8g）をメスにより約2mm幅で横方向に切断して、培養材料となる切

Table 43. Differentiation and growth of bulbets from *in vitro* bulb- or scale-segments in an aerated liquid culture of *L. japonicum*. ( Culture period : 10 weeks )

Preparation method of culture segments	No. of cultured segments	% of differentiating bulbets	Total no. of differentiated bulbets	Distribution of diam (mm) of bulbets (%)					Avg FW of bulbets (mg)	Distribution of FW(mg) of bulbets (%)					Propagation rate of bulbets		
				1	2	3	4	5		<10	10	25	50	75		100	
Cutting * whole in vitro bulbets	41 segments from 3 <i>in vitro</i> bulbets (total FW:300mg)	78.0	73	1.8	57.6	35.6	4.1	2.7	0.0	10.3	67.7	25.0	5.2	1.1	0.0	1.1	24
	21 segments from 8 scales of 3 <i>in vitro</i> bulbets and their residual inner tissues (total FW:320mg)	100.0	57	2.5	26.3	47.4	17.5	5.3	3.5	18.2	40.7	44.0	8.5	3.4	1.7	1.7	19

\* No. of differentiated bulbets / no. of cultured *in vitro* bulbets.

Culture medium : 3/4 strength of MS macro-elements, MS<sup>2</sup> sfe, RN's micro-elements and organics, 0.01mg·liter<sup>-1</sup>NAA, 40g·liter<sup>-1</sup>sucrose, pH 5.7.

Culturing conditions : 23 °C, darkness, 9.6 ml·min<sup>-1</sup> aeration by ambient air, a 50ml cylindrical vessel (contained 30 ml medium) with a glass filter (pore size grade:G4).

Culture materials : \* Three whole *in vitro* bulbets were cut horizontally at intervals of about 2 mm. The obtained 41 bulb-segments were cultured.

\* Eight scales collected from 3 *in vitro* bulbets were cut horizontally at intervals of about 2mm. The obtained 21 scale-segments and 3 residual inner tissues of the bulbets were cultured.

Table 44 . Influence of number of cultured bulbets to volume of a medium on differentiation and growth of bulbets in an aerated liquid culture of *L. japonicum*. ( Culture period : 8 weeks )

No. of bulbets/30ml medium (FW, mg of segments/ml medium)	No. of protuberances and buds per cultured bulbet	No. of differentiated bulbets per cultured bulbet	Total no. of differentiated bulbets	Avg diam of differentiated bulbets (mm)
1	19.0	5.0	( 5.0 )	1.8
3	35.3	5.7	( 17.1 )	2.3
4	24.6	6.1	( 24.4 )	2.4
6	21.2	6.8	( 40.8 )	2.0

Culture medium : The same medium as in Table 40 except for no addition of NAA.

Culturing conditions and materials : The same as in Table 40 except for number of cultured bulbets (1 ~6 per 30ml medium).



断切片を得た。

通気培養の容器として、物品収納用の市販のポリプロピレン製コンテナボックスを利用・作製した容積 3 ℓ の簡易培養槽を用いた。簡易培養槽の作製は、以下のようにして行なった。ポリプロピレン製のチューブコネクタ（ストレート型、T型、L型）を利用して、コンテナボックスに通気用のシリコンチューブ（4×7mm）を挿入し、液体クロマトグラフィー用の部品であるステンレス製溶液フィルター（ジーエルサイエンス株式会社製、径12mm、長さ30mm、エレメント10μm）を2個あるいは6個取り付け、シリコンチューブの挿入口とボックスの蓋部分に存在する空隙は、シリコンゴムでシールした。また、ステンレス製メッシュにより籠を編み、これをコンテナ内に設置して培養切片の容器とした（第52図）。

通気は家庭用小型エアポンプを用い、大気を  $480\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$  の速度で  $0.2\mu\text{m}$  のマイレクスFGフィルター（日本ミリポア工業株式会社製）を通すことによつて行なった。また、培地中の溶存酸素の飽和酸素量に対する割合を、培養開始時の切断切片を投入する前の培地だけの状態および培養終了時の子球が分化・生育した状態で、ハンディ溶存酸素メーター OM-14（株式会社堀場製作所製）を用い、培養中と同様に通気しながら測定した。

培地には、生長調節物質として  $\text{NAA } 0.01\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$  を添加した以外、第1項と同じ培地組成のものを用いた。培地量は 1.5ℓ とし、培養 9週間の時点で、生長調節物質を除き、しょ糖濃度を  $80\text{g}\cdot\text{liter}^{-1}$  に高めた上記の培地を用い、培養に使用中の培地と交換した。

培養条件は第1項に準じ、培養16週後、分化した子球数、子球径および子球生体重を調査した。子球総数は、培養終了時に得られた生育組織の生体重の25%をサンプリングし、第1項の基準で数えた子球の数から算出した。

## 結果

培養16週間後の結果を第45表に示した。簡易培養槽を用いた場合でも、球根切断切片からの子球の分化と生育が認められた。子球と認められるもの（球径1mm以上）全てを合計すると、約2,000球が生産できたものと算出され、その場合の球根増殖倍率は約20倍となった。得られた子球の約45%が球径5mm以上あるいは球重100mg以上であり、平均球径は5mm弱、平均球重は100mg強となった。このように、安価で簡便な培養槽を利用して球根を増殖できることがわかった。また、フィルター数を2個あるいは6個にしたいずれの試験区においても、球根増殖倍率や分化した子球の生育に差は認められなかった。

なお、培地中の溶存酸素の飽和酸素量に対する割合についてみると、培養開始時の切断切片を投入する前の培地だけの状態で測定した場合、フィルター2個の培養槽では92~97%、フィルター6個の培養槽では、ほぼ100%の値が得られた。一方、培養終了時の子球が分化・生育した状態で測定した場合の溶存酸素の飽和値に対する割合は、測定位置で異なるものの、いずれも低下していた。すなわち、フィルタ

2個を設置した培養槽では、フィルターの直上付近の子球の集積がやや少なくなっている位置で77~90%、子球がかなり集積している培養槽の四隅付近が62~66%であり、フィルター6個の培養槽では、フィルターの直上付近が84~93%、同じく四隅付近が75~83%となっていた。

### 第3項 簡易培養槽を用いた培養のスケールアップ試験

前項において、物品収納用の市販のポリプロピレン製のコンテナボックスを利用した簡易培養槽を用いても、ガラス濾過器を用いた培養と同様に子球を分化・増殖できることが分かったので、簡易培養槽の容積と培地量をさらにスケールアップして、通気培養による球根増殖の実用化試験を行なった。

#### 材料および方法

第1項と同様にして、70~90日間隔で継代しながら寒天培地上で維持・増殖した径5mm程度の無菌子球合計300球(生体重60g)を、簡易切断用具によって、約20球ずつ一度に切断して培養材料となる切断切片を得た。簡易切断用具は、中央で分割したシリコンゴム栓(23番)の切断面に入れた約2mm間隔の切れ目に、刃厚0.25mm、刃の長さ8.5cmのカッターナイフの替刃(合計21枚)の両端を挿入し、さらに、シリコンゴム栓の外側に把手用のスパチュラを挿入して作製した(第53図)。

通気培養の容器には、通気用のステンレス製溶液フィルターを4個取付けた以外、第2項と同様に、物品収納用の市販のポリプロピレン製コンテナボックスを利用して作製した容積10ℓの簡易培養槽を用いた。通気は家庭用小型エアポンプを用い、 $1,000\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ の速度で0.2 $\mu\text{m}$ のマイレクスFGフィルター(日本ミリポア工業株式会社製)を通すことを行なった。

培養条件は第1項に準じ、10週間および24週間の培養を行なった。24週間の培養を行なった実験では、培養13週間の時点で第2項と同様にして培地交換を行った。

培養開始時の子球分化用および培養途中で交換する子球肥大用の培地組成は、それぞれ第2項と同様であり、培地量は5ℓとした。

培養終了後、分化した子球数、子球径および子球生体重を調査した。子球総数は、培養終了時に得られた生育組織の生体重の15%をサンプリングし、第1項の基準で数えた子球の数から算出した。

#### 結果

培養10週間後と24週間後の結果を第46表にまとめて示した。

培養10週間後に得られた培養切片の状態を観察すると、切断の際、りん片の基部が子球から切り離されずに子球底盤部に付着したままになっているものが多くあった。このような切片では、底盤部の中心部位に残った子球生長点が生育し、大きな子球を形成しているものが多数みられ、底盤部に付着した状態のりん片基部からの子球分化はほとんどみられなかった。したがって、培養10週間後の培養結果から得られた

球径1mm 以上の子球数は約2,700 球、その球根増殖倍率は 9倍であり、第1項におけるガラス濾過器を用いた球根切断区の培養結果と比較して低くなった。しかし、その球径や球重からみた子球の肥大はかなり早く、50mg以上の球重の子球が既に50%近くを占めていた。

一方、24週間の培養を行なったものでは、培養13週間目での培地交換後、培養期間がすすむにつれて、切片の突起状に肥大した部位から新たに子球が分化してきた。さらに、底盤部中心部位付近の、培養初期から生長を開始した大きな子球を取り巻く底盤部付着りん片の基部からも、小さな子球が分化してきた。その結果、培養24週間後の調査では、球根増殖倍率が15倍にまで向上し、球径1mm 以上の子球が約 4,500 球生産できた。また、得られた子球の80%は球径3 mm以上、球重50mg以上であった(第54図)。

### 第3節 液体通気培養球根の栽培による成球(開花株)生産の検討

第II章第4節では、第I章、第II章の培養実験の結果をもとに、固体(寒天)培地上での茎頂組織の培養に由来する球根を、りん片培養および子球培養によって、さらに増殖・肥大させ、その培養球根の鉢栽培における生育・開花、球根収量などについて調査した。さらに、本章の第1節と第2節では、ユリ球根の実用的な大量増殖技術の開発を目的に、ササユリを培養材料として実験をすすめ、簡易培養槽を利用し、液体通気培養を行なうことによって、組織培養による子球の大量生産が実行的に行なえる可能性を見出した。

本節では、この簡易培養槽を用いた液体通気培養による大量生産技術で増殖したユリ培養球根を用い、球根の冷蔵およびジベレリン(GA<sub>3</sub>)浸漬処理が土壌へ移植した後の生育に及ぼす影響や球根の肥大と開花との関係を調査し、培養球根を利用した栽培による成球(開花株)生産の可能性を検討した。

なお、大量増殖技術の実用化を目的に、培養方法の簡便化とそのスケールアップを試みた本章第1節、第2節で供試したササユリは、球根の増殖・養成や栽培に関する研究が少なく(169,203,204,205)、その球根や切り花の出荷は山採りに頼られており、個体数の減少のみならず自生地の荒廃も心配されている(168,175)。このような状況において、ササユリの増殖および栽培技術確立の要望が強く、本章のはじめに記したように各地で組織培養を利用した球根増殖が試みられ、また、培養球の鉢上げ後の生育についてもいくつか報告されている(41,95,135)。しかし、現時点では、培養球根を利用して、ササユリ開花株を実際に生産している例は、筆者の知るかぎりではみられない。したがって、培養によって大量増殖したササユリ球根の栽培化を可能にすることは、自生地の保全や栽培産地における新たな栽培品目数の増加といった面からも大きな意義がある。

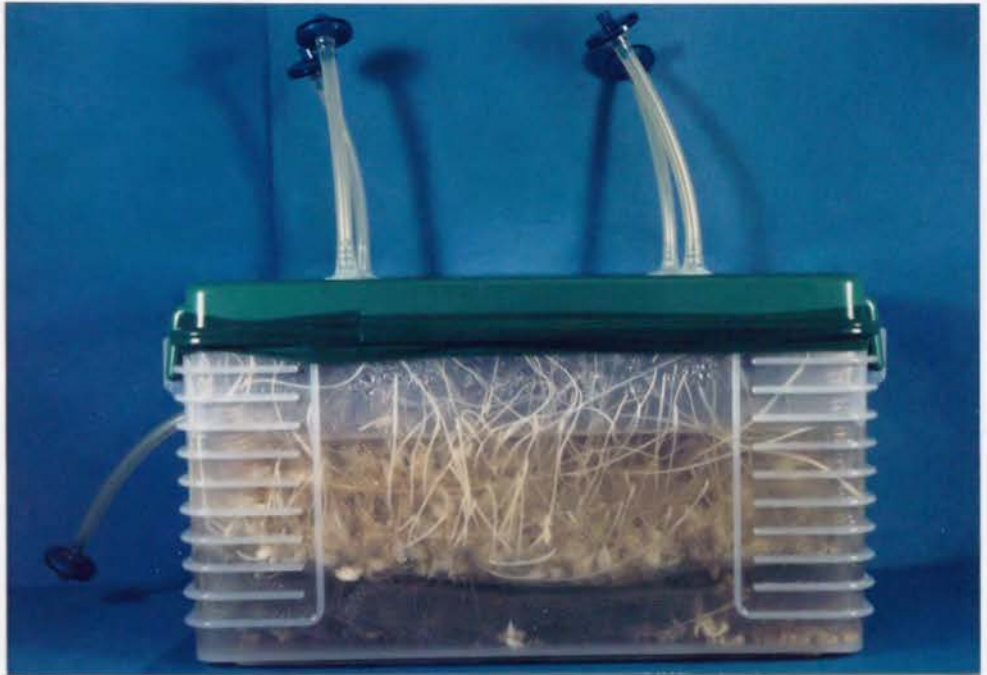


Fig. 52. Aerated liquid culture using a simplified polypropylene culture box.

Table. 45. Influence of number of aeration filters on differentiation and growth of bulblets in an aerated liquid culture of *in vitro* bulb segments of *L. japonicum*.  
( Culture period : 16 weeks )

No. of aeration filters <sup>z</sup> <i>in vitro</i> bulbs	No. of cultured differentiated bulblets	Avg diam of bulblets (mm)	Distribution of diam (mm) of bulblets (%)					Avg FW of bulblets (mg)	Distribution of FW (mg) of bulblets (%)					Propagation rate of bulblets			
			1 ≤ ~<2	2 ≤ ~<3	3 ≤ ~<4	4 ≤ ~<5	5 ≤ ~<10		10 ≤ ~<20	20 ≤ ~<30	30 ≤ ~<40	40 ≤ ~<50	50 ≤ ~<100		100 ≤ ~<200	200 ≤ ~<300	300 ≤ ~<400
2	90	1,989	4.9	2	12	18	23	45	0	109.0	24	30	35	9	1	1	22
6	100	2,126	4.7	3	9	19	23	46	0	108.2	23	32	35	8	1	1	21

<sup>z</sup> A stainless steel filter prepared for liquid chromatography ( 12 mm diam., 30 mm length, 10 μm element ) was used. <sup>y</sup> See Table 40.  
Culture medium : Initial medium was the same as in Table 40.

Second medium was the same as in Table 40 except that concn of sucrose was raised to 80g·liter<sup>-1</sup> and NAA was excluded.  
Initial medium was exchanged for the second one in the 9th week of culturing.

Culturing conditions : The same as in Table 40 except that a 3-liter polypropylene container with 1.5 liter medium was used and aeration was done at 480 ml·min<sup>-1</sup>.  
Culture materials : Each number of *in vitro* bulbs were cut horizontally at intervals of about 2 mm. The obtained bulb-segments were cultured.

Table. 46. Differentiation and growth of bulblets in an aerated liquid culture of *in vitro* bulb segments of *L. japonicum* using a 10-liter container<sup>z</sup> with 5 liters of medium.

Culture period (weeks)	Total no. of differentiated bulblets	Avg diam of bulblets (mm)	Distribution of diam (mm) of bulblets (%)					Avg FW of bulblets (mg)	Distribution of FW (mg) of bulblets (%)					Propagation rate of bulblets		
			1 ≤ ~<2	2 ≤ ~<3	3 ≤ ~<4	4 ≤ ~<5	5 ≤ ~<10		10 ≤ ~<20	20 ≤ ~<30	30 ≤ ~<40	40 ≤ ~<50	50 ≤ ~<100		100 ≤ ~<200	200 ≤ ~<300
10 <sup>x</sup>	2,698	3.7	16	26	22	14	22	0	91.2	53	24	9	7	5	2	9
24 <sup>w</sup>	4,487	5.9	12	6	7	10	57	8	204.6	20	15	36	16	8	11	15

<sup>z</sup> 4 aeration filters were set in the container. <sup>y</sup> See Table 40.

Culture medium : <sup>x</sup> The same as the first medium in Table 42.

<sup>w</sup> The same as in Table 42 except that the second medium was exchanged in the 13th week of culturing.  
Culturing conditions : The same as in Table 40 except that a 10-liter polypropylene container with 5 liter medium was used and aeration was done at 1,000 ml·min<sup>-1</sup>.

Culture materials : Three hundred *in vitro* bulbs were cut at random with a simple cutting instrument with several razor blades spaced about 2mm apart. The obtained bulb-segments were cultured.

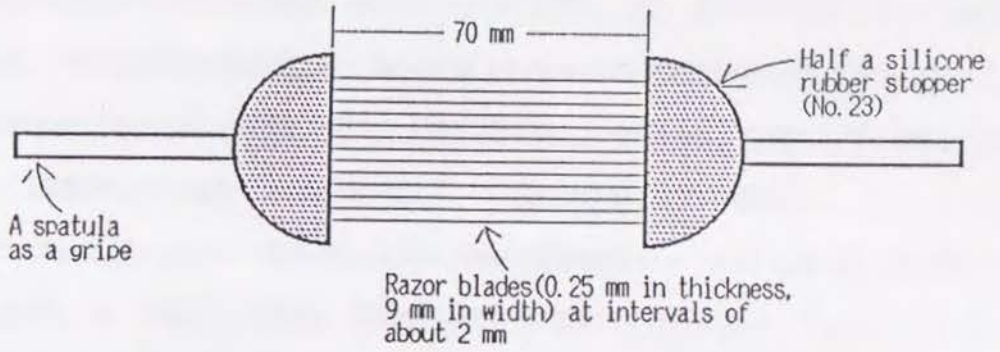


Fig. 53. Sketch of a simple cutting instrument.



Fig. 54. Mass-production of bulblets of *L. japonicum* in an aerated liquid culture using a 10-liter container with 5 liters of medium.

( Culture period : 24 weeks)

For culturing conditions, medium and materials: See Table 47.

## 第1項 通気培養球根の出葉と初期生育に及ぼす冷蔵処理とGA<sub>3</sub> 浸漬処理の影響

### 材料および方法

前節第2項および第3項の方法に従い、寒天培地でのりん片培養で維持・増殖したササユリの無菌小球根を切断し、容積 3あるいは10ℓの簡易培養槽で、5~6 か月間、その切片を液体通気培養して得た球根を供試した。培養槽から取り出した供試球根は、水道水で十分に洗浄した後、葉や根を形成している場合は、それらを切除した。本項の液体通気培養には、寒天培地上のりん片培養で子球を分化・増殖していく過程において、出葉があまりみられない子球（以下、「難出葉球根」）を用いた。対照として、寒天培地でのりん片培養中に、出葉がしばしばみられる子球（以下、「易出葉球根」）も準備した。

冷蔵処理は、厚さ0.02mmのポリエチレン袋あるいは90×20mmの深型滅菌シャーレに入れた湿ったパーミキュライトに球根を混ぜ、4、8および12週間、4℃の冷蔵庫内に置いて行なった。

ジベレリン (GA<sub>3</sub>) 浸漬処理は、新美ら (131)の方法に従って行なった。GA<sub>3</sub> を少量の99.5 %エタノールで溶解後、蒸留水で所定濃度 (100,200 および300mg·liter<sup>-1</sup>)に希釈した。得られたGA<sub>3</sub> 溶液20mlを含む容積50mlのピーカーに供試球根を12球入れ、23℃・暗黒で24時間、水平旋回 (約70rpm)した。

冷蔵処理とGA<sub>3</sub> 浸漬処理を併用する場合、冷蔵処理終了後、直ちに球根を水道水で洗浄してパーミキュライトを除いた後、GA<sub>3</sub> 浸漬処理を行なった。

出葉試験のため、無処理あるいは処理球根の生体重を測定した後、各試験区に12球ずつ供試した。それぞれセルトレイの各 1穴 (30mm×30mm×深さ55mm) に 1球を植え付け、20℃・20,000lx・16時間照明のインキュベーター内で栽培した。なお、一部の冷蔵処理球根で、発根しつつあるものがみられたが、生体重測定の際、これらの根を切除した。

本出葉試験を含む全ての栽培試験の用土には、赤玉土：バーク堆肥：パーライト：砂=3.5: 3: 1: 1 (容積比)に化成肥料 (N10 : P 8 : K10 ) を 2g·liter<sup>-1</sup> の割合で混合したものをを用いた。出葉試験のための栽培期間は、無冷蔵球根では16週間、冷蔵処理した球根では、その冷蔵期間だけ短縮して、冷蔵12週間処理の場合、4週間の栽培を行なった。栽培中、適宜、灌水し、追肥は行なわなかった。栽培開始後、1週毎に出葉の有無を調査し、栽培期間終了後、各区無作為に 6個体ずつ抜き取り、植物体全体および葉と根を切除した後の球根の生体重、葉数、最大葉長・葉幅、根数、根長を測定した。また、植物体と球根の生体重の増加率 ( (それぞれの抜き取り時の生体重/セルトレイに植え付けた球根の生体重) × 100 ) も算出した。

### 結果

冷蔵処理球根とGA<sub>3</sub> 浸漬処理球根の出葉試験終了時の出葉率、その出葉率に到達するまでに要した栽培期間 (週数) および抜き取り調査した個体の生育調査結果の平均を、まとめて第47表に示した。

## 1) 冷蔵処理期間の影響

冷蔵処理の終了時、12週間処理球の一部で、発根を開始し、わずかに根を伸長しつつあるものがあった以外、処理球根からの出葉や発根はみられなかった。

セルトレイに植え付けた無冷蔵あるいは4週間冷蔵処理した「難出葉球根」は、それぞれ、出葉試験を終了した栽培16、12週間後でも出葉せず、その球根重もほとんど増加しなかった。8 および12週間冷蔵処理した球根の場合、それぞれ栽培2週間後と1週間後に、全ての球根で出葉がみられた。これらの球根では、出葉試験終了時、植え付け時の球根重と比較して、その球根部位だけの生体重はほとんど増加しなかったが、伸長した葉や根も含めた植物体全体の生体重でみると、200～250%増加した。一方、「易出葉球根」を冷蔵した場合、「難出葉球根」では出葉しなかった冷蔵処理期間4週間のものでも、出葉がみられた(第55図)。すなわち、4週間冷蔵処理した「易出葉球根」では、セルトレイでの栽培2週で出葉が認められ、栽培4週間後に、その最終出葉率92%に達した。

## 2) GA<sub>3</sub> 浸漬処理濃度の影響

「難出葉球根」をGA<sub>3</sub> 100, 200 および300mg·liter<sup>-1</sup> 溶液で浸漬処理すると、無冷蔵の場合でも球根からの出葉が促進され、それぞれの処理濃度で、栽培4週間後、2週間後および2週間後には出葉率100%に達した。また、「難出葉球根」を4週間冷蔵処理しても、栽培試験期間中に発葉はみられなかったが、GA<sub>3</sub> 200 mg·liter<sup>-1</sup>溶液での浸漬処理を組合せた場合、栽培3週間後には出葉率が100%となった。また、GA<sub>3</sub> 浸漬処理球根は、植え付け時の球根重と比較して、出葉試験終了時の球根部位の生体重が123～131%増加し、無冷蔵あるいは4週間冷蔵処理球根より生育が旺盛であった。しかし、葉の生長や根の分化・伸長についてみると、GA<sub>3</sub> 浸漬処理球根は、8週間の冷蔵処理をした球根と比較して、やや劣っていた。

## 第2項 通気培養球根の栽培による開花株生産

### 材料および方法

従来の球根栽培の場合と同様、以下の栽培試験においても、培養球根から成球を養成するための第1回目、第2回目、第3回目の栽培および、その結果得られた球根を、それぞれ第一作目、第二作目、第三作目および一作球根、二作球根、三作球根とした。

### 1) 第一作目の生育に及ぼす土壌移植前の培養球根の冷蔵処理およびGA<sub>3</sub> 浸漬処理の影響

冷蔵処理とGA<sub>3</sub> 浸漬処理の影響についての試験に供試する球根は、第1項で冷蔵処理あるいはGA<sub>3</sub> 浸漬処理し、出葉試験を行なった培養球根を用いた。1992年3月19日、出葉試験終了時に掘り上げ調査を行なわなかった個体を、セルトレイから抜き出して3号のポリ鉢に各1球ずつ移植した。栽培はサイドを寒冷沙で被覆した鉄骨ビニルハウスで行なった。夏期はサイドのビニルを巻き上げ、40%の遮光を行なった



Table 47. Influence of the length of cold-storage of *L. japonicum* bulblets\* with or without immersion in GA<sub>3</sub> solution on the time of first leaf emergence and the subsequent growth of plantlets.

4°C cold-storage period (wks)	Treatment		% of bulblets with leaf emergence	Wks to 100% emergence	Increase (%) of FW of harvested bulblets* to that of transplanted bulblets <sup>w</sup>	Increase (%) of FW of harvested plantlets* to that of transplanted bulblets <sup>w</sup>	Avg growth of plantlets after 4 ~ 16 weeks in cultivation			No. of roots	Max. length of leaves (cm)	Max. width of leaves (cm)	No. of roots	Max. length of roots (cm)
	GA <sub>3</sub> solution (mg·liter <sup>-1</sup> )	Cultivation period after transplanting (wks)					No. of leaves	Max. length of leaves (cm)	Max. width of leaves (cm)					
0	0	16	0	-	105	122	0	-	-	-	-	2.5	4.7	
0	100	16	100	4	124	197	1.1	2.2	0.5	2.2	0.5	5.0	7.6	
0	200	16	100	2	131	195	1.8	2.2	0.5	2.2	0.5	4.3	6.8	
0	300	16	100	2	130	201	2.2	2.6	0.5	2.6	0.5	4.8	7.8	
4	0	12	0	-	92	110	0	-	-	-	-	3.3	3.4	
4	200	12	100	3	123	232	1.5	2.9	1.0	2.9	1.0	5.2	7.5	
8	0	8	100	2	116	261	1.5	5.0	1.5	5.0	1.5	5.2	7.1	
8	200	8	100	2	130	286	1.8	4.8	1.4	4.8	1.4	4.8	6.3	
12	0	4	100	1	84	209	2.1	5.2	1.4	5.2	1.4	5.3	5.6	

\* Bulblets were produced from excised bulb segments in an aerated liquid culture of 3 or 10 liters for 5 to 6 months. The bulblets were kept at room temperature or at 4°C before being dipped in water or 20ml of GA<sub>3</sub> solution for 24 hr.

<sup>w</sup> Prior to weighing the bulblets, any existing roots were removed. Average fresh weight of the bulblets in each treatment was between 164 ~ 204 mg. Twelve bulblets in each treatment were transplanted in a cell tray (cell volume; 30mm × 30mm × 55mm height) and leaf emergence from them was observed weekly.

<sup>x</sup> Six bulblets in each treatment were sampled at random at the end of cultivation period and their growth was observed. Harvested bulblets had their leaves and roots excised before being weighed.

<sup>y</sup> Fresh weight of harvested plantlets was the total of fresh weight of three parts (bulblets, leaves and roots).



Fig.55. Influence of cold-storage duration on leaf emergence of *in vitro* propagated bulblets of *L. japonicum* after transplanting in soil.

From left to right : 0/16, 4/12, 8/8 and 12/4 (Groups of 3 bulblets after weeks of cold-storage/cultivation in soil).

Upper row : bulblets with leaves emerging during *in vitro* culture.

Lower row : bulblets with no leaves emerging during *in vitro* culture.

For cold storage and transplanting to soil in a cell tray : See Table 47.

が、ハウス内の気温は40℃を超えることもあった。追肥として、ハイポネクス1,000 倍液を 4月から月 2 回与え、また、適宜、殺虫剤としてスミチオン、マラソン、オルトラン、殺菌剤としてベンレート、トップジンM、マンネブダイセン、ダコニールを、それぞれローテーションしながら組合せて散布した。1992 年 9月17～19日に球根を掘り上げ、球周を測定した。

## 2) 第一作目の生育に及ぼす培養球根重量の影響

第1項の方法に準じ、同数程度に混合した「難出葉球根」と「易出葉球根」を切断して得た切片を、液体通気培養した。形成された球根の生体重を、根や葉を切除した後に測定し、25mg以上600mg 未満の範囲にあったものを供試した。

供試球根は、無冷蔵のままで1992年 9月14日に、また、第1項と同様に12週間冷蔵処理して1992年12月 9日に、それぞれ 3号ポリ鉢に各 1球を直接鉢上げし、サイドを寒冷沙で被覆した鉄骨シクスライト仕様ハウスで栽培した。換気温度を25℃とし、12 月10日から最低温度15℃に設定して加温したが、ハウス内の気温は10℃程度に低下することもあった。3 月19日で加温を停止し、夏期はサイドのビニルを巻き上げ、50% の遮光を行なったがハウス内の気温は40℃を超えることもあった。追肥を 1月下旬から開始した以外、殺虫剤や殺菌剤の散布その他の栽培管理は 1) に準じて行なった。1993年 9月20日に球根を掘り上げ、球周を測定した。

## 3) 冷蔵一作球根の栽培試験 (第二作目)

1) で得られた一作球根を第1項と同様にして12週間の冷蔵処理を行ない、1992年12月16日、4号のポリ鉢に 1球ずつ植え付けた。2) と同じハウスで同様に栽培し、1993年 7月12日に球根を掘り上げ、球周を測定した。また、適宜、出葉 (葉状りん片の地上への伸長) や抽台の観察を行なうとともに、開花時に草丈 (鉢土表面から (第 1花の) 小花梗先端まで)、莖径 (最下位節間部の)、葉数 (苞葉を除く)、最大葉長、最大葉幅、花の大きさ (花径: 相対する外花被片反転位置間の距離、花長: 花被片の着生位置から反転位置までの距離) の調査も行なった。

また、2) で得られた一作球根を、第1 項と同様に冷蔵処理した後、1993年12月24日、4 号のポリ鉢に植え付け、サイドを寒冷沙で被覆した鉄骨自然光エフクリーン仕様ハウスに搬入した。1月18日～ 3月 8日までの最低温度を10℃に設定した以外は、2) と同様に栽培管理し、生育・開花と掘り上げ時の球周調査を行なった。ネダニ発生により葉の黄変が早まった一部の株から球根の掘り上げを開始したため、球周の調査時期は1994年 5月中旬から 7月上旬に及んだ。

## 4) 冷蔵および無冷蔵二作球根の栽培試験 (第三作目)

3) で得た 1993 年7 月掘り上げ二作球根を、第1項と同様にして12週間の冷蔵処理を行ない、供試した。1993年10月15日、球周が6.0cm 以上11.5cm未満の球根、合計79球をプランター (18cm×60cm×深さ13

cm) に5球ずつ植え付けた。鉄骨自然光エフクリーン仕様ハウスで2)と同様に栽培管理した。適宜、出葉・抽台の観察を行なうとともに、開花時に草丈、茎径、葉数、葉長、葉幅、花の大きさについて3)と同様に調査した。

また、2)と同様にして得た液体通気培養球根を、1992年2月～9月に第一作目、1992年10月～1993年10月に第二作目の栽培を行なって養成し、得られた二作球根を無冷蔵で栽培した。1993年10月15日、冷蔵二作球根の場合と同様にして、球周が6.0cm以上11.5cm未満の球根をプランターに植え付けた。栽培管理、出葉・抽台の観察、開花時の調査は冷蔵2作球根の栽培試験の方法に準じた。1994年7～8月に掘り上げた後、球周の調査も行なった。

## 結果

### 1) 第一作目の生育に及ぼす土壌移植前の培養球根の冷蔵処理およびGA<sub>3</sub>浸漬処理球根の影響

栽培終了後に掘り上げた球根の生存率と球周を第48表に示した。

無冷蔵および4週間冷蔵処理球根では、球根生存率が16.7%と低かったが、8および12週間冷蔵処理球根は、全て生存していた。一方、GA<sub>3</sub>浸漬処理を行なった球根の場合、無冷蔵でも生存率が83%まで向上し、GA<sub>3</sub>浸漬処理と4週間冷蔵処理とを組合せた球根の生存率は100%となった。

8および12週間冷蔵処理した球根では、栽培終了後、掘り上げた球根の球周の平均が5.6～5.7cmとなった。一方、無冷蔵でGA<sub>3</sub>浸漬処理した球根の掘り上げ時の球周平均は4.7cmであり、8週間以上の冷蔵処理をした球根のものと比較すると劣った。

### 2) 第一作目の生育に及ぼす培養球根重量の影響

鉢に植えたいずれの球根重量の球根においても、抽台したものはなかった。

12月に植え付けた冷蔵球根では、栽培1週間後から出葉が始まり、4週間後には、球根重量25～50mgおよび100～150mgの試験区の各1個体を除き全て出葉した。その後、枯死する葉があったが、新たに伸長してくる葉もあるため、9月までの栽培期間を通して、4枚程度の葉が常に伸長していた。

一方、9月に植え付けた無冷蔵球根では、翌年1月下旬から出葉が始まり、2月下旬には全て出葉した。その後も出葉し、平均4～6枚の葉を伸長した。

栽培終了後に掘り上げた球根の生存数と球周を調査した結果を第49表に示した。

12月に植え付けた冷蔵球根では、98%の球根が生存しており、無冷蔵で9月に植え付けた球根は、全て生存していた。また、12月植えの冷蔵球根において、球周5.0cm以上に肥大した掘り上げ球根の割合は、球重200 $\leq$ ～<300mgの植え付け球根で85%、300 $\leq$ ～<400mgの球根で90%、400mg以上の球根で100%となった。一方、9月植えの無冷蔵球の場合、50mg以上の植え付け球根の93% (44球中41球) が、球周5.0cm以上に肥大した。

### 3) 冷蔵一作球根の栽培試験 (第二作目)

冷蔵処理した一作球根の2回の栽培試験における、生育・開花および栽培終了後に掘り上げた球根の生存数と球周の調査結果を、まとめて第50表に示した。

1992年12月に鉢に植え付けた栽培試験では、1週間後から出葉・萌芽がみられ、3週間後には100%の出葉(萌芽を含む)率となった。抽台や開花は球周5.0cm以上の植え付け球根でみられた。球周が大きくなるにつれて開花率が向上し、球周 $6.0 \leq \sim < 6.5$  cmでは、植え付けた6球中5球が開花した。各球周の試験区で開花した株の草丈、葉数、茎径の平均は、それぞれ、22.0~27.0cm、7.6~8.0枚、2.7~2.9mmの範囲にあり、花数は全て1輪、開花日は2月26日~3月8日の間にみられた(第56図)。

掘り上げた球根の球周の平均は、球周 $6.0 \leq \sim < 6.5$  cmの一作球を植え付けた場合、10cmを超え、また、球周 $3.0 \leq \sim < 3.5$  cmの一作球を栽培した場合でも、球周7.0cm程度に肥大した球根が得られた(第57図)。球根底部の黒変やりん片の一部が腐敗した球根もあったが、得られた二作球全体の生存率は95.3%であった。

1993年12月植え球根の栽培試験においても、栽培3週間後に100%の出葉(萌芽)率が得られた。植え付けた球根の球周が5.5cm以上になると、その抽台率や開花率が向上し、球周 $6.0 \leq \sim < 6.5$  cmでは14球中11球が開花した。各球周の試験区で開花した株の草丈・葉数・茎径の平均は、それぞれ、17.6~21.2cm、5.8~7.0枚、2.3~2.7mmの範囲にあり、花数は全て1輪、開花日は3月20日~30日の間にみられた。開花後間もなく一部の株にネダニ発生による葉の黄変がみられ、掘り上げた球根の肥大程度は、1992年植え付け栽培試験における同サイズの球根で得られた結果と比較して、やや劣っていた。一方、植え付けた球根全体の生存率は94.4%であり、1992年植え付け試験とほぼ同様の結果となった。

### 4) 冷蔵および無冷蔵二作球根の栽培試験 (第三作目)

冷蔵および無冷蔵二作球根の栽培における、生育開花および掘り上げた球根の生存数と球周の調査結果を第51表に示した。

10月15日に鉢に植え付けた冷蔵処理球根は、12月27日~1月11日の間に開花した。しかし、球周8.0cm未満の球根を植えた場合、開花した個体は少なく、特に、球周 $6.0 \leq \sim < 7.0$  cmの球根の開花率は10.7%と低くなった。いずれの球周の試験区においても、開花した株の花数は1輪であった。草丈、葉数、茎径などは、植えた球根の球周に、ほぼ比例して増加したが、その生育程度は、3)の第二作目の結果と比較して、大差なかった。

掘り上げてすぐ鉢に植え付けた無冷蔵球根の株は、5月24日~6月11日の間に開花した。球周7.0cm以上の植え付け球根の開花率は、94.7%であった。花数は、球周10.0cm未満球は全て1輪であったが、球周 $10.0 \leq \sim < 11.5$  cm球では、8個体中3個体で2輪開花した。各球周の試験区で開花した株の草丈、葉数、

Table 48. Influence of the length of cold-storage of *L. japonicum* bulblets with or without immersion in GA<sub>3</sub> solution on the survival and growth of bulbs after transplantaion to soil.

Treatment before transplanting	surviving bulbs as a % of transplanted bulblets	Avg circum of harvested bulbs (cm)
4°C cold-storage (200mg·liter <sup>-1</sup> ) (wks)		
0	16.7	4.6
0	83.3	4.5
4	16.7	3.2
4	100	4.8
8	100	5.7
8	100	5.6
12	100	5.6

Bulblets, treatments and transplanting to soil in a cell tray: See Table 44. After 4 to 16 weeks of cultivation in the cell tray (Table 44), 6 bulblets in each treatment were retransplanted in separate 9cm-diameter pots on 19 March, 1992. The bulbs were harvested and their circumference measured on 17~19 September, 1992.

Table 49. Comparison of survival and growth of bulbs after transplanting in soil between chilling and direct planting of various weights of *in vitro* propagated bulblets of *L. japonicum*.

Treatment of bulblets	Date of planting	FW of transplanted bulblets (mg)	No. of surviving bulbs / no. of transplanted bulblets	Distribution of circumference of harvested bulbs (%)						Avg circumference of harvested bulbs (cm)			
				~<4.0 (cm)	4.0~<4.5 (cm)	4.5~<5.0 (cm)	5.0~<5.5 (cm)	5.5~<6.0 (cm)	6.0~<6.5 (cm)		6.5~<7.0 (cm)	7.0~<7.5 (cm)	
Bulblets chilled at 4°C for 12 weeks	9 December, 1992	25~<50	15/15	20.0	13.3	13.4	20.0	33.3	-	-	-	4.7	
		50~<100	15/17	19.9	26.7	6.7	6.7	33.3	-	-	-	4.6	
		100~<150	14/15	7.1	7.1	28.6	28.6	-	-	6.7	-	-	4.8
		150~<200	11/11	-	18.2	27.3	18.2	27.3	-	-	-	-	5.2
		200~<300	13/13	-	7.7	7.7	38.5	30.7	7.7	-	-	-	5.7
		300~<400	10/10	-	10.0	-	10.0	20.0	50.0	-	-	10.0	6.0
Bulblets planted directly after harvest	14 September, 1992	400~<500	8/8	-	-	-	37.5	25.0	-	-	-	6.1	
		500~<600	5/5	-	-	-	-	40.0	60.0	-	-	6.6	
Bulblets planted directly after harvest	14 September, 1992	25~<50	12/12	8.3	41.7	25.0	16.7	8.3	-	-	-	4.5	
		50~<100	12/12	-	-	16.7	50.0	33.3	-	-	-	5.3	
		100~<150	10/10	-	-	40.0	30.0	-	-	-	-	5.7	
		150~<200	11/11	-	9.0	-	9.0	36.5	27.3	18.2	-	5.8	
200~<300	11/11	-	-	-	-	27.3	36.4	27.3	9.0	-	6.3		

Bulblets produced *in vitro* (Table 44) were transplanted into 9cm-diameter pots. The bulbs were harvested and their circumferences measured on 20 September, 1993.

Table 50. Influence of *L. japonicum* bulb size on bolting, flowering and their growth after the second transplantaion. The bulbs were derived from in vitro propagated bulblets.

Date of planting	Circum of planted bulbs (cm)	No. of planted bulbs	No. of bolted bulbs	No. of flowering bulbs	Date of 50% flowering	No. of flowers	Size of flowering plants		No. of surviving bulbs	Circum of harvested bulb (cm)
							Flower size (cm)	Plant ht (cm)		
16 December, 1992	3.0 ~ < 3.5	11	0	0	-	-	-	-	10	6.9
	3.5 ~ < 4.0	11	0	0	-	-	-	-	11	7.3
	4.0 ~ < 4.5	11	0	0	-	-	-	-	11	7.8
	4.5 ~ < 5.0	7	0	0	-	-	-	-	7	7.3
	5.0 ~ < 5.5	11	7	1	3	1	10.5	27.0	8.0	8.7
	5.5 ~ < 6.0	7	7	4	March, 1993	1	9.1	22.0	7.8	9.7
	6.0 ~ < 6.5	6	6	5		1	9.0	23.4	7.6	10.8
24 December, 1993	4.0 ~ < 4.5	15	1	0	-	-	-	-	13	6.7
	4.5 ~ < 5.0	15	5	4	-	1	7.4	19.4	6.8	7.7
	5.0 ~ < 5.5	20	17	5	23	1	6.3	17.6	5.8	8.4
	5.5 ~ < 6.0	26	23	17	March, 1994	1	7.2	19.0	6.4	8.3
	6.0 ~ < 6.5	14	14	11		1	8.1	21.2	7.0	9.6

The bulbs harvested in the experiments described on Table 45 and Table 46 were chilled at 4°C for 12 weeks and used in the 1992 and 1993 experiments, respectively. These bulbs were replanted to separate 12cm-diameter pots.



Fig.56. Flowering of *in vitro* propagated bulblets of *L. japonicum* following the second transplantation into soil.

Bulbs derived from the experiment described on Table 48 were re-chilled at 4°C for 12 weeks before transplanting to 12cm-diameter pots on 16 December, 1992. Photograph was taken on 28 February, 1993.



Fig.57. Influence of *L. japonicum* bulb size on their subsequent growth after second transplantation into soil.

Bulbs derived from the experiment described on Table 48 were re-chilled at 4°C for 12 weeks and replanted to 12cm-diameter pots on 16 December, 1992.

They were harvested and photographed on 12 July, 1993.

Circumferences of planted bulbs (cm) were,

Upper (left to right):  $6.0 \leq \sim < 6.5$ ,  $5.5 \leq \sim < 6.0$ ,  $5.0 \leq \sim < 5.5$   
 Lower (left to right):  $4.5 \leq \sim < 5.0$ ,  $4.0 \leq \sim < 4.5$ ,  $3.5 \leq \sim < 4.0$ ,  
 $3.0 \leq \sim < 3.5$



Table 51. Comparison of bolting, flowering and growth of bulbs after the third transplantation between chilling and direct planting of various sizes of bulbs derived from *in vitro* propagated bulblets of *L. japonicum*.

Treatment of bulblets	Circum of planted bulbs (cm)	No. of planted bulbs	No. of bolted bulbs	No. of flowered bulbs	Date of 50% flowering	No. of flowering plants		Avg growth of flowering plants		Stem diam (cm)	Date of harvesting	No. of survived bulbs	Avg circum of harvested bulbs (cm)
						No. of flowers	Plant ht (cm)	Flower Diam (cm)	Length (cm)				
Bulbs chilled at 4°C for 12 weeks	6.0 ~ 7.0	30	29	3	1 January, 1994	1	19.3	7.8	6.5	7.3	no measurement	2.4	9.8
	7.0 ~ 8.0	23	23	10		1	19.9	7.3	6.6	6.3		2.5	
	8.0 ~ 9.0	16	16	13		1	21.0	8.0	7.0	7.5		2.8	
	9.0 ~ 10.0	5	5	5		1	20.3	8.0	6.8	8.5		3.0	
	10.0 ~ 11.5	5	5	4		1	23.8	8.8	7.5	11.0		3.5	
Bulbs planted directly after harvest	6.0 ~ 7.0	11	11	3	1 June, 1994	1	35.0	7.6	7.4	13.0	no measurement	2.9	9.8
	7.0 ~ 8.0	13	13	12		1	35.8	9.2	8.5	15.6		3.2	
	8.0 ~ 9.0	11	11	10		1	36.4	9.9	8.3	15.7		3.6	
	9.0 ~ 10.0	6	6	6		1	40.3	9.9	8.8	15.7		3.5	
	10.0 ~ 11.5	8	8	8		1.4	40.4	10.5	8.5	19.4		4.0	

Bulbs harvested in July 1993 in the experiment described on Table 47 were used in the cultivation of chilled bulbs.

Bulbs obtained after cultivation of *in vitro* propagated bulblets, two times between February, 1992 and October, 1993, were used in the experiment for cultivation of non-chilled bulbs.

Five bulbs per each plastic container (16cm x 60cm x 13cm height) were planted on 15 October, 1993.

茎径の平均は、冷蔵球根の促成栽培試験の場合に得られた開花株のものと比較して、大きくなった。また、植え付け時の球周が7.0 cm以上の球根は、栽培終了後の掘り上げ時に、球周11cm以上の球根となった。

#### 第4節 考察

本章のはじめにも述べたように、ユリ球根の組織培養による増殖に関する従来の報告に多くみられる固体培地を用いた培養方法を、栽培現場での需要に見合うだけのスケールで球根生産できる実用技術として利用することは難しい。すなわち、手作業によって子球からりん片を1枚1枚採取した後、それらを切断し、得られた切片を寒天などを支持体とした固体培地に置床していくことは、非常に大きな労力を必要とする。実際、このような作業操作を用いて培養苗を生産した場合、生産コストに占める人件費の割合は60～70%に達するといわれている。したがって、従来の組織培養法を利用して苗生産を行なうことは、培養のスケールが大きくなるほど、実際の作業性の面からも、生産コストの面からも実用化への道は遠くなってしまふことになる。この点で、第1節の第1項で比較・検討した培養法はいずれも、培養の工程を省力化でき、かつ、培養をスケールアップできる可能性を有しているものである。

液体培養法は、培養切片の置床に要する作業を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、かなりの工夫と経費を必要とする。したがって、通気培養法の方が、振盪培養法よりスケールアップに適していると考えられる。

第1節第1項においては、この液体通気培養による培養8週後の結果が他項での通気培養の試験結果と比較して劣っていた。第1項の場合、培養4週を経過した時点で、35℃程度の高温に約1～2日遭遇した。一方、りん片からの子球分化の経時変化をみた第1節第5項の試験結果によると、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急速に増加している。このことから、培養4週を経過した時点は、りん片組織内部から子球が分化しつつある生理状態・組織形態への変化段階にあり、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る。したがって、この時期の高温遭遇によって子球の分化・生育が阻害されたのかもしれない。一方、第3項のりん片培養で子球の分化に抑制的であった培養温度28℃は、子球培養における温度の影響をみた第7項の培養では、形成された子球自体の生育を抑制しなかった。これらの点を考えあわせると、りん片培養初期の子球が分化してくる時期は、培養温度などに関する各種のトラブル発生に対して、特に敏感であり、注意する必要があるといえる。実際、本項以降の試験では、この種の実験トラブルもなく、通気培養によって、寒天培養と同

程度以上の培養成績が得られた。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詳しく検討し、明ら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図れる。しかし、外植体の植え付け作業や培養スペースの利用効率などについては、固体培養と同様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。なお、本実験の液体支持材培養法では、子球の生育がかなり劣っていた。これについては、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低下していたことが影響を及ぼした可能性も考えられる。しかし、テッポウユリ茎頂組織の培養では、オートクレーブ前の培地pHを3.7に調整しても、その生育は阻害されなかった（第1章、第1節、第2項）。一方、オートクレーブされた支持材から、培養植物体の分化・生育を阻害する何らかの物質が放出される場合（212）が報告されているので、むしろこのような影響を考慮する必要があるかも知れない。いずれにせよ、液体支持材培養法は、高照度、炭酸ガス施与、湿度低下など、培養植物の鉢上げ後の生存率の向上や生育促進に効果を示す処理を固体培養と同様に行なえるので、このような処理が有効である植物には適した培養法である（34, 52, 62, 88, 89, 105, 121, 209）。しかし、ササユリなどの球根類のように、鉢上げ後の生存が比較的容易な植物種では、この培養法はそれほど利点がないといえる。

最近、盛んに研究されている人工種子は、培養をスケールアップする手段の一つとして、大きな可能性を秘めている（83, 84, 149）。しかし、斉一な不定胚を大量に形成させ、しかもカプセル内で効率よく発芽させるためには多くの課題が残っている。この点、節切片をカプセル内に包埋して、カプセル内でシュートを形成させる方法（18）は従来の栄養繁殖法のミニ化であり、本来の意味での真の人工種子とはいえないものの、不定胚を利用する場合と比較して、環境の変化などに対する適応性が大きく、シュート形成（発芽）の段階における障害が少ないと考えられる。本実験では、りん片切片をカプセル内に包埋して、カプセル内で切片から子球を分化させることを試みた。その結果、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、他の液体培養法によるものと比較して遅く、また、切片の切断部位付近が褐変化するものが多くみられたため、効率よく球根を増殖することができなかった。しかし、カプセルの表面からやや突出したりん片の先端部には子球が形成されやすいことも観察された。このことから、効率よく子球を増殖できなかった原因の一つとして、カプセル内に包埋されたりん片切片への酸素の供給量に問題があった可能性がある。このカプセルを利用した増殖法の場合、育苗室などに置いたセルトレイ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する、いわばプラグセル球根といったものを商品化できるといった新技術の展開も考えられる。したがって、切片の生存率の向上や子球の分化・生育の促進を図るため、カプセル内への酸素透過率の改善などについて、さらに検討を試みることも価値があろう。以上のように、培養方法に関する試験結果を総合的

に判断すると、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。

この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ことを目的とした培地の主要塩類濃度やショ糖濃度は、寒天培地での濃度よりも高くすると、抑制的な効果を示した。むしろ、主要塩類濃度については、やや低濃度にしておくと、子球の分化は早まる傾向もみられた。これは、寒天培地の場合と比較して、液体培地では、栄養分などの吸収が効率よく行なわれていることを示唆している。第1節第2項の培養8週での結果からみると、主要塩類組成はMS標準濃度の3/4倍とやや低い濃度、ショ糖は寒天培地と同じ4%程度の濃度にして培養することが子球の分化に適しているといえる。

培地中の生長調節物質についてみると、寒天培養の場合と同様、NAAの添加はりん片切片からの子球の分化を促進し、その濃度としては、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NAA濃度の培地では、 $0.01\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$ のものより、発根数が多くなった。液体培養の場合、栄養分は根以外の培地に接触した組織表面からも吸収されるため、分化した根が植物体の生育を促進する効果は、固体培地における程、大きくないと考えられる。さらに、球根植物では、植え付け時に発根していない場合でも、鉢上げ後の生育・順化は比較的容易である。一方、培養スペースの利用効率や子球を培養容器から取り出したり、切断したりする際の操作性の点でも、球根以外の根や葉などの器官・組織の量は少ない方が望ましい。これらのことから、培地のNAA濃度は、より発根の少ない $0.01\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$ の方が適しているといえる。

添加する生長調節物質としてカイネチンあるいはABAを用いた場合、ヤマユリ(196)やテッポウユリ(90, 199)などでの報告と異なり、これらの生長調節物質がりん片切片からの子球の分化を促進する効果は、みられなかった。本実験のササユリでは、NAAだけを添加した培地で培養したりん片の基部切片でも、効率よく子球を分化し(切片あたり5.5個)、また、カルス形成もほとんど認められなかった。このことからみて、ササユリのりん片切片は、上記の報告で供試されているユリ種のりん片切片とは、内生的なホルモンレベルなどの生理状態に差異があり、それが、培地から吸収されたカイネチンやABAの効果に何らかの影響を及ぼしていることが考えられる。しかし、その正確な原因は不明であり、この点については、生長調節物質の処理濃度を変えるなど、さらに検討が必要である。

通気ガスの酸素濃度を20.9%、すなわち大気としても、りん片切片からの子球の分化は寒天培養の場合とほぼ同程度に認められた。酸素濃度をさらに高めても、子球の分化は促進されなかった。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(74)。このことは、カルスなどの培養細胞の増殖が好氣的であり、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、酸素の消費量が増大したとする報告(92)とも符合する。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要し、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ため、呼吸量の急激な増大はみられず、培養期間中の酸素消費量も比較的少ないレベルで推移したことが予想される。それ故、ササユリりん片切片の液体培養では、大気を通気するだけで寒天培養と同程度の子球分化がみられたと考えられる。なお、通気ガスとして大気を使用できることは、高濃度の酸素ガスを用いる場合と比較して、ガスポンプあるいは酸素濃縮機などを設置して配管するといった特別な付帯設備を必要とせず、培養装置を簡易化するうえで有利であり、また、安全性の面からも望ましいといえる。

培養温度がりん片切片からの子球の分化や生長に及ぼす影響についてみると、18℃まで温度を低下させても、23℃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℃に培養温度を高めると、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。一方、分化した子球の生長をみた子球培養においても、培養温度として23℃が適していた。また、子球培養の場合、温度を28℃に高めても、子球からの葉の伸長は抑制されたものの、子球の生体重は増加した。山岸(233)はササユリ球根の培養温度の影響について調べ、20℃で球根の肥大が最もすすみ、26℃で抑制されることを報告している。この場合、培養温度26℃では、20℃よりも呼吸量が増大するため、外側りん片での貯蔵多糖の消費が早く進み、外側りん片が枯死している。その結果、球根の生育には、20℃の方が適すると考察されている。すなわち、高温における発根量の低下に伴う固体培地からの糖吸収量の減少と呼吸量の増大を、26℃における球根肥大の抑制の原因としている。しかし、本実験は液体培養であり、周囲の培地からの養分吸収効率が良かったため、高温における糖吸収量の低下の影響も寒天培養の場合ほど大きくなく、また、高温では、葉や根などの分化・生長が抑制され、葉や根によるエネルギー消費も少なく済むので、培養温度28℃においても子球自体の生長は順調に進んだものと考えられる。

りん片切片の通気培養中における照明の影響については、子球の分化に暗条件と明条件とでほとんど差異はみられなかった。しかし、後者の場合、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、明条件での葉の伸長促進効果が報告されており(181)、また、テッポウユリ切り花の2度切り栽培においても、球根頂部に光を照射することによって発芽を促す処理がなされている(96)。このように、ユリにおいては、一般に、明条件が葉の伸長に対して促進的に作用している。

したがって、ササユリの場合、培養初期に28℃以上のような高温を避ければ、23℃からやや低温側を中心とした比較的広い温度範囲で子球の分化と肥大はすすみ、光の有無による大きな差異も認められない。また、呼吸による消費量を上回る十分な糖の供給が確保されれば、比較的高温条件の方が、形成された球根自体の生長・肥大を促進する可能性もある。この場合、培養の初期と後期で温度条件を変化させること

によって、より一層球根を肥大させることができよう。子球の分化と生育に対する培養環境条件の影響に関するこれらの実験結果から、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サユリ球根の増殖は可能であるといえる。

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週にかけて大きくなった後は、ほぼ同じ数値で推移した。この傾向は新たな子球の分化が少なくなり、培地中の栄養分が分化した子球に吸収・蓄積され、その肥大を促進するようになると考えられる培養8週以降も続いた。このことから、分化した子球の生長に必要な培地中の栄養分は、培養8週頃には不足してきており、さらに子球を効率よく肥大させようとする場合、培地栄養分の補給が必要であると考えられる。

実際に、通気培養中における培地栄養分の経時変化を調べたところ、リン酸とアンモニア態窒素は培養開始直後から速やかに減少し、特に、リン酸は培養4週間でほぼ消失してしまっていた。上述のように、培養3～5週頃から子球の分化が認められるようになってくる。当然、この時期までに、りん片切片の組織内部では、活発な細胞分裂が行なわれている領域があり、結果として、培地中には、このような切片組織内の分裂部位が多数存在していることになるはずである。したがって、この培養初期におけるリン酸の急激な減少は、リン酸が分化過程における活発な細胞分裂に必要とされる核酸やATPなどの成分として、重要な役割を果していることと関連づけられる。また、MS培地でのニンジン不定胚の培養においても、リン酸の減少は著しく、培養後期の生育が抑制されることが報告されている(216)。この場合、MS培地自体のリンの5要素構成比率が低いことが、その原因ではないかと考察されており、この点からの影響も考えてみる必要がある。一方、硝酸態窒素は、アンモニア態窒素が培養開始時の16%となる培養6週頃からその減少が著しくなった。このような窒素源の経時変化からみて、植物にとって利用しやすいとされるアンモニア態窒素がまず吸収され、その後、硝酸態窒素が吸収・利用されていくと考えられる。

カリウムは子球の分化が少なくなる培養8週頃から減少していき、培養13週では培地から消失する。マグネシウムもやや遅れるものの、カリウムと同様の傾向を示した。鉄砲ユリの植物体では、カリウムは生育の後期に吸収が増大し、新球への蓄積がみられ、球根内のカリウム含有率は他の球根類よりも大きいとされている(217)。カノコユリでも、球根の充実期にはカリウムが急激に増加することが報告されている(219)。したがって、鉄砲ユリやカノコユリの施肥基準においても、カリウムの量が多くなっている。また、カリウムは、デンプン合成酵素活性の促進に効果を示すことも知られている。このように、ユリ球根の生育・肥大に対するカリウムの影響が認められていることから、液体通気培養の後期において、カリウムが子球の生長に重要な役割を果している可能性は、十分に考えられる。

培養0週においてブドウ糖と果糖の存在が認められたことから、オートクレーブ滅菌によって、培地中のショ糖は一部分解されたと考えられる。その後、培養の経過とともに、ショ糖が減少する一方でブドウ糖と果糖の増加もみられることから、ショ糖の一部は常にブドウ糖と果糖へと分解されていたのであろう。ショ糖が培地中から消失した後は、ブドウ糖と果糖も急激に減少した。したがって、培養後期には、分化した球根が、これらの糖を吸収・利用していると考えられる。いずれにせよ、培地中の糖は、突起物が分化してくる時期(培養3~4週)から、その後、突起物が芽を経て子球へと生育し肥大してくる時期を通じて、常に減少していくことが分かった。糖は、分化の際にみられる活発な細胞分裂のエネルギー源としてだけでなく、子球の生育・肥大に伴って必要となる貯蔵炭水化物としても重要であるので、連続的に吸収されたと考えられる。このように、培養8~10週頃には、培地中の栄養分、特に、球根の肥大生長に直接関係が深いとされる糖分が欠乏してくることから、この時期には、新たな培地を補給することが必要である。すなわち、培養初期に用いる子球分化に適した培地から、分化した子球の生長により適した培地へと交換する2段培養を行えば、一層効率よく球根増殖を行なえることになる。また、液体培養であれば、この培地交換の操作も比較的簡単に行なえるはずである。

分化した子球の生長に適した培地については、第2章の寒天培養や新美らのオトメユリ子球の液体振盪培養の結果(133)と同様、ショ糖濃度を高めることが、その生長促進に効果があった。本章では、さらに、栄養分の集積に効果があるといわれるカイネチンや、球根の成熟あるいは休眠状態を深めることによって炭水化物の球根中への転流集積を促進するのではないかと予想されるABAなどの生長調節物質の効果についても調べた。カイネチンを添加した場合、葉を含めた植物体生体重の増加率は大きく、球根自体の肥大も良好であった。子球に吸収されたカイネチンは養分の集積に効果を示し、子球のシンクとしての機能を強めた可能性がある。しかし、同時に厚い葉がかなり伸長してくる傾向がみられた。第2章のテッポウユリの節培養において、低温と組合せたカイネチンは子球の抽台を促進した。また、テッポウユリやダリヤの出葉形態に関する研究の中で、カイネチンがテッポウユリ子球の抽台を促進し、その齡の進行に何らかの作用を持っているとする報告(237)もある。このように、カイネチンは、球根の生理状態をより生育活性の高い方向に進ませることによって出葉を促進するとともに、伸長した葉などを含めた球根組織の養分集積にも効果を示したと考えられる。一方、ABAの添加は、植物体生体重の増加に対して促進効果を示さなかったが、葉の伸長を抑制する傾向を示した。そこで、ショ糖10%とカイネチン  $0.5\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$ 、ABA  $0.1\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$  を組合せた培地で子球を培養したところ、伸長葉数の比較的少ない肥大した球根を得ることができた。したがって、ショ糖、カイネチンおよびABAを適当な濃度で組合せることによって、伸長葉や根の少ない肥大した球根を効率よく得ることが可能である。

りん片からの子球の分化と分化した子球の生育に影響を及ぼす要因としては、培地や温度などの外的環

境条件の他に、供試球根の齡や供試りん片の切片部位などの培養材料自体の生理的な差異もあげられる。

組織培養に用いる培養材料の齡は、器官の分化や生長に大きな影響を及ぼす要因の一つとされ(117)、ヤマユリのりん片培養においても、子球の齡やりん片の齡(着生部位)が子球形成に影響することが報告されている(194)。ヤマユリりん片培養の場合、古い子球のりん片や外側のりん片ほどカルスを形成しやすく、その子球形成能力は低下した。本実験の第1節第4項においても、液体通気培養に供する子球を得るための寒天培地でのりん片培養の期間が長くなるにつれて、通気培養した切断切片からの子球の分化は少なくなった。これらのことから、液体通気培養に供する子球としては、一般に若い齡のものが適していると考えられる。ササユリの場合、継代培養の期間は、液体通気培養に供する子球の肥大なども考慮して、3~4 か月から長くとも6~7 ヶ月程度までにとどめるべきである。

従来、ユリのりん片挿しや寒天培地上のりん片培養では、りん片の先端部と比較して基部における子球の分化や生育の方が優れていることが報告されている(57, 69, 128)。本実験の液体通気培養でも、先端部切片は基部切片と比較して子球の分化時期が遅れ、その分化数も少なかった。したがって、分化時期の早い基部切片の子球は生育・肥大も早く、一方、先端部切片から分化した球根の生育・肥大が遅れた。このことが、同一の培養容器内のりん片切片から得られる子球であるにもかかわらず、その球径・球重の分布にかなりの幅を生じた原因の一つであると推察される。この子球の生育・肥大程度における差異が、球根養成段階以後の生育にどの程度の影響を及ぼすかについては、培養によって得られた子球を大きさ別に栽培するなどの方法で調査する必要がある。本実験のササユリの場合、本章第3節第2項1)において、この点についての検討を行っている。

以上のように、第1節の結果から、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、培養をスケールアップすることが比較的容易である液体通気培養では、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分かった。

第2節では、第1節の結果を基にして、培養の実用化試験を行なった。液体通気培養技術をスケールアップし、実用的なものとするためには、できるだけ労力をかけずに済む簡便な方法で、培養材料となる切片を得ることも必要である。そこで、まず、労力コストの面からみて、培養材料となるりん片切片を作成するプロセスの省力化を試みた。この点に関して、機械的切断法を用いて培養材料を簡便に得ようとする試みが、カラジウム(241)やセントポーリア(111)において報告されている。その培養切片作成方法は、ブレンダーを利用してカルス様の不定芽の塊を切断・分離するものである。しかし、ユリの球根やりん片などから切片を作成する場合、この切断方法では、組織の損傷が大きく、適当でないように考えられる。一方、ユリりん片の切断切片を得る方法としては、切断装置を利用して機械的に切片を作成するものが報告されている(104)。この方法の原理は、料理用のスライサーを用いた場合と同様であり、市販の料理用



スライサー装置の切断部と切片の受け皿容器部をオートクレーブ可能な材質で改造すれば利用できると予想される。しかし、それぞれの農協などの切り花生産地単位で必要とする程度の球根数を生産する場合であれば、機械切断よりも労力を必要とするが、簡単な切断道具を利用した手作業でも対応できるかもしれない。

第2節第1項では、無菌球根をメスで主に横方向に2mm 程度の間隔で切断して得られた切片からの子球の分化と生育について調べた。その結果、球根切断切片では、1枚ずつのりん片を切断して得たりん片切片を培養した場合と比較して、各切片からの子球の分化・生育は遅れるものの、切片の総数から算出した球根増殖倍率は向上した。球根をメスで切断した場合、ピンセットでは分離・切断できないような中心部のりん片からも切断切片が得られるので、1球当たりの切断切片数は、りん片を分離・切断した場合より5～6枚程度増加した。したがって、球根切断で得られる培養1球当たりの分化子球の総数は、りん片切断の場合と比較して同等程度、あるいは、それ以上に増加することになったと考えられる。そこで、第2節第4項の培養のスケールアップ試験では、約2mm の間隔でカッターナイフの刃を並べた簡易な切断用具を作成し、子球を押し切りして得た切片を培養したところ、同様の培養結果が得られた。このように、簡単な切断用具を利用して、多くの培養切片を得ることも可能である。したがって、さらに改良・工夫して培養切片を効率よく得られるようにすれば、子球からピンセットで採取したりん片を1枚ずつメスで切断する方法と比較して、労力は大幅に削減され、このような切断方法を実用的な切片作成法として利用することが期待できる。

培養において、外植体（移植体）の量が、その後の生育や増殖率などに影響を及ぼすことが知られ、その原因としては、外植体間の養分競合、外植体自体が生成する物質の影響などが考えられている（30、43、47、142、190、226、231）。これらのことから、実際に培養によって球根生産を試みる場合、できるだけ効率よく球根を分化・増殖できる培養切片量と培地量との比率を明らかにしておくことも重要と考えられる。りん片切片から分化した突起物は培養が長期間に及ぶと子球にまで生育するとみれば、第2節第2項の試験結果から、培地1ℓあたりに供する培養球根（生体重約150mg として）数は、100球程度が適当である。また、1ℓ当たりの培養球根数を200球まで増加させても、球根増殖率は、それほど低下しなかった。実際の球根生産場面での培養スペースや作業効率を考えれば、この程度の球根数まで培養に供してもよいであろう。

次に、培養装置の面から実用化の可能性をみてみる。これまでにも、培養における増殖のスケールアップについては、第2節でも述べたように、実際に数ℓのジャーフェンターを利用したニオイテンジクアオイ、イチゴ、グラジオラスなどでの培養試験が報告されている（73、198、200）。大量培養を行なう場合、培養槽として、高価なガラス製のジャーフェンターやステンレスの金属製タンクなどを使用する

と、培養苗の生産コストに占める装置費の割合がかなり大きくなってしまふ。したがって、実用的には、簡易な培養槽を工夫して装置費を低減することが望まれる。また、通気培養槽の場合、排気口が詰まって槽内が高圧となり爆発破損した場合、ガラス製や金属製のものでは、人身事故発生の危険性が大きい。さらに、比較的小規模な生産地単位での球根生産あるいは少量多品種生産を行なう場合など、数 100ℓ以上の規模の大きな金属製タンクで球根生産を行なう必要もないであろう。また、比較的大量に球根を必要とした場合でも、雑菌汚染などの危険性を分散する意味で、10ℓ程度の安価な培養槽を多数用意した方が得策である。

本実験のスケールアップ培養に用いた培養槽は、市販のポリプロピレン製のコンテナボックスを加工したものであり、爆発破損による人身事故発生の危険性もなく、また、金属製タンクのように製作に技術を要したり、高い経費を必要とするといったこともない点で、実用的簡易培養槽として適したものであるといえる。しかも、大気を通気するだけで子球を効率よく増殖できることから、先に述べたように、酸素ポンプあるいは酸素濃縮装置などは取り付けられる必要がなく、高酸素濃度ガスの引火による爆発・火災などの危険性もないので、安全のために特別な装置や処理も必要としない。したがって、培養装置（培養槽）は単にエアーポンプをシリコンチューブで接続するだけでよく、非常に単純な構造となり、誰でも、どこでも簡単に製作して使用することが可能である。しかも、装置費も、ガラス製ジャーフェンターや金属製タンクを使用する場合と比較して、格段に削減できる。例えば、本実験のコンテナボックスを利用したポリプロピレン製10ℓ培養槽（スパージャーとして溶液フィルター4個使用：製作コストの約80%であり、さらに安価のものを利用することが望ましい）の場合、無菌フィルター、エアーポンプなど込みで1万数千円程度以内で製作できる。

培養のスケールアップを図った場合、特に、培養がすすみ多数の植物体が分化すると、培地内の溶存酸素量に不均一が生じ、部分的に、かなり低酸素量となる可能性がある。このため、簡易培養槽を作成する場合、培養槽内に設置する通気フィルターの数をもどの程度とするかを明らかにすることも必要である。そこで、培地量 1.5ℓの培養槽内に設置する通気フィルターを 2個あるいは 6個として、その影響を調べたところ、切片からの子球の分化と生長に差はなく、培地量30mlのガラス濾過器での培養結果と同様であった。また、フィルター数 2個での溶存酸素の量は、分化・増殖した子球が大量に集積してくる時期には飽和量の60%台にまで低下していた。このように、比較的低い溶存酸素濃度でも、ユリ球根の分化と肥大は順調に進むものと思われるので、培地量 1.5ℓの簡易培養槽の通気フィルター数は 2個でよく、培地量 5ℓの場合も、4 個設置することで十分であったと考えられる。

最後に、約 2mmの間隔でカッターナイフの刃を並べた簡易な切断用具を用い、一度に約20球の子球を押し切りして、合計300 個の子球の切断切片を作成した。容積10ℓの簡易培養槽を用いて、この切片を培養

し、実際に培養のスケールアップを図った。その結果をみると、培養10週間ではガラス濾過器での培養結果と比較して、球根増殖倍率が低くなった。しかし、培地交換を行い、さらに培養が24週間まで進んだ段階では、15倍の球根増殖倍率を達成できた。培養初期の子球の分化・増殖が遅れていたことに対しては、次のような原因が推察される。簡易切断用具で多数の子球を一度に押し切りした場合、りん片の基部を子球の底盤部に付着したままの切片が多くみられた。したがって、まず、底盤部の中心に残っていた生長点が大きな子球となり、この段階では、生長した子球の周囲の底盤部に付着したりん片基部からの子球の分化はむしろ抑制されたと考えられる。一方、底盤部にりん片基部を付着した切片が多かったことからみて、子球切断によって分離できたりん片切片の場合、りん片の先端から中央の部位にあたるものが多かったともいえる。また、やや小さくて切断分離の際に、組織が傷ついたりん片切片も含まれていた。第1節第4項の結果からも明らかな様に、先端部切片では、子球の分化が遅れ、その数も少なくなる傾向がある。これらの要因が重なり、培養初期における子球の分化が遅れてきたと考えられる。しかし、培養がすすむにつれて、底盤部に付着したままのりん片基部部位も肥大して子球を分化し始め、また、りん片の先端部切片においても子球の分化がかなりみられるようになった。その結果として、球根増殖倍率が向上したと考えられる。このような点を考慮すると、りん片の基部部位を出来るだけ多く球根底盤部から分離する様に切断方法を工夫することが、培養初期の子球分化の遅れを防ぎ、さらに球根増殖倍率を向上させることになるはずである。

本実験では、寒天培養で形成された子球をりん片切片から分離し、子球から根や葉が分化・伸長している場合には、それらをメスで切除した後に切断切片を作成した。しかし、本来の実用的な増殖のための培養では、液体通気培養で得られた比較的葉や根の少ない子球を、培養切片に付けたまま一度に切断することになる。なお、容積10ℓの培養槽における24週間の培養では、葉と根が収穫物組織の生体重に占める割合は12% (201g 中24g)であった(データ省略)。この程度の割合の葉と根を含む生産球根全体を切断して培養した場合でも、今回の培養結果と同様の球根増殖倍率が得られるかどうかについては、さらに検討して確認する必要がある。また、本スケールアップ試験では、培地交換を培養13週間後に行なっただけであるので、培地交換用の培地組成、交換の時期や回数などを詳しく検討することによって、分化した子球の肥大をさらに効率よく促進することも可能であろう。

以上のササユリ球根をモデルとした培養実験の結果から、安価で簡易な球根切断用具や培養槽を利用し、球根切断切片の液体通気培養を行なうことによって、培養によるユリ球根の大量生産を実用的に行なえる可能性を見出せたといえる。

一方、第3節の液体通気培養球根の栽培結果からみて、その生育特性は、通常のユリ球根や寒天培養球根のものと相違があるとはいえず、第2章での寒天培養球の鉢栽培結果に関して行なった考察は、液体通

気培養球根にも当てはまると考えられる。したがって、寒天培養球根の場合と同様、一般のユリ類の生育特性に関する種々の知見を生かして、第3節の結果から液体通気培養ササユリ球根の生育特性を明らかにし、その栽培化をめざすことができる。

ユリ類の生育特性、特に球根の休眠、抽台、花芽形成などに影響する要因については、切り花促成栽培技術を確立する観点から研究が進み、テッポウユリ、スカシユリを中心として、詳しくまとめられている(61,187,188)。それらの研究結果から、ユリ類は、一般に高温に遭遇するとともに休眠が誘導され、また、球根が成熟して休眠が打破される過程で有効に作用する温度範囲は、ユリの種などにより異なっていると考えられる。また、低温はバーナリゼーション効果としての作用も示している。さらに、種子や芽の休眠現象において、その内生ホルモンの増減との関連が知られているように、ユリ球根でも、球根の成熟に伴うオーキシン様物質の増加(219)や低温処理に伴うジベレリン類の増加(202)などが報告されている。実際の栽培現場では、これらの研究成果をふまえながら、休眠打破や抽台・開花の促進のために、球根の温湯処理、ジベレリン浸漬処理や冷蔵処理などが行なわれている(97,139)。一方、組織培養によるユリ球根の増殖に関する研究において、得られた培養球根の鉢上げ後の子球の生育が調査され、これらの球根でも、以前から切り花や鉢花栽培に用いられてきた自生あるいは圃場生産球根(以下、従来球根)と同様、休眠現象の存在することが明らかにされている(2,53)。

第3節第1項では、無冷蔵の培養球根をセルトレイに植え付け、20℃のインキュベーターで16週間栽培しても、球根からの出葉は全くみられず、GA<sub>3</sub>浸漬処理や4℃での冷蔵処理が培養球根からの出葉促進に有効であった。これらの結果は、ショ糖を添加した液体培地を用い、23℃・暗黒の一定条件で比較的長期間(5~6か月間)培養して生産したササユリの子球が、従来球根と同様、休眠状態にあることを示している。また、冷蔵処理球根の鉢上げ後の出葉特性から、その休眠の深さは、培養材料として用いた子球が、継代培養中に示した出葉の難易と関連のあることも示唆された。このように、出葉試験の供試球根を生産するために設定された培養温度23℃は、ササユリ球根の出葉促進に有効な低温として作用する温度範囲ではなかった。一方、第1節第5項から、培養の経過とともに培地中のショ糖は分化・生育している球根に吸収蓄積されることも分かっている。これらのことは、従来球根において、地上部の生育が停止し、休眠が誘導され、さらに球根の成熟が進む過程で、地上部の茎葉から糖が球根へ転流・蓄積されていく状況と類似している。すなわち、培養球根の休眠現象は、このような従来のユリ球根の休眠誘導や球根成熟過程と類似した条件下で進み、その条件に対するそれぞれの球根の感受性の差異によって、球根の休眠の深さが異なっていたものと推察される。

第3節第2項1)において、十分な冷蔵あるいはGA<sub>3</sub>浸漬処理により栽培開始後速やかに出葉・発根した球根では、第一作目終了時の生存率は高くなった。この生存率の向上については、GA<sub>3</sub>処理、特に十分量

の低温は、ユリ培養球根の休眠を打破するとともに、その生理的な生育活性も向上させた結果、球根掘り上げ時の生存率を向上させ、一方、低温感受量が不十分なため生育活性の低かった球根は、鉢への移植後遭遇した夏季ハウス内の高温によって、さらに生育活性を低下させたため、球根生存率も低下したと考え、キクのロゼット現象や芽の休眠に対する温度や生理的な生長活性との関係(86)と類似の現象が生じていたともいえる。

新美(131)は、ヒメサユリ(オトメユリ)の培養球根において、12週間以上の4℃処理が球根の休眠を打破し、GA<sub>3</sub>浸漬処理は、休眠に対する低温の効果を完全に代替することはできないが、出葉を促進するとともに低温処理期間を短縮する効果を示すことを報告した。さらに、ササユリの培養球根で、低温処理は子球からの出葉を促進し、また、低温処理が十分であった場合、試験終了後に掘り上げた子球に、腐敗したものはなかったことを示した(135)。Takayamaら(197)も、ヤマユリやカノユリ培養球根の休眠打破に低温処理を用いた。

いずれにせよ、培養球根に対する冷蔵やGA<sub>3</sub>浸漬などの休眠打破処理が、従来球根に対する場合と同様に有効であったこれらの結果からも、培養球根の休眠は、従来の栽培球根などのものと同様の現象であるといえる。

12週間の冷蔵処理を行なった培養球根の栽培を2月に開始した場合(第46表)と、12月から開始した場合(第47表、150 ≤ ~ < 200mg)とを比較すると、その球根の生育程度に大きな差はみられなかった。12月植えでは、12月中旬から2月初旬頃にかけて加温ハウス内で出葉した葉の幅がやや細く、厚みもやや薄く、3~4月頃には枯死するものもかなりあった。このような葉の生育状態が球根肥大に及ぼす促進効果は比較的小さかったと考えられる。一方、無冷蔵球根を9月に植え付けた場合、2月頃から盛んに出葉した。2月中下旬から5月上旬頃までの期間、ハウス内の温度条件・光条件などは、ササユリの生育に比較的適していた。したがって、2月植え冷蔵球や無冷蔵球の場合、この期間に葉数増加、葉の生育活性の高まりがみられたことによって、12月植え冷蔵球根より地上部の生育期間が短いにもかかわらず、効率よく球根を肥大させることができたと考えられる。このように、出葉が速やかにみられる冷蔵処理球根を用いて球根を養成する場合、球根の植え付けは、1月下旬~2月上旬頃、無加温ハウスで行なえばよく、栽培期間も短縮できて経済的である。また、さらに効率よく肥大した一作球根を得るためには、培養球根の植え付け時期や栽培期間中の温度変動と球根肥大の様相・経時変化などとの関係を検討し、適切な栽培時期や期間を明らかにすることも必要である。

次に、培養球の栽培による開花の状況についてみる。最初に開花がみられたのは、球周4.5cm以上(第2項(3)、1993年12月植え試験)あるいは5.0cm以上(第2項(3)、1992年12月植え試験)の一作球根を植えた第二作目(培養球の栽培開始後1年1か月)であった。球周が6.0cm以上6.5cm未満のもの

では、草丈は低く、花数も1輪であったが、80%程度の開花率が得られた。このことから、第一作目での球根の肥大状況を考えあわせると、切り花としての利用には草丈に問題があるものの、150mg以上、できれば300 mg程度の培養球を用い、冷蔵処理と加温とを組合せて栽培することによって、栽培開始から開花までの期間をほぼ1年程度に短縮できることが分かった。

球根の植え付け時期を工夫すれば、開花時期をかなり促進することも可能であり、第2項4)のように、二作球根を冷蔵処理して10月に植え付けた三作目の場合、草丈・輪数は二作目と同様であったが、年内に開花した株もあった。また、第2項4)の無冷蔵球の場合、開花は季咲きで草丈40cm程度となり、球周 $10.0 \leq \sim < 11.5$ cm球では2輪開花するものもあった。一方、小西ら(85)は、テッポウユリにおいて、低温処理球を高温で促成するほど、開花は早くなるが茎長が伸びず花数も減少すると報告している。また、仙頭(169)は球周7~9cmのササユリ山掘り球根を平地で無加温・鉢栽培し、6月3日開花、草丈36.2cm、花数1輪の結果を得ている。これらの結果からみると、球周7~11cm程度の大きさの冷蔵球根を用い、加温ハウスでの年内促成栽培によって、切り花として十分な草丈と輪数を確保することは容易でないのかもしれない。さらに、第2項4)の無冷蔵球の栽培では、球周 $10.0 \leq \sim < 11.5$ cmの球根でも、草丈が比較的短く2輪開花する個体の割合が少なかった。その原因として、加温ハウスでの栽培であることから、球根内の生長点が、十分な葉数・茎長や花数を確保するために必要な低温量を受感する前に、花芽を分化・発達させてしまった可能性が考えられる。この場合には、花芽分化に適した環境条件となる前に、栄養生長を十分に行なわせ、普通葉の原基を多数確保させるような栽培をできれば、茎長の長い良質の切り花が得られることになる。しかし、その正確な原因を明かにして、良質の切り花を得るためには、冷蔵温度や栽培温度、球根サイズなどに関連したササユリの開花生理や、培養のために選抜すべき親球根の遺伝的形質などについても、さらに検討する必要がある。

なお、竹田(203)は、切り花栽培で2~3輪開花させるには、少なくとも30g以上の球根を使用しなければならないとしている。本実験に用いた球周11.0cm以上の球根の生体重を測定したところ30g程度であった(データ省略)。このことから考えると、第三作目終了後(栽培開始後約2年半)に得られた球周13.0cm程度に肥大した球根は、切り花生産に十分使用できるはずである。ただし、ササユリの場合、山野草的イメージもあり、花数が1~2輪と少なくとも可憐さをアピールできる。また、鉢花であれば草丈が低くても問題はない。したがって、促成鉢花として利用すれば、栽培開始後さらに短期間で出荷できることになろう。

栽培現場での生産を成功させるためには、生育に適した温度・光・土壌などの環境条件や施肥条件、畝栽培による球根養成・切り花生産、一作球根の冷蔵処理を簡便に行なう方法、夏季冷涼な中山間地域のような場所での栽培など、今後、さらに試験・検討すべき課題は残っている。しかし、第3節の結果から、



【 Production of leaf-emerging in vitro bulblets in cell trays 】



【 One of advancing-flowering tests (flowering in April) 】

Fig.58. Practical cultivation test of bulblets of L. japonicum produced in a simplified aerated liquid culture system.

実用的な液体通気培養で大量に生産した培養球根を利用し、ハウスなどでの栽培によって、ササユリの切り花や鉢花を短期間に生産できる可能性は十分に見出せた。

以上のように、本章で開発した簡便な子球大量増殖法を用い、生産された培養球根の栽培データを積み重ねることによって、組織培養によるユリ球根の大量増殖技術は実用化できるといえよう。実際、ササユリに関しては、本技術の生産体系を利用した栽培品目化をめざし、現在、栽培農家のハウスなどで大量の液体通気培養球根の栽培を行ない、現場レベルでの球根養成と開花株生産を試みているところである（第58図）。

## 第5節 摘要

寒天培養によって得られた結果を基に、実験材料としてササユリを用い、簡便な培養方法である液体培養におけるりん片切片からの子球の分化と生育に適した条件を明らかにするとともに、簡易な培養装置を利用した実用的な球根生産技術の開発を試みた。また、開発した実用的液体通気培養法によって増殖した培養球根の栽培試験を行なった。

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、液体通気培養が最も適していた。
2. 液体通気培養において、培地の主要塩類濃度やショ糖濃度を、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、ショ糖濃度は 4%程度が適した。
3. 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 の添加濃度は、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、 $0.01\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$ が適した。カイネチンやABA の添加は、子球の分化をむしろ抑制した。
4. 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、培養初期の子球の分化を抑制するような $28^{\circ}\text{C}$ 以上の高温を避ければ、 $23^{\circ}\text{C}$ を中心とした比較的広い温度範囲で培養できることが分かった。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促進される傾向が認められた。
5. 培養に供する無菌球根を得るためのりん片培養の期間は、3 か月程度が適当であり、これより長くなるにつれて、得られた球根の切斷切片から分化する子球の数が少なくなる傾向があった。また、りん片基部切片からの子球の分化は、先端部切片での場合と比較して2～3 週間程度早く、分化する子球の数も多



かった。

6. りん片切片から分化する子球の数は、培養 3週から 8週にかけて増加し、その後の増加数は少なかった。子球の平均球径は、培養 3週から 5週にかけて増大したが、子球数の増加が続いた 5週から 8週には、ほとんど変化しなかった。新たに分化する子球の数が少なくなった培養 8週以降でも、子球の平均球径は、ほとんど増加しなかった。一方、培地中の養分の経時変化をみると、培養 8から10週頃には、窒素、リン酸、カリウムおよび子球の生長・肥大に直接関係が深いと考えられる糖分が欠乏していた。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週以降には、新たな培地の補給が必要であると推察された。

7. 子球の生長に適した培地について、液体振盪培養を用いて検討した。その結果、高ショ糖濃度 ( $80\sim 100\text{ g}\cdot\text{liter}^{-1}$ ) が子球の肥大促進に有効であること、カイネチンは高ショ糖濃度の子球肥大促進効果を一層強めるが、同時に厚い葉を伸長させること、また、ABA は高ショ糖濃度による子球肥大促進効果を弱めるが、同時に葉の伸長も抑制することが分かった。さらに、カイネチン ( $0.5\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$ ) および ABA ( $0.1\text{ mg}\cdot\text{liter}^{-1}$ ) と高濃度のショ糖とを適当に組合せることによって、根や伸長する葉の少ない肥大した球根を効率よく得ることが可能であることも分かった。

8. 球根を切断して得た切片を培養した場合、球根からりん片を分離して切断した切片を培養した場合と比較して、切断切片から子球が分化する時期はやや遅れた。しかし、球根を切断した方が、得られる培養切片の総数が増加した結果、球根増殖倍率はむしろ向上した。

9. 無菌大気を通気できるように加工した市販のポリプロピレン製のコンテナボックスを、簡易培養槽に転用し、培地量  $1.5\ell$ 、供試子球数  $90\sim 100$  個で培養を行なった。培養16週間で、約  $2,000$  個の子球 (平均球径  $4.9\text{mm}$ 、平均球重  $109\text{mg}$ ) が得られた。

10. 約  $2\text{ mm}$ の間隔でカッターナイフの刃を並べた用具で球根を切断することによって、培養材料となる切片作成のプロセスの省力化を試みるとともに、簡易培養槽の容積を  $10\ell$ 、培地量を  $5\ell$ 、供試球根数を  $300$  個として、培養のスケールアップを試みた。培養10週間での球根増殖倍率は9倍であったが、培養が進むにつれて分化する子球の数が増加した。培養24週間での球根増殖倍率は15倍となり、約  $4,500$  個の球根が生産でき、その平均球径は  $5.9\text{mm}$ であった。

11. 簡易培養槽を用い、5～6か月間、 $23^{\circ}\text{C}$ ・暗黒・ショ糖添加培地で液体通気培養することによって得た球根は、16週間の出葉試験中に出葉せず、休眠状態にあることが分かった。

12. 土壌へ移植する前に、培養球根を8～12週間、 $4^{\circ}\text{C}$ で冷蔵処理することによって、休眠が打破され、その出葉および生育が促進された。また、 $200\text{ mg}\cdot\text{liter}^{-1}\text{GA}_3$  溶液で球根を浸漬した場合も、同様の促進効果を示したが、その程度は、冷蔵処理のものと比較して劣った。

13. 球重  $200\text{mg} \leq \sim < 300\text{mg}$  の培養球根を一作して得られる球根の球周の平均は、 $6.3\text{cm}$  となった。
14. 球周 $5.0\text{cm}$  以上に肥大した球根を栽培すると、多くの個体で抽台がみられた。12月に鉢に植えた球周  $6.0 \leq \sim < 6.5\text{cm}$  の冷蔵球根では、翌年 3月、その80% が開花した。また、開花した株の草丈は $20\text{cm}$ 程度、花数は 1輪であった。
15. 培養球根から養成した球周 $6.0 \leq \sim < 11.5\text{cm}$ の球根を12週間冷蔵して10月に植えた場合、年内に開花する株もあった。一方、冷蔵せずに10月に植えた同様の大きさの球根は、草丈 $35 \sim 40\text{cm}$ で 5～ 6月に開花し、球周 $10\text{cm}$ 以上の球根では、花数 2輪のものもあった。また、植えた球根の球周が  $7\text{cm}$ 以上の場合、栽培終了後に掘り上げた球根の球周の平均は  $11.9\text{cm}$  以上となった。
16. 以上の結果から、簡易球根切断用具や簡易培養槽を利用し、液体通気培養を行なうことによって、組織培養によるユリ球根の大量生産を実用的に行なえることが分かった。また、この方法で大量増殖した培養球根を利用し、冷蔵処理やハウスなどでの栽培を組合せることによって、これまで栽培技術が確立されていなかったササユリにおいても、短期間（栽培 1～ 3年）で切り花や鉢花を生産できる可能性が見出された。

## 第IV章 総括

ユリ類は、テッポウユリ、スカシユリを中心に鑑賞用花卉として、また、オニユリ、コオニユリなどでは食用球根として、以前から盛んに栽培されてきた。特に、最近では、胚培養技術などを利用して作出したハイブリッドリリーが多数市場に出回るとともに、花が大型化し、花色も豊富となり、園芸植物として、ますます重要となってきた。しかし、これらのユリ類においても、栄養繁殖を主とする植物種にとって避けることのできないウイルス汚染の問題が、依然として残された状況にある。したがって、ウイルスフリーユリ球根を作成して生産現場に供給することが、現在も強く望まれている。また、ユリ類球根の増殖についてみると、他の多くの球根植物と同様、成球となるまでに比較的長期間を必要とするものが多く、結果的にその増殖効率はあまり高くないといえる。一方、夏場のテッポウユリとして人気があるシンテッポウユリなどのように、種子による繁殖が可能で、比較的短時間で開花にまで至るものについては、草姿・開花期などの形質を揃えることが課題となっている。

本研究は、ウイルスフリーであり、かつ園芸的に望ましい優良な形質のユリ球根を、簡便な組織培養で効率よく大量増殖し、さらに、これらの球根の栽培における生育特性を明らかにすることによって、実用的なユリ生産技術を開発しようとしたものである。そのために、まず、*in vitro*でウイルスフリー球根を大量に得るための出発点として、寒天培地での茎頂組織の培養に関する種々の条件について調べ、肥大したりん片を多数有する小球根を短期間で形成させる方法を明らかにした。同時に、この茎頂組織の培養に由来する植物体のウイルスの保毒状態についても調査し、ウイルスフリー化できていることを示唆した。次に、茎頂組織の培養によって得られた小球根を培養の材料として、寒天培地上でウイルスフリー球根を大量に分化・増殖させる基本的な培養条件を明らかにするとともに、その培養球根の栽培特性についても調査した。さらに、これらの基本的な培養条件を基に、簡便な液体通気培養法と簡易な培養装置によるユリ球根の大量増殖技術を開発し、また、得られた通気培養球根の開花促進試験を行ない、組織培養系における球根の大量増殖を利用したユリ生産の実用化を試みた。

以下にその結果の概要を記す。

茎頂組織の培養については、テッポウユリを中心として、茎頂組織からの葉条や根の形成と生育に及ぼす培地組成および培養条件の影響について検討を行なった。

窒素やカリなどの栄養源を豊富に含むMSの主要塩類組成を用いると、培地に置床した茎頂組織から速やかな発根がみられ、形成された葉条基部の肥大・りん片化も認められた。培地のpH自体の影響をみると、5.7を最高に3.7から7.7の広範囲にわたって、茎頂組織から形成された葉条と根は良好な生育を示した。寒天  $12\text{g}\cdot\text{liter}^{-1}$ を添加した硬い培地で、これらの葉条・根の生育が抑制されることと、pHを7.7に

調整した寒天培地の硬度を考え合わせると、培地のpH調整は5.7を中心として4.7から6.7の範囲とすることが適当である。また、ショ糖は、球根の形成・肥大に重要であることから、一般の組織培養に用いられている濃度より、やや高めめの $40\text{g}\cdot\text{liter}^{-1}$ の濃度が適していると考えられる。

培養温度に関しては、 $23^{\circ}\text{C}$ 付近が葉条や根の生育に適しており、 $30^{\circ}\text{C}$ 以上になると置床した茎頂組織自体の生育が阻害されることも分かった。また、一般に、培養温度が高くなると葉の伸長は抑制され、一方、りん片の肥大は促進される傾向もみられた。培養中の照明は特に必要なく、暗条件でもりん片の肥大は良好であるが、葉の伸長は抑制される傾向があった。光を照射する場合、1,500から4,000 lx程度の照度で、葉条や根の生育に関して良い結果が得られたが、400 lxのような低照度や8時間といった短時間の照明では、葉条から伸長した葉は細く、その基部の肥大・りん片化も不十分であった。これは、エネルギーを消費しながら茎頂組織から分化・伸長してきた葉が、このような低照度・短時間照明といった光条件下では、光合成能力を十分に発揮できず、その旺盛な生育やりん片形成を達成することができなかったことによるのではないかと推察される。

また、数種類のユリについて茎頂培養を試みた結果、培地中の生長調節物質に対する茎頂組織の反応から、ユリを3つのグループに分類できると考えられる。すなわち、1) テッポウユリ、ハカタユリ、ササユリ、ヒメユリ、‘エンチャントメント’、‘金扇’など、NAA ( $0.1\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$ )の添加によって肥大した球根が得られるもの、2) カノコユリ、ヤマユリなど、サイトカイニン類(BA  $0.1\sim 1.0\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$ 、カイネチン $1.0\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$ )の添加によって、多数の小さな不定芽を分化した「不定芽塊」の形成が促進されるもの(この「不定芽塊」は、切断分離して移植すると、それぞれの切片は培地中の生長調節物質の種類に応じて不定芽の増殖や球根形成を行ない、増殖材料として利用できる)、3) ‘清津紅’、‘烏羽玉’など、NAAの添加により生存率が向上し、小球も複数個形成されるが、球根の肥大が不良なもの、の各グループである。このような種や品種の特性を知り、肥大した球根や「不定芽塊」の形成に適したNAAあるいはサイトカイニン添加培地を、それぞれのユリについて適切に使用することや、球根肥大の不良なユリ類では、球根生長用の移植培地を利用するなどの肥大促進条件を明らかにすることによって、ユリ茎頂組織の培養法は確立できる。また、培養の環境条件は、ユリの自生地での環境と関連しながら、茎頂組織から形成される葉条や根の生育に対して大きな影響を持つと考えられる。したがって、温度などの培養環境についても、それぞれのユリの種・品種における自生地や栽培現場でのデータを参考にしながら、適切な条件を選ぶことが必要である。

さらに、本研究の茎頂組織の培養に由来する子球のウイルス保毒状態を知るために、電子顕微鏡観察によるウイルス粒子の検出およびタカサゴユリ実生苗への葉汁液接種によるウイルス検定を行なった。その結果、両検定法によって、*in vitro*から鉢上げした被検定植物の抽台後の比較的早い生育段階から紐状ウ

ウイルスを検出できること、また、本研究の茎頂培養によって得られた子球はウイルスフリーであることが示唆された。しかし、被検定植物を育成・管理する設備や労力をさらに省き、また、できるだけ早期に無病球根の増殖を開始するためには、*in vitro*の幼植物体を被検定材料として直接用いることが望ましい。したがって、抗原抗体反応と電子顕微鏡観察を組合せたような方法や遺伝子診断技術を利用した新しい検定方法なども検討し、さらに精度の高いウイルス検定技術を確立することも重要である。

茎頂組織の培養によって得られた無菌幼植物から、さらに球根を増殖する方法については、主にテッポウユリとカノコユリを用い、子球りん片、葉あるいは抽台した茎の節を培養材料として、肥大した子球を効率よく分化させる条件を検討した。

葉や節の切片もユリ子球を増殖する培養材料として利用できたが、その培養効率や培養プロセスが煩雑であることなどを考慮すると、増殖材料としてりん片を使用するりん片培養が最も実用的であった。

生長調節物質として、オーキシン、特にNAAを $0.1\text{mg}\cdot\text{liter}^{-1}$ の濃度で培地に添加すると、りん片切片からの子球の分化と生長が促進された。サイトカイニン類の添加は、カノコユリなどで、切片からの不定芽の分化を著しく促進する傾向を示したが、この場合、不定芽を子球まで生育させるためには、生長調節物質を添加していない培地あるいは低濃度のNAAを添加した培地へ移植することが必要であった。また、りん片を分割・切断して培養すると、その切断面が肥大し、そこから不定芽が形成されるため、1りん片当たり得られる子球の総数は、さらに増加することも分かった。

高いショ糖濃度 ( $60\sim 120\text{g}\cdot\text{liter}^{-1}$ ) あるいは比較的高い温度条件 ( $27\sim 28^{\circ}\text{C}$ ) で培養すると、形成された子球からの葉の伸長は抑制されるが、子球自体の生長は促進される傾向があった。

以上のような培養条件を適切に組合せることによって、茎頂組織の培養に由来する子球を、固体（寒天）培地を用い*in vitro*で効率よく増殖できることが明らかになったので、これらの寒天培養球根を鉢上げし、その生育特性について調べた。

テッポウユリの培養球根は、低温処理を行わなくても、鉢上げ後、速やかに出葉・抽台し、第一作目の開花率は92%であった。また、掘り上げ調査した一作球根は、球周11～12cmで、球重35g程度にまで肥大しており、これを栽培すると品質の良い切り花を採ることができた。このようにテッポウユリでは、培養球から切り花用の販売球を得るまでに一作の養成期間で十分であることが分かった。一方、カノコユリの培養球根は、抽台を誘導するために低温を必要とした。これは、培養に用いた品種‘内田かのご’の選抜親であるカノコユリにおける球根成熟や抽台に対する低温要求性を、培養球根が受け継いでいることを示唆している。したがって、培養での球根増殖の場合と同様、得られた培養球根の栽培に関しても、それぞれのユリの種類について、自生地の環境条件や球根の生理などを明らかにしておくことが重要である。また、鉢上げ前に低温処理した培養球根では、抽台した茎葉による同化作用の増大の結果、球根の充

実を一層促進したと考えられ、開花球根を得るまでの球根養成期間を短縮することができた。このように、培養球根を利用した栽培の実用化のためには、ユリの種類に応じて、その生理特性を参考にしながら低温処理などを行ない、生育サイクルを短縮し、早期に開花個体を得る栽培技術を開発することが必要である。

トサヒメユリの場合、培養における球根の肥大が良好であり、伸長葉と根を含む培養球根の生体重は3～5gとなった。また、これらの球根は鉢上げすると一作で2輪開花した。一方、春に鉢上げした1～2gの培養球根では、秋に再度鉢へ移植して栽培することによって、良品質の切り花が得られた。したがって、苗養成から定植・栽培までを連続して考えると、実質的に栽培一作で切り花生産する作型の開発も可能であることになる。シンテッポウユリの培養球根においても、鉢上げ栽培4か月で草丈が約80cmに伸長し、開花率は100%となった。このように、種子繁殖で球根を増殖するため、その形質にバラツキを生じるユリや、小球でも開花する能力の認められるユリ類は、組織培養系を利用した実用的な球根生産の対象として期待できる。

さらに、寒天培養で得られた基本的な培養条件を基にして、ユリ球根の大量増殖方法を実用化することを目的に研究を進めた。そのために、ササユリ球根をモデルとして、簡便な培養方法と簡易な培養装置を用い、組織培養による実用的な球根生産技術の開発を試みた。

まず、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した。培養切片の植え込み、培地交換、培養のスケールアップ、切片からの子球の分化・生長などの効率を総合的に考慮すると、比較した液体支持材培養、液体振盪培養、液体通気培養およびカプセル培養のうち、液体通気培養が、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最も適した。なお、カプセル培養では、子球の分化が遅く、その生育も劣り、切片の切断部位が褐変する傾向もみられたが、この培養法は、育苗室などに置いたセルトレイでカプセルを培養しながら栽培へ移行してプラグ球根化するといった、別の方向での技術展開も考えられるので、さらに検討する価値がある。

次いで、実用的な培養方法として適することが分かった液体通気培養を用い、りん片切片からの子球の分化・増殖に及ぼす培養条件の影響について検討した。

通気するガスの酸素濃度については、20.9%すなわち大気を通気することによって、寒天培養と同等の子球の分化程度が得られ、さらに酸素濃度を高めても子球の分化を促進することはなかった。短時間に活発な細胞分裂が進行し、酸素消費量が増大するカルス増殖の場合と異なり、りん片切片から子球が分化・生長する過程は長時間を要し、その際の酸素消費量は、比較的低いレベルで推移すると推察される。培地中の主要塩類濃度やショ糖濃度については、寒天培養の場合と同様か、やや低濃度にしておく方が、子球

の分化は早まる傾向がみられ、液体培地では、栄養分などの吸収効率が良いことを示唆した。培養8週での子球の分化と生育に関する結果からみて、主要塩類濃度はMS標準濃度の3/4倍が、ショ糖濃度は4%程度が適していると考えられた。培地中の生長調節物質の影響についてみると、寒天培養の場合と同様、NAAの添加が突起物の分化とその芽や子球への生育を促進した。培養切片から分化した子球の数は、NAAを0.01あるいは0.1mg・liter<sup>-1</sup>の濃度で添加した培地で多くなったが、0.1mg・liter<sup>-1</sup>では、発根数も増加した。このNAA0.1mg・liter<sup>-1</sup>による発根数の増加は、子球の生長促進に効果を示さなかった。したがって、培養スペースの有効利用や分化・増殖した子球を取り出して切断する際の作業効率などを考慮すると、培地中のNAA濃度は0.01mg・liter<sup>-1</sup>の方が適するといえる。一方、カイネチンやABAの添加は、子球の分化をむしろ抑制する傾向を示した。これは、培養材料となるユリの種による、りん片切片の内生ホルモンレベルなどの生理状態の差異と関連している可能性も考えられるが、その正確な原因は不明であり、さらに検討が必要である。培養温度に関しては、18℃、23℃のいずれの温度でも子球の分化と生長は順調であった。また、子球の分化に対して抑制的であった28℃においても、一旦分化した子球の生長は抑制されず、その肥大が認められた。したがって、ユリの場合、特に培養初期における28℃以上のような高温を避ければ、20～23℃付近を中心とした比較的広い温度範囲で培養することが可能である。また、培養中の照明の影響をみてみると、寒天培養と同様、明条件で葉の伸長が促進される傾向があったが、子球の分化自体については、明暗両条件でほとんど差異はみられなかった。

また、次代の液体通気培養に供する無菌子球を得るために行なうりん片切片の継代培養の期間は、3か月程度が適していた。これより長くなるにつれて、得られた子球の切片から分化する子球の数が少なくなる傾向があった。培養材料としての子球の数と大きさを考慮すると、継代培養の期間は3～6か月程度が適している。また、りん片の基部切片から子球が分化する時期は、先端部切片の場合と比較して2～3週間程度早く、その数も多かった。このことが、同一培養容器内で生産された培養球根の球径・球重の分布に幅を生じた原因の一つと推察される。

りん片切片から分化する子球の数は、培養3週から8週にかけて増加した。また、分化した子球の平均球径は5週目から増加せず、子球の分化数が少なくなる8週以降でも、その傾向はほとんど変化しなかった。一方、培養中の培地栄養分の経時変化を調べたところ、特にアンモニア態窒素、リン酸および糖は、培養開始後速やかに減少し、培養8週から10週頃には、培地中の栄養分が欠乏していることが分かった。これらのことから、分化した子球の生長に必要な栄養分は、培養8週を過ぎた頃には不足してきており、子球を効率よく肥大させようとするれば、培地栄養分の補給が必要であると考えられる。したがって、培養8～10週頃の時点で、培養初期に用いる子球分化に適した培地から、分化した子球の生長に適した培地へと交換する2段階培養を行なえば、一層効率よく球根増殖を行なえることになる。

分化した子球の生長に適した培地については、液体振盪培養によって検討を行った。寒天培養と同様、培地中のショ糖濃度が高まるにつれて葉の伸長が抑制される傾向があった。子球自体の生長に対しては80~100g·liter<sup>-1</sup>のショ糖濃度が適した。ショ糖80g·liter<sup>-1</sup>の培地にカイネチンを添加した場合、子球自体の肥大は良好であったが、同時に、発根の抑制と旺盛な葉の伸長も認められた。子球に吸収されたカイネチンは養分の集積に効果を示し、子球のシンクとしての機能を強めると同時に、葉を伸長・展開させる生理的状态をもたらすようなホルモン作用も示したと考えられる。一方、ショ糖80g·liter<sup>-1</sup>にABAを組合せて添加した場合、球根重の増加率が減少するとともに葉の伸長も強く抑制された。そこで、ショ糖100g·liter<sup>-1</sup>とカイネチン0.5mg·liter<sup>-1</sup>およびABA 0.1mg·liter<sup>-1</sup>を組合せた培地で子球を培養したところ、伸長葉数の比較的少ない肥大した球根を得ることができた。したがって、ショ糖、カイネチンおよびABAとを適当な濃度で組合せることによって、伸長葉や根の少ない肥大した球根を効率よく得ることも可能である。

以上の結果を基に、液体通気培養法を用い、培養を簡便化してスケールアップする実用化試験を試みた。培養切片作成の労力を軽減するため、メスで球根を切断して得られた切片を培養した場合、球根から分離したりん片を切断して得た切片と比較して、子球の分化時期はやや遅れ、分化する子球の数も減少した。しかし、培養切片の総数が増加するので、培養に供した球根数に対する分化した球根数でみた球根増殖倍率はむしろ向上した。また、培養槽については、市販のポリプロピレン製のコンテナボックスを無菌的に通気できるように加工して使用した。このコンテナボックスの利用は、ガラス製や金属製培養槽の場合に予想されるような、排気口の閉塞による爆発破損といった大きな事故の危険性が少なく、しかも安価であるといった利点がある。簡易培養槽の容積 3ℓ、培地量 1.5ℓ、供試子球数90~100個で通気培養を行なったところ、培養16週間で、約2,000個の子球(平均球径 4.9mm、平均球重 109mg)が得られた。さらに、約2 mmの間隔でカッターナイフの刃を並べた用具で子球を切断することによって、培養材料となるりん片切片を作成するプロセスの一層の省力化を試みるとともに、培養槽の容積を10ℓ、培地量を5ℓ、供試球根数を300個として、培養のスケールアップを行なった。その結果、培養10週間で球根増殖倍率は9倍と低かったが、培養が進むにつれて分化する子球の数が増加した。培養24週間で球根増殖倍率は15倍となり、約4,500個の球根が生産でき、その平均球径は5.9mmであった。子球の分化数が培養初期に少なく、培養の経過とともに増加した原因としては、次のような可能性がある。まず、りん片基部を付着した底盤部の中心部位にある生長点が生育して子球を形成する。その後、底盤部に付着していたりん片基部が肥大して子球を分化すると同時に、小さな切断切片やりん片先端部位の切片からも子球が分化してくる。その結果、培養後半に球根増殖率が向上することになったと考えられる。

最後に、簡便な液体通気培養法により大量増殖したササユリ培養球根を用い、その鉢上げ後の生育に及



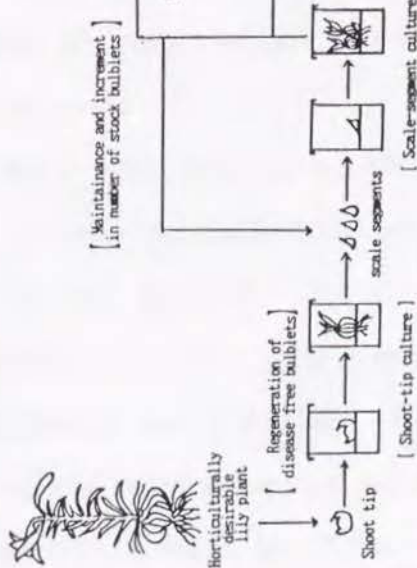
ぼす冷蔵とジベレリン (GA<sub>3</sub>) 浸漬処理の影響や球根の肥大と開花との関係を調査し、開花株の生産促進の可能性を検討することによって、組織培養を利用したユリ生産体系の実用化をめざした。

液体通気培養球根は、通常の球根や寒天培養球根と同様の生育特性を示した。すなわち、23℃・暗黒・ショ糖添加培地で5～6か月間液体通気培養することによって得られた球根は、16週間の出葉試験中に出葉せず、休眠状態にあり、その休眠の程度は、球根が継代培養中に示した出葉の難易と関連することも示唆された。培養球根の休眠打破や鉢上げ後の生育促進には、球根のGA<sub>3</sub> 200mg・liter<sup>-1</sup> 浸漬処理あるいは8～12週間の冷蔵処理が有効であった。ハウス内で秋に植え付けた無冷蔵培養球根は、ハウス内の気温が高温となる前の翌年3月上旬頃前から盛んに出葉・生育し、9月の栽培終了時の球根肥大は良好であった。一方、GA<sub>3</sub> 処理あるいは冷蔵処理により出葉が速やかにみられる球根の植え付けを、1月下旬から2月上旬頃、無加温ハウスで行なえば、生育適温の間に十分植物体を生長させることができ、経済的にも効率よく球根を養成できることも分かった。

球重200～300mg以上の培養球根からは、球周6cmを超える一作球根が得られた。培養球根を2月に栽培開始して9月に掘り上げて得た球周6.0 ≤ < 6.5cmの一作球根を、再度冷蔵し、12月に鉢へ移植した場合、草丈は20cmと低く、花数も一輪であったが、約80%の個体が翌年3月に開花した。さらに、冷蔵処理した球周6.0 ≤ < 11.5cmの二作球根を10月に鉢に植え付けることによって、開花時期を年末年始にまで促進することができた。一方、同サイズの二作無冷蔵球根を秋植えすると、翌年5～6月に開花し、草丈は35～40cmとなった。球周10.0 ≤ < 11.5cmの植え付け球根では、花数2輪のものもあった。また、球周7cm以上の植え付け球根では、栽培終了後、11cm(約30g)を超える球周の掘り上げ球根が得られた。これらの30g以上球を用いれば、切り花生産も可能であると考えられ、また、冷蔵温度や栽培温度、球根サイズなどに関連したササユリの開花生理や培養材料として選抜すべき親球根の遺伝的形質等についても、さらに検討することによって、より品質の優れた切り花が得られるようになると思われる。このように、これまで栽培技術が確立されていなかったササユリにおいても、液体通気培養球根を利用して、1～3年で切り花や鉢花を生産できる可能性が見出せた。実際、農家のハウスなどを利用して、実用的レベルでの栽培試験が行なわれているところである。

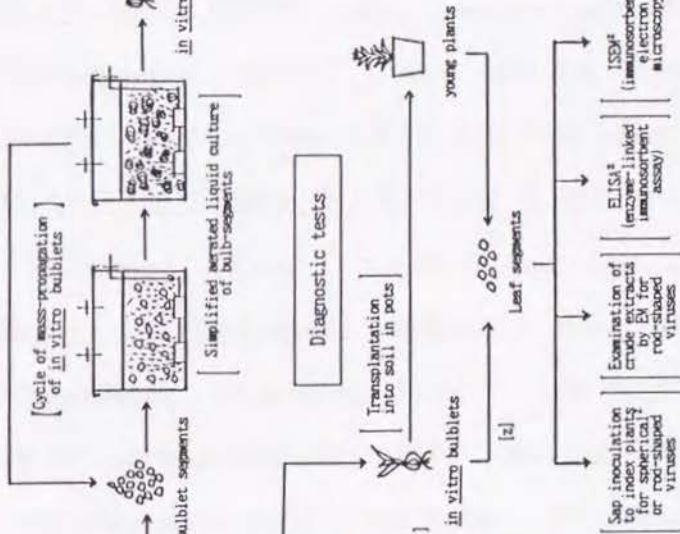
以上の結果から、目的とするユリの種によって、培養条件を検討・確認する必要があることは言うまでもないが、基本的には、簡易切断用具や簡易培養槽を利用し、簡便な液体通気培養を行なうことによって、誰でも、どこでも、簡単に、組織培養によるユリ球根の実用的な大量生産技術を実現でき、また、この方法で生産した液体通気培養球根を利用しても、寒天培養球根と同様、短期間で成球を生産することが可能であることが分かった。したがって、組織培養系による球根の大量増殖を利用した、ウイルスフリーなどの無病ユリ優良系統の実用的生産技術システム(第59図)が開発できたといえる。

(Step 1) Regeneration and maintenance of disease-free bulbets in vitro



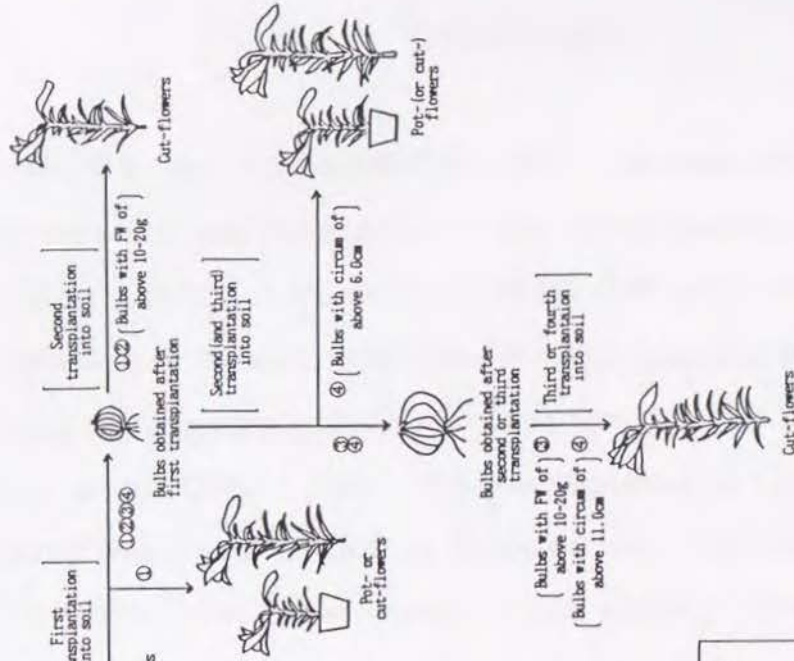
(Step 1) Conditions of shoot-tip and scale-segments culture  
 Explant : One shoot tip per culture vessel (shoot-tip culture).  
 Fifteen scale segments per culture vessel (scale-segment culture).  
 Culture media : MS's micro-elements and Fe, 40g-liter<sup>-1</sup> sucrose, 0.1mg-liter<sup>-1</sup> NAA, pH 5.7 (4.7-6.7), 8g-liter<sup>-1</sup> agar.  
 Conditions of temperature : 23-28°C.  
 Conditions of lighting : Lighting for 16-24hr-day<sup>-1</sup> (L:500-4,000lx or darkness).  
 Culture vessel : Culture tube (ø 25mm) with 20ml medium (shoot-tip culture), Culture bottle (200ml) with 50ml medium (scale-segment culture).  
 Culture period : 70-90days.  
 Propagation rate of bulbets : 10 (L. longiflorum) in scale-segment culture, 12 (L. x formolongo) 9 (L. concolor) 10-30 (L. speciosum) 15 (L. japonicum) [\* no. of differentiated bulbets/no. of cultured in vitro bulbets]

(Step 2) Mass-propagation of bulbets in vitro



(Step 2) Conditions of simplified aerated liquid culture of bulblet-segments  
 Explant : bulblet segments (16,000-30,000mg-liter<sup>-1</sup>)  
 First culture medium : 3/4 strength of MS macro-elements, MS's Fe, for bulblet differentiation 40g-liter<sup>-1</sup> sucrose, 0.01mg-liter<sup>-1</sup> NAA, pH 5.7 (4.7-6.7).  
 Second culture medium : MS's micro-elements and Fe, for bulblet growth 80-100g-liter<sup>-1</sup> sucrose, (0.1mg-liter<sup>-1</sup> ABA (0.5mg-liter<sup>-1</sup> kinetin) pH 5.7 (4.7-6.7).  
 Conditions of aeration : 1.000ml-min<sup>-1</sup> aeration of 20.9% O<sub>2</sub> (ambient air) through 4 bubble filters.  
 Conditions of temperature : 18-23 °C for bulblet differentiation, 23-28 °C for bulblet growth.  
 Conditions of lighting : Darkness for lighting (0.500lx) for 16-24hr-day<sup>-1</sup>.  
 Culture vessel : Polypropylene container (10,000ml) with 5,000ml medium.  
 Culture period : 70-90days for bulblet differentiation, 70-90days for bulblet growth.  
 Propagation rate of bulblet : 15-22 (L. japonicum) [\* no. of differentiated bulbets/no. of cultured in vitro bulbets]

(Step 3) Advancing production of flowering plants and commercial bulbs



(Step 3) Example of cultivation of in vitro bulbets of several lilies

Cultivated lilies	FW of <u>in vitro</u> bulblet (mg)	Time of first transplanting	Treatment <sup>2</sup> for breaking dormancy of <u>in vitro</u> bulbets	Route of cultivation
L. longiflorum	400-600	Autumn	-	①
L. x formolongo	400-600	Spring	- (+)	①
L. concolor	3,000-5,000	Autumn	-	②
"	1,000-2,000	Autumn	-	②
L. speciosum	700-900	Autumn	+	③
"	700-900	Autumn	+	③
L. japonicum	100-300	Autumn	-	④
"	300-400	Autumn	+	④

z : Cold storage of bulbets at 4 °C for 8-12 weeks or bulblet immersion in 200mg-liter<sup>-1</sup> Okh for 24 hr.

Fig. 59. Scheme of a practical mass-production system of horticulturally desirable lilies with a simplified in vitro culture technique.

## 引用文献

1. ABO EL-NIL, M.M. and A.C.HILDEBRANDT. 1971. Differentiation of virus-symptomless geranium plants from anther callus. *Plant Disease Reporter* 55:1017-1020.
2. AGUETTAZ, P., A. PAFFEN., I. DELVALLEE, P. VAN DER LINDE and G-J DE KLERK. 1990. The development of dormancy in bulblets of Lilium speciosum generated in vitro. 1. The effects of culture conditions. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 22:167-172.
3. ALLEN, T.C. and A.R. LYONS. 1969. Electron microscopy of lily symptomless virus and cucumber mosaic virus within fleck diseased lilies. *Phytopathology* 59:1318-1322.
4. ALLEN, T.C. 1971. Electron microscopy of lily viruses. *Lily Yb., N. Amer. Lily Soc.* 24: 29-36.
5. ALLEN, T.C. and K. FERNALD. 1973. Multiplication of virus-free 'Enchantment' lily in culture tubes. *Lily Yb., N. Amer. Lily Soc.* 26:69-72.
6. ALLEN, T.C. 1974. Production of virus-free lilies. *Acta Hortic.* 36:235-237.
7. ALLEN, T.C., R.G. LINDERMAN, E.A. MCRAE and K. FERNALD. 1974. Performance of virus-free 'Enchantment' lilies. *Lily Yb., N. Amer. Lily Soc.* 27: 42-44.
8. ALLEN, T.C., R.G. LINDERMAN and K. FERNALD. 1975. Reinfection and performance of 'Enchantment' lilies in the field. *Lily Yb., N. Amer. Lily Soc.* 28: 96-97.
9. ALLEN, T.C. and R.G. LINDERMAN. 1976. Rate of infection of virus-free lilies with lily symptomless virus in the field. *Acta Hortic.* 59:37-38.
10. ALLEN, T.C. 1980. Diagnosis of virus diseases of Lilies. *Lily Yb., N. Amer. Lily Soc.* 33:41-43.
11. ALLEN, T.C., W.G. ANDERSON, A.N. ROBERTS, L. RIDDLE and J.P. McMORRAN. 1981. Reinfection of virus-free Easter lilies grown among virus-infected Easter lily. *Lily Yb., N. Amer. Lily Soc.* 34:25-27.
12. ANDERSON, W.C. 1977. Rapid propagation of Lilium, c.v. Red Carpet. *In Vitro* 13:145.
13. APPELGREN, M. and O.M. HEIDE. 1972. Regeneration in Streptocarpus leaf discs and its regulation by temperature and growth substances. *Physiol. Plant.* 27:413-423.
14. ARORA, Y.K., S. NAKAO. and T. NAKAJIMA. 1970. Perpetuation of Begonia rex by aseptic culture with micro-leaf cuttings under various conditions of auxin and cytokinin.

- Japan. J. Breed. 20:275-281.
15. ASJES, C. J., M. H. BUNT and D. H. M. VAN SLOGTEREN. 1974. Production of hyacinth mosaic virus-free hyacinths and lily symptomless virus-free lilies by meristem tip culture. Acta Hortic. 36:223-228.
  16. ASJES, C. J. 1976. Some developments of the virus pathology in lilies in the Netherlands. Lily Yb., N. Amer. Lily Soc. 28:120-126.
  17. BAJAJ, Y. P. S. 1972. Effect of some growth regulators on bud formation by excised leaves of Torenia fournieri. Z. Pflanzenphysiol. 66:284-287.
  18. BAPAT, V. A., M. MHATRE and P. S. RAO. 1987. Propagation of Morus indica L. (Mulberry) by encapsulated shoot buds. Plant Cell Reports 6:393-395.
  19. BARUCH, E. R. and F. QUAK. 1966. Virus-free plants of iris 'Wedgwood' obtained by meristem culture. Neth. J. Plant Path. 72:270-273.
  20. BEHKI, R. M. and S. M. LESLEY. 1976. In vitro plant regeneration from leaf explants of Lycopersicon esculentum (tomato). Can. J. Bot. 54:2409-2414.
  21. BOXUS, PH. 1974. The production of strawberry plants by in vitro micro-propagation. J. Hort. Sci. 49:209-210.
  22. BRANTS, D. H. and H. VERMEULEN. 1965. Production of virus-free freesia's by means of meristem culture. Neth. J. Plant Path. 71:25-27.
  23. BRIERLEY, P. 1940. Prevalence of cucumber and tulip viruses in lilies. Phytopathology 30:250-257.
  24. BRIERLEY, P. and F. F. SMITH. 1944. Studies on lily virus diseases :The mottle group. Phytopathology 34:718-746.
  25. BRIERLEY, P. and F. F. SMITH. 1944. Studies on lily virus diseases :The necrotic-fleck complex in Lilium longiflorum. Phytopathology 34:529-555.
  26. BRIERLEY, P. and F. F. SMITH. 1945. Additional species of Lilium susceptible to lily-rosette virus. Phytopathology 35:129-131.
  27. BRIERLEY, P. 1962. A lily ringspot virus from Georgia. Plant Disease Reporter 46:625-626.
  28. CHEN, C. H. and D. J. HOLDEN. 1975. Cloning Lilium philadelphicum L. by tissue culture. Proc. S. D. Acad. Sci. 54:143-147.

29. CHEN, C. H., W. L. JONES and D. D. SONGSTAD. 1983. Cloning Lilium formosanum through leaf and bulb scale cultures. Amer. J. Bot. 70:85
30. CHUN, Y. W., R. B. HALL and L. C. STEPHENS. 1986. Influences of medium consistency and shoot density on in vitro shoot proliferation of Populus alba × P. grandidentata. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 5:179-185.
31. CHURCHILL, M. E., J. ARDITTI and E. A. BALL. 1971. Clonal propagation of orchids from leaf tips. Amer. Orch. Soc. Bull. 40:109-113.
32. EARLE, E. D. and R. W. LANGHANS. 1974. Propagation of Chrysanthemum in vitro. I. Multiple plantlets from shoot tips and the establishment of tissue cultures. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 99:128-132.
33. EARLE, E. D. and R. W. LANGHANS. 1974. Propagation of Chrysanthemum in vitro. II. Production, growth, and flowering of plantlets from tissue cultures. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 99:352-358.
34. FIGUEIRA A., A. WHIPKEY and J. JANICK. 1991. Increased CO<sub>2</sub> and light promote in vitro shoot growth and development of Theobroma cacao. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 116:585-589.
35. 藤野守弘. 1983. アマリリスの組織培養による増殖とウイルスフリー球の育成. 昭58兵庫農総生物工学プロジェクト試験成績書 :27-28
36. 富士原和宏・古在豊樹・渡部一郎. 1986. 植物組織培養器内環境の基礎的研究 (第3報) 小植物体を含む閉栓容器内の炭酸ガス濃度と小植物体の光合成特性. 園学要旨. 昭61春:412-413.
37. 富士原和宏・古在豊樹・渡部一郎. 1987. 植物組織培養器内環境の基礎的研究. (3) 培養小植物体を含む閉栓容器内の炭酸ガス濃度測定と培養小植物体の純光合成速度の推定. 農業氣象 43 :21-30
38. 福井博一・安達延雄・原徹夫・中村三夫. 1988. ササユリの大量増殖に関する研究. 第1回植物組織培養コロキウム要旨集 : 82-83.
39. 福住久代・磯部武志. 1990. ストック葉片培養で形成されたシュートの発根法改善に関する研究. 園学雑. 59(別1):532-533.
40. 古川仁朗・佐々木弘康・坂本立弥. 1987. ユリの花器培養に関する研究 (第1報) 花器各部の培養と植物体の再生について. 園学要旨. 昭53春:338-339.

41. 古谷 博. 1993. ササユリの培養温度及び低温処理が順化後の生育に及ぼす影響. 園学雑. 62 (別2):713.
42. GAMBORG, O.L. 1970. The effects of amino acids and ammonium on the growth of plant cells in suspension culture. *Plant Physiol.* 45:372-375.
43. GLEBA, Y.Y. 1978. Microdroplet culture. Tobacco plants from single mesophyll protoplasts. *Naturwiss.* 65:158-159.
44. GUPTA, P.P., A.K. SHARMA and H.C. CHATURVEDI. 1978. Multiplication of Lilium longiflorum Thunb. by aseptic culture of bulb scales and their segments. *Indian J. Exp. Biol.* 16:940-942.
45. HACKETT, W.P. 1969. Aseptic multiplication of lily bulblets from bulb scales. *Proc. Int. Plant Prop. Soc.* 19:105-108.
46. HALPERIN, W. and D.F. WETHERELL. 1965. Ammonium requirement for embryogenesis in vitro. *Nature* 205:519-520.
47. HALPERIN, W. 1967. Population density effects on embryogenesis in carrot-cell cultures. *Exp. Cell Res.* 48:170-173.
48. HANSEN, A.J. and A.C. HILDEBRANDT. 1966. The distribution of tobacco mosaic virus in plant callus cultures. *Virology* 28:15-21.
49. HARVAIS, G. 1973. Growth requirements and development of Cypripedium reginae in axenic culture. *Can. J. Bot.* 51:327-332.
50. 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. 園学雑. 61 (別2):831.
51. HASEGAWA, P.M., T. MURASHIGE and F.H. TAKATORI. 1973. Propagation of asparagus through shoot apex culture. II. Light and temperature requirements, transplantability of plants, and cyto-histological characteristics. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 98 : 143-148.
52. 林真紀夫. 1991. 光独立栄養培養、順化、栽培システム. 第1回SHITA シンポジウム講演予稿集 :56-63.
53. HIGGINS, W.S. and D.P. STIMART. 1990. Influence of *in vitro* generation temperature and post-*in vitro* cold storage duration on growth response of Lilium longiflorum bulblets. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 115: 930-933.

54. 平田良樹・田村輝夫. 1969. テッポウユリ促成栽培における土壤反応のおよぼす影響. 園学要旨. 昭44秋:206-207.
55. 平田良樹・国重正昭. 1982. 球根アイリスのウイルス病に関する研究. 野菜試報. C:83-99.
56. HOLMES, F.O. 1948. Elimination of aspermy virus from the nightingale chrysanthemum. *Phytopathology* 46:599-600.
57. 穂坂八郎・横井政人. 1959. ユリのりん片繁殖に関する研究. 千葉大園芸学部学報. 7:45-55.
58. HOSOKI, T. 1975. Propagation of tropical plants by tissue culture. Ph. D. Thesis. Univ. of Hawaii, Honolulu, Hawaii.
59. 細木高志・浅平端. 1976. 組織培養によるスイセンおよび *Allium giganteum* の繁殖に関する研究. 園学要旨. 昭51秋:254-255.
60. HOSOKI, T. and T. ASAHIRA. 1980. *In vitro* propagation of Bromeliads in liquid culture. *HortScience* 15:603-604.
61. 今西英雄. 1988. ユリ類. p.208-228. 小西国義ら編著. 花卉の開花調節. 養賢堂. 東京.
62. INFANTE, R., E. MAGNANINI and B. RIGHETTI. 1989. The role of light and CO<sub>2</sub> in optimising the conditions for shoot proliferation of *Actinidia deliciosa* in vitro. *Physiol. Plant.* 77:191-195.
63. 井上成信・前田孚憲・光畑興二. 1979. ユリから分離された citrus tatter leaf virus. 日植病報. 45:712-720.
64. 石破知加子・村田孝広・牧 清文・西谷孝司. 1992. ユリ・オリエンタル系ハイブリッド大量増殖システムの開発 (第1報) 液体培養によるユリ子球の増殖・肥大. 園学雑. 61 (別2): 486-487.
65. 石破知加子・村田孝広・牧 清文・西谷孝司. 1992. ユリ・オリエンタル系ハイブリッド大量増殖システムの開発 (第2報) 培養球根の肥大に及ぼす低温処理の影響. 園学雑. 61 (別2): 488-489.
66. 市村一雄・内海敏子・辻 顕光・長岡正昭. 1990. トマト子葉からの不定芽生長に及ぼす培地支持体の影響. 園学雑. 59 (別2):344-345.
67. 伊藤憲作. 1955. 鉄砲百合の鱗片繁殖に関する二、三の観察 1. 母球の掘取期と鱗片伏込期に就いて. 農及園. 30:340.
68. 伊藤憲作. 1955. 鉄砲百合の鱗片繁殖に関する二、三の観察 (第2報) 着生球数の増加法に

- 就いて. 農及園. 30:467-468.
69. 伊藤憲作. 1955. 鉄砲百合の鱗片繁殖に関する二、三の観察 III: 鱗片処理に依る着生球数の増加. 農及園. 30:859-860.
70. 岩木満朗・小室康雄. 1969. 内田カノユリのえそ斑症状株から分離されるウイルスについて. 関東東山病害虫研究会年報. 16:66.
71. 兼松誠司・夏秋知英・日比忠明. 1990. 非放射性プローブによる植物病害の遺伝子診断法. 植物防疫 44:549-555.
72. KASSANIS, B. 1957. The multiplication of tobacco mosaic virus in cultures of tumorous tobacco tissues. Virology 4:5-13.
73. 榎木博昭・高橋越子・中尾一夫・乾 全良. 1986. ニオイテンジクアオイ不定芽組織のジャーファーメンター培養. 農化雑. 60: 15-17.
74. 加藤 陽. 1982. タバコ細胞の工業培養生産に関する研究. 醱酵工学 60:105-118.
75. 加藤 要. 1949. ユリ球根の輸出をはばむアメリカのクロフト・リリー. 農耕園. 4:6.
76. 加藤 要. 1950. 輸出ユリ根の不振. 農耕園. 5:12.
77. KATO, Y. 1974. Bud formation on excised Heloniopsis leaf fragments: Effects of leaf age and the midrib. Plant Cell Physiol. 15:363-372.
78. KATO, Y. 1978. Induction of adventitious buds on undetached leaves, excised leaves and leaf fragments of Heloniopsis orientalis. Physiol. Plant. 42:39-44.
79. KAUL, K. and P. S. SABHARWAL. 1972. Morphogenetic studies on Haworthia: Establishment of tissue culture and control of differentiation. Amer. J. Bot. 59:377-385.
80. KAUL, K. and P. S. SABHARWAL. 1975. Morphogenetic studies on Haworthia: Effects of inositol on growth and differentiation. Amer. J. Bot. 62:655-659.
81. 川田穰一・阿部定男. 1966. テッポウユリにおけるキュウリモザイクウイルスの保毒率とその諸性質について. 園試報. A5:193-206.
82. 木曾 皓・手塚信男. 1977. ユリウイルスの分類及び同定に関する研究. 野菜試験場久留米支場研究年報. 昭51: 98-109.
83. KITTO, S. L., J. JANICK. 1985. Production of synthetic seeds by encapsulating asexual embryos of carrot. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 110:277-282.
84. KITTO, S. L., J. JANICK. 1985. Hardening treatments increase survival of synthetically-coated asexual embryos of carrot. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 110:283-286.



85. 小西国義・上田尚志. 1976. テッポウユリの低温処理程度と促成温度. 園学要旨. 昭51秋 : 430.
86. 小西国義. 1982. 植物の生長と発育. p.184-202. 養賢堂. 東京.
87. 小室康雄. 1966. ユリのウイルス病. 新花卉 51: 49-52.
88. 古在豊樹・岩波好恵・富士原和宏. 1987. 炭酸ガス施用が増殖培養時におけるスターチス (*Limonium Hybrid*) の小植物体の生長に及ぼす影響. 植物組織培養 4: 22-26.
89. KOZAI, T. and Y. IWANAMI. 1988. Effects of CO<sub>2</sub> enrichment and sucrose concentration under high photon fluxes on plantlet growth of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) in tissue culture during the preparation stage. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 57: 279-288.
90. 協和醗酵工業株式会社. 1986. 植物組織培養による球根類の増殖法. 公開特許公報 (A). 昭61-56022 : 121-126.
91. 九州農業試験場園芸部編. 1958. III. 花卉. 1. 球根. 九州・山口の園芸 : 7-8 .
92. LAMPORT, D. T. A. 1964. Cell suspension cultures of higher plants: Isolation and growth energetics. Exp. Cell Res. 33:195-206.
93. LIU, L. and D. W. BURGER. 1986. In vitro propagation of Easter lily from pedicels. HortScience 21:1437-1438.
94. LYONS, A. R. and T. C. ALLEN, JR. 1969. Electron microscopy of viruslike particles associated with necrotic fleck of *Lilium longiflorum*. J. Ultrastructure Research 27:198-204.
95. 松田岑夫・石上 清・大谷徳生. 1992. 用土及び施肥条件がササユリの養成球の肥大に及ぼす影響. 園学雑. 61 (別1) : 659.
96. 松川時晴・吉田博美・中村新一・吉田徹生. 1977. テッポウユリの二度切り栽培に関する研究 (予報) 球根露出およびGA処理が発芽促進に及ぼす影響. 園学要旨. 昭52秋:336-337.
97. 松川時晴. 1977. テッポウユリの開花調節. 農耕園. 32 (6) :138-142.
98. 松尾英輔・岩屋真理. 1974. テッポウユリ仔球の出葉に及ぼす光・温度の影響. 園学要旨. 昭49秋:334-335.
99. 松尾英輔・野中 淳・有隅健一. 1978. テッポウユリ仔球の出葉に関する研究 1. 出葉の早晚、親りん片の生死に及ぼす2、3の要因について. 園学雑. 46:515-520.
100. 松尾英輔・有隅健一・川島 浩. 1981. テッポウユリの親りん片ならびに新しい植物体の生育反応に及ぼすりん片植え付けの深さ及び施肥の影響. 園学雑. 50:342-349.

101. MATSUO, E. and J. M. VAN TUYL. 1984. Effect of bulb storage temperature on leaf emergence and plant development during scale propagation of Lilium longiflorum 'White American'. *Scientia Hortic.* 24:59-66.
102. 松尾英輔・J.M. ファンタイル. 1987. テッポウユリりん片の着生部位がりん片繁殖球根の生産に及ぼす影響 *園学雑.* 56:202-207.
103. MELLOR, F. C. and R. STACE-SMITH. 1969. Development of excised potato buds in nutrient culture. *Can. J. Bot.* 47:1617-1621.
104. 三井石油化学工業株式会社. 1987. 植物組織の培養切片作成方法. 特願昭 62-311196号
105. 宮本芳城・藤田政良・藤岡唯志. 1991. スターチスの通気性フィルター利用による培養器内発根同時順化法. *園学雑.* 60 (別1):434-435.
106. 水口茂・大川勝徳・池川哲郎. 1994. ササユリの母りん片由来白色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.* 63:131-137.
107. MOHANTY, B. and J. S. FLETCHER. 1978. Influence of ammonium on the growth and development of suspension cultures of Paul's scarlet rose. *Physiol. Plant.* 42:221-225.
108. MONTEZUMA-DE-CARVALHO, J. and M. L. GUIMARAES. 1974. Production of buds and plantlets from the stamen's filament of Lilium regale cultivated in vitro. *Biol. Plant.* 16:472-473.
109. MOREL, G. M. and C. MARTIN. 1952. Guerison de Dahlias atteints d'une maladie a virus. *C. R. Acad. Sci. Paris* 235:1324-1325.
110. MOREL, G. M. 1960. Producing virus-free cymbidiums. *Amer. Orch. Soc. Bull.* 29:495-500.
111. MOLGAARD, J. P., N. ROULUND, V. DEICHMANN, L. IRGENS-MOLLER, S. B. ANDERSON and B. FARESTVEIT. 1991. In vitro multiplication of Saintpaulia ionantha Wendl. by homogenization of tissue cultures. *Scientia Hortic.* 48:285-292.
112. 森 寛一・浜屋悦次・下村 徹・池上雍春. 1969. 組織培養法によるウイルス罹病植物の無毒化. *農事試験場研究報告* 13: 45-110.
113. 森田 儔. 1978. 茎頂組織培養株の効果. 加古舜治編. *園芸植物の器官と組織の培養.* p.106-111. 誠文堂新光社. 東京.
114. MOWAT, W. P. and J. A. T. WOODFORD. 1976. Control of the spread of two non-persistent

- aphid-borne viruses in lilies. Acta Hortic. 59:27-28.
115. MURASHIGE, T. and F. SKOOG. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-497.
116. MURASHIGE, T., M. N. SHABDE, P. M. HASEGAWA, F. H. TAKATORI and J. B. JONES. 1972. Propagation of asparagus through shoot apex culture. I. Nutrient medium for formation of plantlets. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 97:158-161.
117. MURASHIGE, T. 1974. Plant propagation through tissue cultures. Ann. Rev. Plant Physiol. 25:135-166.
118. MURASHIGE, T., M. SERPA and J. B. JONES. 1974. Clonal multiplication of Gerbera through tissue culture. HortScience 9:175-180.
119. 明道 博・久保 貞. 1952. 鐵砲百合の鱗片繁殖に就いて 主として催芽部の解剖的觀察. 北大農紀要. 1(2):175-180.
120. 長岡正昭・安井秀夫・木下達之. 1987. 組織培養の簡易・装置化に関する研究 (第3報) 装置の滅菌. 園学要旨. 昭62秋 :270-271.
121. 長岡正昭・安井秀夫・茂田潤一. 1987. 組織培養の簡易・装置化に関する研究 (第4報) 湿度制御によるニンジンの順化. 園学要旨. 昭62秋 :272-273.
122. 長岡正昭・安井秀夫. 1987. 組織培養の簡易・装置化に関する研究 (第5報) 多芽体の養成と発根・順化 (予報). 園学要旨. 昭62秋 :274-275.
123. 長岡正昭・辻 顕光. 1991. バイオナーサリーシステムと関連技術開発の現状と展望. 第1回SHITA シンポジウム講演予稿集 :50-55.
124. 長村智司. 1983. オガクズ隔離培地によるヒメユリの球根養成について. 奈良農試研報. 14:56-65.
125. 中園敦之. 1991. イネバイオ苗大量生産システムの開発. 第1回SHITA シンポジウム講演予稿集 :42-49.
126. 西 貞夫・大沢勝次・豊田 努. 1972. やく培養の利用に関する研究 (第6報) 各種そ菜やくカルスからの幼植物の分化について (その2). 園学要旨. 昭47春 :190-191.
127. 西沢正洋・西 泰道. 1966. 組織培養法によるウイルス罹病ユリの無毒化に関する研究. 九州農業試験場彙報. 12:139-157.
128. 新美芳二・小野沢剛. 1977. ヒメサユリ (*Lilium rubellum* BAKER) の栄養繁殖に関する研究 (第1報) リン片培養とリン片さしによる球形成. 園学要旨. 昭52秋 :348-349.

129. NIIMI, Y. and T. ONOZAWA. 1979. In vitro bulblet formation from leaf segments of lilies, especially *Lilium rubellum* Baker. *Scientia Hortic.* 11:379-389.
130. 新美芳二・渡辺宏和. 1982. 組織培養によるヒメサユリ (*Lilium rubellum* BAKER) の繁殖、特に茎切片の子球形成について. *園学雑.* 51:344-349.
131. 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<sub>3</sub> 処理の効果. *園学雑.* 57:250-257.
132. 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.* 59(別1):614-615.
133. 新美芳二・斉藤 勲. 1990. 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. *園学雑.* 59:635-640.
134. 新美芳二・権平 正・轡田圭孝・辻 ひろ. 1991. ユリのウイルスフリー球根生産に関する研究 第1報 DIBA法によるユリウイルス(LSV, LBV, CMV) の検出. *園学雑.* 60(別2):556-557.
135. 新美芳二. 1993. ササユリの成球生産に関する研究 (第2報) 試験管内で増殖した子球のほ場への移植. *園学雑.* 62(別2):512-513.
136. NOVAK, F. J. and E. PETRU. 1981. Tissue culture propagation of *Lilium* hybrids. *Scientia Hortic.* 14:191-199.
137. 野添博昭. 1990. テッポウユリ ウイルスフリー球根の生産. *バイオホルティ* 3:90-92.
138. 大川清. 1969. アカカノユリの生育経過とこれに伴う養分吸収量の推移について. *神奈川園研報.* 17:74-82.
139. OHKAWA, K. 1979. Effects of giberellins and benzyladenine on dormancy and flowering of *Lilium speciosum*. *Scientia Hortic.* 10:255-260.
140. 大川 清. 1985. ユリの栽培と消費の動向. 塚本洋太郎監修. *朝日園芸百科球根編II.* p.153-155. 朝日新聞社. 東京.
141. 大川清・高山真策. 1985. ヤマユリの組織培養による急速増殖. *農及園.* 60:182-186.
142. OKAZAWA, Y., N. KATSURA and T. TAGAWA. 1967. Effects of auxin and kinetin on the development and differentiation of potato tissue cultured *in vitro*. *Physiol. Plant.* 20:862-869.
143. 奥野哲郎. 1992. キュウリモザイクウイルス遺伝子によるウイルス抵抗性植物の育種とウイルス抵抗性機構. *植物細胞工学* 4:85-91.

144. PENNAZIO, S., A. APPIANO, M. VECCHIATI and G. D'AGOSTINO. 1976. Thiamine requirement of potato meristem tips cultured in vitro. *Physiol. Veg.* 14:121-131.
145. PILLAI, S. K. and A. C. HILDEBRANDT. 1969. Induced differentiation of geranium plants from undifferentiated callus in vitro. *Amer. J. Bot.* 56:52-58.
146. PRICE, W. C. 1937. Classification of lily mosaic virus. *Phytopathology* 27:561-569.
147. PRIYADARSHI, S. and S. SEN. 1992. A revised scheme for mass propagation of Easter lily. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 30:193-197.
148. RAGHAVAN, J., and J. G. TORREY. 1964. Inorganic nitrogen of the seedlings of the orchid, *Cattleya*. *Amer. J. Bot.* 51:264-274.
149. REDENBAUGH, K., P. VISS, D. SLADE and J. A. FUJII. 1987. Scale-up : Artificial seeds. *Plant Tissue and Cell Culture* p.473-493. Alan R. Liss, Inc.
150. REINERT, J., M. TAZAWA and S. SEMENOFF. 1967. Nitrogen compounds as factors of embryogenesis in vitro. *Nature* 216:1215-1216.
151. REINERT, J. and D. BACKS. 1968. Control of totipotency in plant cells growing in vitro. *Nature* 220 :1340-1341.
152. REINERT, R. A. 1966. Virus activity and growth of infected and healthy callus tissues of *Nicotiana tabacum* grown in vitro. *Phytopathology* 56:731-733.
153. 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.
154. ROBB, S. M. 1957. The culture of excised tissue from bulb scales of Lilium speciosum THUNB. *J. Exp. Bot.* 8:348-352.
155. ROBERTS, A. N., L. T. BLANEY and O. C. COMPTON. 1964. Seasonal changes of certain nutrients elements in the leaves and bulbs of Croft lily, Lilium longiflorum, and their relation to bulb yield. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 85:611-630.
156. ROBERTS, A. N., Y. T. WANG and F. W. MOELLER. 1983. Effects of pre- and post-bloom temperature regimes on development of Lilium longiflorum Thunb. *Scientia Hort.* 18: 363-379.
157. ROH, S. M. 1982. Propagation of Lilium longiflorum Thunb. by leaf cuttings. *HortScience* 17:607-609.

158. 佐川正典. 1990. '宮内イヨカン' 優良弱毒ウイルス苗木の育成. バイオホルティ 3:109-112.
159. 佐川正典. 1990. '宮内イヨカン' 弱毒ウイルス保毒樹の干渉効果. バイオホルティ 3 : 113-114.
160. SAGAWA, Y. and J. T. KUNISAKI. 1990. Micropropagation of floriculture crops. p.25-56. In : Ammirato, P. V., D. R. Evans, W. R. Sharp and Y. P. S. Bajaj (eds.). Handbook of plant cell culture, Vol.5. Macmillan, New York.
161. 佐野輝男・四方英四郎. 1985. ブドウから検出されるウイロイド. 植物防疫 39:361-364.
162. 佐野輝男. 1990. PCR による植物病害の遺伝子診断法. 植物防疫 44:557-556.
163. 坂本 浩・永井輝行. 1993. シンテッポウユリ組織培養球の栽培. 園学雑. 61(別2) :58-59.
164. 沢 完・別府恵美子・門田寅太郎. 1972. ユリの挿し木繁殖に関する研究 (第1報) テッポウユリの茎挿しについて. 園学要旨. 昭47春 :322-323.
165. SCHENK, R. U. and A. C. HILDEBRANDT. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. Can. J. Bot. 50:199-204.
166. 関谷治男. 1979. ヒメサユリの実生未出葉小球の出葉に及ぼすage と光の影響. 園学要旨. 昭54春 :288-289.
167. 関谷治男. 1980. オニユリ珠芽の発芽に及ぼす温度と光について. 園学要旨. 昭55春 :374-375.
168. 仙頭照康. 1971. 四国地方におけるササユリに関する研究 (第1報) 自生状況について. 愛媛大学農学部農場報告 2:25-29.
169. 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.
170. SHERIDAN, W. F. 1968. Tissue culture of the monocot Lilium. Planta 82:189-192.
171. SHERIDAN, W. F. 1974. Long term callus cultures of Lilium : Relative stability of the karyotype. J. Cell Biol. 63:313a.
172. 清水隆夫・塚本洋太郎. 1975. テッポウユリ球根中の抑制物質について (第2報) 中性の抑制物質. 園学要旨. 昭和50春 :268-269.

173. 清水基夫. 1952. 輸出百合の将来. 園芸新知識 7(9):10-11.
174. 清水基夫. 1971. 日本のユリ. 誠文堂新光社. 東京.
175. 清水基夫編著. 1987. 日本のユリ. 誠文堂新光社. 東京.
176. SHOYAMA, Y., N. HASEGAWA and I. NISHIOKA. 1987. In vitro propagation of Lilium japonicum by culture of bulblet. 生薬学雑誌 41:352-355.
177. 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 Hortic. 5:77-83.
178. SIMMONDS, J. A. and B. G. CUMMING. 1976. Propagation of Lilium hybrids. II. Production of plantlets from bulb-scale callus cultures for increased propagation rates. Scientia Hortic. 5:161-170.
179. 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.
180. STIMART, D. P., P. D. ASCHER and J. S. ZAGORSKI. 1980. Plants from callus of the interspecific hybrid Lilium 'Black Beauty'. HortScience 15:313-315.
181. STIMART, D. P. and P. D. ASCHER. 1981. Foliar emergence from bulblets of Lilium longiflorum THUNB. as related to in vitro generation temperatures. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 106:446-450.
182. STIMART, D. P. and P. D. ASCHER. 1981. Developmental responses of Lilium longiflorum bulblets to constant or alternating temperatures in vitro. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 106:450-454.
183. STIMART, D. P., P. D. ASCHER and H. F. WILKINS. 1982. Overcoming dormancy in Lilium longiflorum bulblets produced in tissue culture. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 107:1004-1007.
184. STIMART, D. P., P. D. ASCHER and H. F. WILKINS. 1983. Axis elongation from tissue-culture-generated bulblets of Lilium longiflorum Thunb. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 108:99-101.
185. STONE, O. M. 1973. The elimination of viruses from Narcissus tazetta cv. Grand Soleil d'Or, and rapid multiplication of virus-free clones. Ann. appl. Biol. 73:45-52

186. STONE, O. M., A. A. BRUNT and M. HOLLINGS. 1977. The production, propagation and distribution of virus-free clones of *Narcissus tazetta* cv. 'Grand Soleil d'Or'. *Acta Hortic.* 47:77-81.
187. 鈴木基夫. 1974. ユリ類の開花調節に関する研究 I. スカシユリ及びその交雑品種における開花調節. *野菜試報.* A1:185-215.
188. 鈴木基夫. 1975. ユリ類の開花調節に関する研究 II. テッポウユリの開花調節. *野菜試報.* A2:65-112.
189. SYONO, K. 1965. Changes in organ forming capacity of carrot root calluses during subcultures. *Plant Cell Physiol.* 6:403-419.
190. SYONO, K. and T. FURUYA. 1968. Studies on plant tissue cultures I. Relationship between inocula sizes and growth of calluses in liquid culture. *Plant Cell Physiol.* 9:103-114.
191. SYONO, K. and T. FURUYA. 1972. Abnormal flower formation of tobacco plants regenerated from callus cultures. *Bot. Mag. Tokyo* 85:273-284.
192. 高橋 滋. 1993. バイオリアクタ利用における環境調節とその効果. シンポジウム「植物組織培養における環境調節とその効果」講演要旨集 :8-13.
193. 高津 勇. 1978. グラジオラスの生長点培養の実際とウイルスフリー化. *農及園.* 53:797-800.
194. 高山真策・三沢正愛. 1978. 組織培養によるユリの繁殖に関する研究 (第2報) 子球の分化・肥大に影響する2, 3の問題点について. *園学要旨.* 昭和53春:346-347.
195. TAKAYAMA, S. and M. MISAWA. 1982. A scheme for mass propagation of *Lilium* in vitro. *Scientia Hortic.* 18:353-362.
196. 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.
197. TAKAYAMA, S., M. MISAWA, Y. TAKASHIGE, H. TSUMORI and K. OHKAWA. 1982. Cultivation of *in vitro*-propagated *Lilium* bulbs in soil. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 107:830-834.
198. 高山真策・元川寛子・天羽孝子・深野真弓・大澤勝次. 1985. ジャーファーマンターによるイチゴの大量増殖に関する研究 (第2報) 液体培養法の検討ならびにジャーファーマンターによる大量増殖法の確立. *園学要旨.* 昭60秋 :220-221.
199. 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作用について. 園学要旨. 昭61秋 :336-337.
200. 高山真策・天羽孝子・深野真弓・中沢久美子・秋田 求. 1987. 液体培養法によるグラジオラスの繁殖に関する研究. 第10回植物組織培養シンポジウム 講演要旨. : 88.
201. TAKAYAMA, S. and N. TAKIZAWA. 1994. Efficient mass propagation of *Lilium longiflorum* bulblets through shake and bioreactor-culture techniques. Abstr. 24th Intl. Hort. Cong. :122.
202. TAKAYAMA, T., T. TOYOMASU, H. YAMANE, N. MUROFUSHI and H. YAJIMA. 1993. Identification of gibberellins and abscisic acid in bulbs of *Lilium elegans* Thunb. and their quantitative changes during cold treatment and the subsequent cultivation. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 62:189-196.
203. 竹田 義. 1987. ユリの生産安定技術の確立 1. ササユリの栽培技術確立 (1) 球根重量と生育、開花. 京都府山城園芸研究所 昭62園試成績書 :133-134.
204. 竹田 義. 1987. ユリの生産安定技術の確立 1. ササユリの栽培技術確立 (2) 実生の球根肥大性. 京都府山城園芸研究所 昭62園試成績書 :135-136.
205. 竹田 義・高橋克征. 1988. ユリの生産安定技術の確立 1. りん片挿しによるササユリの繁殖. 京都府山城園芸研究所 昭63園試成績書 :129-130.
206. 武田泰明. 1974. 茎頂培養によるカーネーション無病苗の育成と実用化に関する研究. 滋賀県農業試験場特別報告第11号.
207. 田中道男・高橋恭一・五井正憲・東浦忠司. 1990. フッ素樹脂フィルムの植物組織培養への応用 (第7報) 'Culture Pack'・ロックウールシステムによる洋ランの新しい種苗生産法. 園学雑. 59(別1):566-567.
208. 田中道男・長江嗣朗・深井誠一・五井正憲・東浦忠司・村崎公明. 1990. フッ素樹脂フィルムの植物組織培養への応用 (第8報) ガーベラの種苗生産における 'Culture Pack'・ロックウールシステムの利用. 園学雑. 59(別2):660-661.
209. 田中道男・長江嗣朗・深井誠一・五井正憲. 1991. フッ素樹脂フィルムの植物組織培養への応用 (第10報) CO<sub>2</sub> 施用下の無糖 'Culture Pack'・ロックウールシステムにおけるスパティフィラム培養苗の生育. 園学雑. 60(別2):522-523.
210. 田中道男・竹邊丞市・深井誠一・五井正憲・村崎公明・岡部健. 1992. フッ素樹脂フィルムの植物組織培養への応用 (第14報) 'Culture Bag' を用いたテッポウユリのりん片培養による子球生産. 園学雑. 61(別2):38-39.

211. 谷本秀夫・大林克幸・坂上和隆・嘉儀 隆. 1990. 植物組織培養における各種支持体の影響. 園学雑. 59(別2):676-677.
212. 谷本秀夫・嘉儀 隆. 1991. 植物組織培養における各種支持体の影響 (第2報) 培地成分の分析. 園学雑. 60(別1):426-427.
213. THOMAS, E. and H. E. STREET. 1970. Organogenesis in cell suspension cultures of Atropa belladonna L. and Atropa belladonna cultivar lutea Doll. Ann. Bot. 34:657-669.
214. TORREY, J. G. 1967. Morphogenesis in relation to chromosomal constitution in long-term plant tissue cultures. Physiol. Plant. 20:265-275.
215. 辻 顕光・長岡正昭. 1990. 培養環境の自動制御システムの開発. 園学雑. 59(別2):346-347.
216. 辻 顕光・小田雅行・長岡正昭. 1991. ニンジン培養中のMS培地の組成変化と生育の関係. 園学雑. 60(別2):248-249.
217. 塚本洋太郎・鈴木基夫. 1957. 花卉の肥料に関する研究 (第2報) テッポウユリの肥料について. 園芸学研究集録 第8集 :151-156.
218. TSUKAMOTO, Y. 1971. Changes of endogenous growth substances in Easter lily as effected by cooling. Acta Hortic. 23:75-81.
219. 上野敬一郎・深瀬正雄. 1959. 赤カノユリの生育と施肥に関する試験 (第1報). 神奈川園研報. 7:63-68.
220. 歌田明子・鈴木基夫・阿部定夫. 1973. ユリの繁殖に関する研究 I. カノユリのりん片繁殖に関する研究. 園試報. A12:113-134.
221. VAN AARTRIJK, J. and G. J. BLOM-BARNHOORN. 1979. Some influences of  $\alpha$ -naphthylacetic acid on the differentiation of meristems of Lilium speciosum 'Ruburm' Nr.10 in vitro. Acta Hortic. 91:269-279.
222. VAN AARTRIJK, J. and G. J. BLOM-BARNHOORN. 1981. Growth regulator requirements for adventitious regeneration from Lilium bulb-scale tissue in vitro, in relation to duration of bulb storage and cultivar. Scientia Hortic. 14:261-268.
223. VAN AARTRIJK, J. and G. J. BLOM-BARNHOORN. 1983. Adventitious bud formation from bulb-scale explants of Lilium speciosum Thunb. in vitro. Effects of wounding, TIBA, and temperature. Z. Pflanzenphysiol. 110:335-363.

224. VAN AARTRIJK, J., G. J. BLOM-BARNHOORN and P. C. G. VAN DER LINDE. 1990. Lilies. p.535-576.  
In : Ammirato, P. V., D. R. Evans, W. R. Sharp and Y. P. S. Bajaj (eds.). Handbook of plant cell culture, Vol. 5. Macmillan, New York.
225. VAN SLOGTEREN, D. H. M., J. C. M. BEIJERSBERGEN, M. H. BUNT and C. Th. C. VAN DER HULST. 1980. Detection of lily symptomless virus in leaves and bulb scales of lily plants with the immunodiffusion drop test and with ELISA. Acta Hortic. 110:91-98.
226. VARDI, A. and D. RAVEH. 1976. Cross-feeder experiments between tobacco and orange protoplasts. Z. Pflanzenphysiol. 78:350-359.
227. WANG, Y. T. and A. N. ROBERTS. 1983. Influence of air and soil temperatures on the growth and development of *Lilium longiflorum* Thunb. during different growth phases. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 108:810-815.
228. 渡辺雄一郎. 1992 タバコモザイクウイルスから植物を守る分子生物学的アプローチ——トランスジェニック植物と弱毒ウイルスの応用—— 植物細胞工学 4:77-84.
229. WEILER, T. C. and R. W. LANGHANS. 1968. Determination of vernalizing temperature in the vernalization requirement of *Lilium longiflorum* (Thunb.) cv 'Ace'. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 93:623-629.
230. WHITE, P. R. 1943. A handbook of plant tissue culture. Ronald Press, New York.
231. WILBUR, F. H. and J. L. RIOPEL. 1971. The role of cell interaction in the growth and differentiation of *Pelargonium hortorum* cells in vitro. II. Cell interaction and differentiation. Bot. Gaz. 132:193-202.
232. 八鍬利郎・原田 隆・武藤 浩. 1973. 園芸植物のウイルス・フリー株育成に関する研究 (第1報) 食用ユリの茎頂培養における生長調節物質の影響. 園学要旨. 昭48秋 :158-159.
233. 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.
234. 梁川 正・前口良太郎・尾崎武司. 1992. テッポウユリのりん片及び茎切片の組織培養によるウイルスの無毒化. 園学雑. 61(別2):498-499.
235. 矢澤 進・浅平 端. 1970. 葉えき切片の *in vitro* culture による形態形成の研究 (第1報) テッポウユリ茎の伸長に及ぼすサイトカイニンの影響. 園学要旨. 昭45春 :280-281.
236. 矢澤 進・浅平 端. 1971. テッポウユリ茎の伸長に及ぼす cytokinin の影響. 園学

要旨. 昭46秋 :272-273.

237. 矢澤 進. 1978. サイトカイニンおよびオーキシンがテッポウユリ・ダリアの出葉形態に及ぼす影響. 京都府大学報・農学. 30:22-25.
238. 山口 昭. 1964. ユリ属植物からチュウリップに breaking を起こすウイルスの検出. 日植病報. 29:252-254.
239. YONEDA, Y. 1969. Organ formation in cultured leaf blades of Crepis capillaris. Bot. Mag. Tokyo 82:204-209.
240. 吉田徹生・東 昭. 1971. ユリのりんべん繁殖に関する研究 (第5報) 各発育期における NAA およびGA処理の影響. 農及園. 46:671-672.
241. 朱 玉・矢澤 進・浅平 端. 1992. カラジウムの不定芽原基集塊のホモジナイザー破砕片からの植物体の再生. 植物組織培養 9:190-195.

Studies on the Development of a Practical Mass-Production System of  
Horticulturally Desirable Lily Bulbs  
with a Simplified In Vitro Culture Technique

WAICHIRO KAWARABAYASHI

Summary

This study was carried out to establish a practical mass-production system of virus-free lilies, which have good horticultural characteristics, through the application of a simplified tissue culture technique.

Firstly, in chapter I of this study, the effects of different media and cultural conditions on plantlet regeneration from shoot tips were investigated mainly with L. longiflorum and the diagnosis of virus in some plants derived from shoot-tip culture was performed under electron microscopy and by leaf sap inoculation to L. formosanum seedling. The following results were obtained.

1. Murashige and Skoog's macro-elements (1962) which have high nutrient concentration, especially nitrogen and potassium, promoted plantlet regeneration, the growth of roots and shoots, and the formation of scaly leaves. Whether the medium contains Ringe and Nitch (RN)'s organic addenda (1967) or not, the growth of plantlets regenerated from shoot tips was good.
2. It was found that a sucrose concentration of  $40 \text{ g}\cdot\text{liter}^{-1}$ , an agar concentration of  $8 \text{ g}\cdot\text{liter}^{-1}$  and pH of 5.7 in the medium were suitable for the growth of regenerated plantlets.
3. Bulblet formation were generally enhanced by addition of  $0.1 \text{ mg}\cdot\text{liter}^{-1}$  NAA to the medium. A supplement of  $0.1 \sim 1.0 \text{ mg}\cdot\text{liter}^{-1}$  BA or  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{liter}^{-1}$  kinetin induced 'multiple adventitious bud' formation from shoot tips in species such as L. speciosum and L. auratum. When a 'multiple adventitious bud' was cut into several pieces and the obtained segments were subcultured, they differentiated to new 'multiple adventitious bud' on the medium supplemented with an combination of  $0.1 \sim 1.0 \text{ mg}\cdot\text{liter}^{-1}$  BA with  $0.1 \text{ mg}\cdot\text{liter}^{-1}$  NAA. On the other hand, they grew and developed many bulblets on the medium containing  $0.1 \text{ mg}\cdot\text{liter}^{-1}$

NAA alone. In the case of lilies such as 'Kiyotubeni' and 'Ubatama', the addition of NAA to the medium improved the survival rate of shoot tips cultured in vitro and promoted bulblet differentiation from them but not the growth of the bulblets.

4. The optimum temperature for shoot growth was between 23 and 28°C. Leaf emergence from shoots was promoted by a lower temperature of 23~24°C, but was inhibited by a higher temperature of 27 ~28°C. The higher temperature, however, promoted enlargement of scaly leaves and bulblet formation.

5. Lighting for more than 18 hours per day promoted the growth of shoots and bulblets. Low light intensity of 1,500~4,000 lx was enough for the growth of shoots and bulblets and high light intensity such as 13,000 lx in early stage of shoot-tip culture rather inhibited their growth. In lighted environment, leaf emergence was enhanced. On the other hand, continuous darkness suppressed leaf emergence but promoted the development of scaly leaves.

6. The inverted placement (apex down) of shoot tips to the medium induced callus formation and vigorous growth of callus.

7. In diagnosis of virus, observation of leaf sap sample by electron microscope and leaf sap inoculation to L. formosanum seedling suggested that plantlets derived from shoot-tip culture of L. longiflorum were free from virus and these technique could be applicable to an early growth stage of plantlets.

In chapter II, in vitro cultural conditions were studied mainly with L. longiflorum and L. speciosum for promoting differentiation and growth of bulblets from segments of various parts of plantlets regenerated through shoot-tip culture. The growth and flowering of in vitro bulblets, produced by an agar culture of bulblets derived from shoot tips, was also investigated by cultivation in pots. The results were as follows.

1. The differentiation and growth of bulblets from various tissue segments was enhanced with addition of auxins, especially 0.1 mg·liter<sup>-1</sup> NAA, to the medium. Addition of cytokinin to the medium tends to promote the differentiation of adventitious buds (formation of 'multiple adventitious bud'), but retarded their development to bulblets.

2. Cutting bulblet scales into segments led to increase of total number of differentiated bulblets per scale, because many small bulblets differentiated from the enlarged cut edge

of each segments.

3. The differentiation and growth of bulblets from a scale was observed at relatively wide range of incubation temperature not higher than 30°C. Higher temperature (27~28°C) and high sucrose concentration in the medium (60~120 g·liter<sup>-1</sup>) inhibited leaf emergence and its elongation from bulblets but promoted the growth of bulblets and increased their weight.

4. Although bulblet differentiation was observed in both of leaf- and stem node-segments obtained from in vitro plantlets, in vitro bulblet scales were the most suitable materials for in vitro propagation of lilies because of their high propagation rate of bulblets and their simplicity of culture process.

5. In cultivation of in vitro bulblets of L. longiflorum, leaves emerged quickly and the axes elongated without cold treatment and flowering was observed within one year after transplanting to soil in pots. Bulbs harvested after the first cultivation in pots were of marketable size for cut flower production. In the case of cultivation of in vitro bulblets of L. speciosum, low temperature was necessary for leaf emergence. Their bulblets chilled at 10 °C for 45 days had accelerated axis-elongation(bolting) and reduced days to flowering. In vitro bulblets of L. ×formolongi and L. concolor could flower within one year after transplanting to soil in pots, too. Lilies like these two species, having some advantages such as cut flower production by using small bulbs and/or some problems such as a lack of characteristic uniformity because of cultivation of seedlings, were considered to be promising targets for practical production of bulblets through in vitro culture.

6. These results suggested a possibility that a large number of virus-free and horticulturally desirable lily clones can be produced in a short period by subculturing bulb scales of in vitro bulblets derived from shoot-tip agar culture, and by cultivating in vitro bulblets obtained from the scale-segment agar culture.

Lastly in chapter III of this study, on the basis of the above results obtained from an agar culture of scale segments, the effects of culture conditions on differentiation and growth of bulblets were investigated in a liquid culture of scale- or bulblet-segments of L. japonicum. Based on the obtained results, a practical in vitro bulblet propagation system was designed using a simplified culture box. Bulblets of L. japonicum, which were mass-produced

in the above simplified in vitro system, were transplanted into pots and their growth and flowering was investigated. The results were as follows.

1. Four cultural methods for simplifying the culture process to enlarge the current in vitro system; (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. From the data of 8 weeks in an aerated liquid culture, it was found that medium with 3/4 strength of MS macro-elements and  $40\text{g}\cdot\text{liter}^{-1}$  sucrose was optimum for differentiation and growth of bulblets from scale segments.

3 Addition of NAA to the medium in an aerated liquid culture promoted bulblet differentiation. Compared with bulblets in the medium that contained  $0.1\text{ mg}\cdot\text{liter}^{-1}$  NAA, the ones in the medium that contained  $0.01\text{ mg}\cdot\text{liter}^{-1}$  NAA had smaller number of roots. These bulblets with smaller number of roots occupied less culture space and also were easy to be taken out of the culture box, subcultured and transplanted into pots. Although addition of kinetin or ABA to the medium did not promote bulblet differentiation in culture of scale segments of L. japonicum, it was supposed that the effects of these growth regulators would vary with the species.

4 Bulblets differentiated efficiently when a liquid medium was aerated with ambient air ( $20.9\% \text{O}_2$ ), whereas higher oxygen concentration in aeration gas was ineffective in enhancing more differentiation and growth of bulblets. In the same way as in agar culture of other lilies such as L. longiflorum, higher temperature ( $28\text{ }^\circ\text{C}$ ) and lighted environment promoted leaf emergence from bulblets in an aerated liquid culture.

5. The agar culture period of scales required to obtain a maximum number of bulblets in the following aerated liquid culture appeared to be about 3 months. When the culture period extended beyond 3 months, the number of bulblets tended to decrease. Basal segments of scales produced more bulblets at a faster rate than did apical segments.

6. Bulblet differentiation was observed after 3 weeks of culturing. The number of bulblets increased significantly 5 to 8 weeks after culture initiation but not thereafter. Clear increase in diameter of bulblets was not observed after the 5 weeks of culturing. In examination of changes of nutrients concentration in the medium during culture, almost all



contents of nutrients including sugar was lost at about 8 ~10 weeks in culturing. Therefore those nutrients should be supplemented to the medium after 8~10 weeks of culturing for subsequent growth of the bulblets.

7. Conditions of medium suited for the growth of differentiated bulblets was investigated using liquid medium with horizontal rotation. By exchanging initial medium for a second one with an appropriate combination of kinetin, ABA and high sucrose concentration, there was a possibility of obtaining the well enlarged bulblets without leaves and roots.

8. Dissecting in vitro bulbs into many small bulb segments increased the total number of differentiated bulblets per cultured bulbs and therefore enhanced the propagation rate of bulblets.

9. Using a polypropylene container as a culture box, bulb segments obtained from 90~100 in vitro bulbs (total fresh weight, 12.8g) were cultured in an aerated liquid medium of 1.5 liters. About 2,000 bulblets, with an average diameter of 4.9 mm, were produced in 16 weeks.

10. To simplify the propagation process, 300 in vitro bulbs (total fresh weight, 60g) were cut with a cutting instrument of several set razor blades spaced about 2 mm apart. A 10-liter container with 5 liters of liquid medium was used. In this simplified in vitro system, about 4,500 bulblets with an average diameter of 5.9 mm were mass-produced in 24 weeks of culturing.

11. The bulblets, which were mass-produced by 5 ~6 months by the simplified aerated liquid culture system, in the dark at 23 °C, exchanging initial medium for a second one with high concentration of sucrose at about 3 months of culturing, appeared to be dormant because they produced no leaves during 16 weeks of cultivation after transplanting into pots.

12. To promote the leaf emergence and growth of the bulblets after transplanting into soil, low temperature or GA<sub>3</sub> immersion treatment was required. Cold-storage of bulblets at 4°C for 8 ~12 weeks was more effective in breaking dormancy than bulblet immersion in 200 mg·liter<sup>-1</sup>GA<sub>3</sub> solution. When the bulblets, of which growth activity was supposed to be raised by these treatments, encountered high temperature in greenhouse in summer, their growth was not inhibited. Bulbs of about 6.3cm circumference were obtained after transplanting in vitro bulblets weighing 200 to 300mg into pots.

13. About 80% of the chilled bulbs with circumferences of 6.0 to 6.4cm, which were planted

into pots in December, flowered in March of the following year. These plants had one flower and attained a height of about 20cm.

14. When bulbs with circumferences of 6.0 to 11.5cm were re-chilled at 4°C for 12 weeks and replanted in mid-October, the flowering period advanced from March to late December and January. On the other hand, non-chilled bulbs that were replanted in mid-October directly after harvest flowered between May and June of the following year and some of the bulbs with circumferences of 10.0 to 11.4cm produced two flowers. Bulbs with circumferences of 7.0cm or more transplanted into soil grew to more than 11.9cm in their circumferences at harvest.

15. Thus, by utilizing the simplified in vitro system to obtain mass-propagated bulblets and subsequently exposing them to low temperature or GA<sub>3</sub> immersion treatment, flowering plants of L. japonicum could be produced in about one year, as the shortest case of cultivation period.

In the results of chapter I~III presented above, a practical mass-production system of virus-free and horticulturally desirable lily bulbs was established from a simplified aerated liquid culture using a polypropylene container and cultivation of the bulblets mass-propagated in this simplified in vitro culture technique.