

ササユリ未熟種子培養における発芽および小球の生育に及ぼす リン酸濃度の影響

稲垣栄洋*・寺田吉徳**・大塚寿夫

静岡県農業試験場 438-0803 静岡県磐田郡豊田町富丘 678-1

Effect of Phosphate Concentrations of Liquid MS Medium on the Germination of Immature Seeds and the Growth of Miniature Bulbs of *Lilium japonicum* Thunb

Hidehiro Inagaki*, Yoshinori Terada** and Hisao Otsuka

Shizuoka Agricultural Experiment Station, Shizuoka 438-0803

Summary

Effects of the concentration of phosphoric acid in the liquid MS medium on the germination of immature seeds and the bulb formation of *Lilium japonicum* Thunb. were investigated.

1. Germination rate of immature seeds increased with the addition of phosphate to the culture medium. Scarification treatment with NaOH or NaClO resulted in a decrease in the bulb formation rate of germinated seeds but in an increase in the germination rate. The addition of phosphate raised the bulb formation rate of germinated seeds.
2. The greatest bulb growth during culture was observed in the light and at the phosphoric acid concentration of 2.5 mM.
3. Emergence rate of bulbs after planting in soil was high when bulbs had been cultured at a phosphoric acid concentration of 3.75mM. Bulbs cultured in the light showed a higher emergence rate than those cultured in the dark. When the phosphoric acid concentration in the medium was 3.75mM, emergence rate of bulbs cultured in the dark increased to almost the same degree as that cultured in the light.
4. Bulb enlargement after planting tended to be promoted when bulbs were cultured in the dark, and the greatest bulb enlargement was observed when the medium contained 3.75mM phosphoric acid.

キーワード 発芽, 未熟種子, リン酸, ササユリ, 出芽

緒 言

ササユリは我が国の中部以西に広く自生する野生ユリである。清楚な印象の淡桃色の花色を有しており、鑑賞価値が高く、園芸利用が期待されているが、播種から開花までに6年程度の長期間を必要とするために営利的な栽培は困難である。

開花までの期間短縮を図るためには、組織培養により短期間に球の肥大を図り、開花球を養成することが重要と考えられ、球の生育促進を図るための培地培養条件について様々な報告が検討されている(河原林, 1993; 春木, 1996a)。培地の無機養分についても改良が検討されており、春木ら(1996b)は培地中のリン酸濃度を高めることで

球根の肥大や定植後の生育が促進されることを明らかにしている。

筆者らは未熟種子を用いた培養系を検討しており、発芽までの期間を短縮し、早期に球形成を誘導できることを明らかにした(稲垣ら, 2002)。本報では、未熟種子培養における培地中へのリン酸添加の影響を検討した結果、すでに報告されている球の肥大や鉢上げ後の生育だけでなく、未熟種子からの発芽誘導や発芽後の球形成、鉢上げ後の出芽率についても、それぞれ効果のあることが明らかとなったので報告する。

材料および方法

1 未熟種子の発芽および小球形成

1997年9月に静岡県森町の自生地より採取した交配3か月後の莢より、無菌状態で未熟種子を摘出し前処理を行った。処理区はMS基本培地のリン酸濃度を標準区(H_2PO_4 1.25 mM)とし、リン酸濃度を2倍にした2倍区

2001年7月31日 受付。2001年12月3日 受理。

本報告の一部は平成13年度春季園芸学会大会において発表した。

* Corresponding author.

** 現在・静岡県静岡工業技術センター

(H_2PO_4 2.50 mM)を設け、さらに前処理方法の違いにより0.5%水酸化ナトリウム20分浸漬、0.5%次亜塩素酸ナトリウム20分浸漬、無処理の3処理区を組み合わせた6処理区とした。

基本培地はMS培地(Murashige・Skoog, 1962)の無機塩組成に、30 g/literのグルコースを添加し、pH 5.8に調整したものをを用いた。300 ml三角フラスコに基本培地250 mlを分注し、1.9 Wエアコンプレッサーにより1600 ml/minで通気を行った。種子は1フラスコ当り20粒とした。培養条件は20℃、3000 lx、16時間照明とした。

2 小球の肥大および鉢上げ後の生育

前述の森町自生地より採取した交配後3か月後の未熟種子をMS培地で液体振とう培養することにより得られた生鮮重0.2~0.3 gの小球を供試した。処理区は培地中への NaH_2PO_4 の添加量によりリン酸濃度を変化させて、MS培地を標準区(H_2PO_4 1.25 mM)とし、リン酸濃度を2倍にした2倍区(H_2PO_4 2.50 mM)、3倍にした3倍区(H_2PO_4 3.75 mM)の3処理区とした。

基本培地はMS培地の無機塩組成に、30 g/literのグルコースを添加し、pH 5.8に調整したものをを用いた。200 ml広口フラスコに基本培地80 mlを分注し、70 rpmで回転振とう培養した。1フラスコ当りの小球数は5球とし、1処理区3フラスコとした。培養条件は20℃暗条件および明条件とし、明条件は3000 lx、16時間照明とした。培養期間は90日とし、30日ごとに継代培養を行った。継代時に培地中のリン酸の残存量を硫酸モリブデン法により、日立製U-2000型ダブルビーム分光光度計で測定した。

さらに、この培養により得られた小球を供試し、5℃で50日間の冷蔵処理の後、10月14日に赤玉土とピートモスを等量混合した培養土を詰めた2.5号鉢に1球ずつ植え付けて、最低温度設定を20℃としたガラス室内に設置し、植え付け後1週間ごとに出土率を調査した。また、球重測定は葉や根を切り落とす必要があるが、球径は球重と高い相関があることが明らかとされていることから(宮本、

1998)、球径を調査項目として鉢植え時と100日後に調査を行った。

結 果

1 未熟種子の発芽および小球形成

置床後120日目の発芽率および球形形成率を第1表に示した。発芽率、球形形成率ともに前処理法、培地による有意な差異が認められ、球形形成率については前処理法と培地との交互作用も認められた。すなわち、標準区、2倍区ともに水酸化ナトリウム、次亜塩素酸ナトリウム浸漬処理により発芽率が高まる傾向が認められた。また、培地間の比較では水酸化ナトリウム浸漬区と無処理区ではリン酸2倍区で発芽率の向上が認められた。球形形成率についても発芽率の結果と同様の傾向が認められ、各前処理法ともに2倍区では標準区と比較して球形形成率が高まる傾向にあった。

他方、標準区では水酸化ナトリウム浸漬、次亜塩素酸ナトリウム浸漬により無処理区と比較して、球形形成率を発芽率で除した発芽個体当たりの球形形成率が低下する傾向が認められた。2倍区では、水酸化ナトリウム浸漬、次亜塩素酸ナトリウム浸漬の両区で球形形成率の向上が認められ、無処理区とほぼ同様の値を示した。

Kollerら(1964)は、発芽を規定する3要素として、最終発芽率P(最終的に何%発芽したか)、発芽開始期S(最終発芽率の1/6に達するまでの時間)、および発芽速度R(P/6から5P/6に達するまでの発芽速度)を示し、さらに藤井ら(1990)はこの3要素を総合した指数として発芽指数I(最終発芽率P×発芽速度R/発芽開始期S)を提案している。そこで、各試験区における発芽曲線についてこの発芽指数を含めた4要素による発芽分析を行った(第2表)。その結果、水酸化ナトリウム浸漬区、無処理区ではリン酸の添加により、発芽開始期が早まり、さらに発芽速度、最終発芽率も高まる傾向にあり、発芽指数が高くなる結果が認められた。次亜塩素酸ナトリウム浸漬区では、リン酸添加により発芽開始期が早まったものの、発芽速度、最終発

第1表 ササユリ未熟種子の発芽と球形形成に及ぼすリン酸濃度と前処理法の影響(培養120日目)

| リン酸濃度 | 前処理方法 | 発芽率 (%) | 球形形成率 (%) | 発芽個体当たり の (%) | 球重 (g) |
|----------|-------|------------|--------------|---------------------|-----------|
| 標準 | 無処理 | 21.3 b | 15.0 b | 70.4 | 0.21 |
| | NaOH | 60.0 a | 22.5 b | 37.5 | 0.26 |
| | NaClO | 63.0 a | 34.0 ab | 54.0 | 0.24 |
| 2倍 | 無処理 | 40.0 b | 28.3 ab | 70.8 | 0.19 |
| | NaOH | 75.0 a | 50.0 a | 66.7 | 0.30 |
| | NaClO | 61.7 a | 37.5 ab | 64.9 | 0.49 |
| 分散分析 | | ** | ** | ns | ns |
| 培地(A) | | ** | ** | ns | ns |
| 前処理方法(B) | | ** | * | ns | ns |
| (A)×(B) | | ns | * | ns | ns |

**は1%, *は5%危険率で有意差あり, nsは有意差なし
異なるアルファベット間にはTukeyの多重検定5%水準で有意差あり

芽率への効果は認められず、むしろMS標準区に比して低い結果となった。

2. 小球の肥大および鉢上げ後の生育

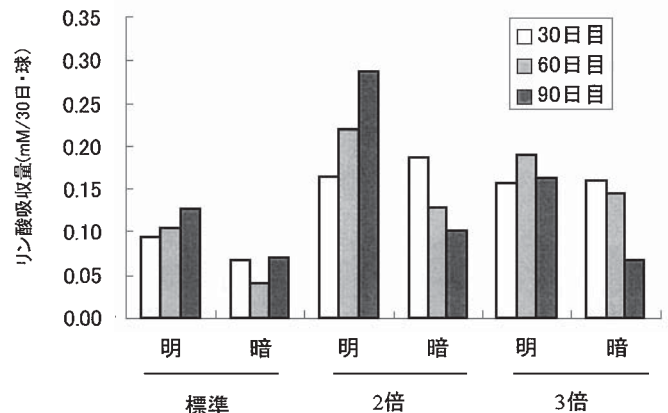
培養90日後の生育調査の結果を第3表に示した。球重、球径はリン酸濃度にかかわらず暗条件と比較して明条件で大きい傾向が認められた。また、リン酸濃度では明条件、暗条件ともに2倍区で大きかったが、3倍区では標準区に比べてやや抑制される傾向にあった。

また、茎葉部の生育も球の生育と同様の傾向が認められ、リン酸濃度では2倍区で大きく、光条件では明条件で大きかった。根部新鮮重は統計的に有意な差異は認められないものの2倍区で大きかった。分球数はリン酸濃度にかかわらず明条件で大きい傾向にあり、3倍区ではやや少なかった。

第1図には各処理区における1球当たりのリン酸吸収量を示した。リン酸吸収量は標準区では明条件、暗条件ともにほぼ一定で推移した。2倍区では明条件下では培養期間が長くなるほど吸収量が増加する傾向が得られたが、暗条件下では逆に培養初期の吸収量が多く、次第に吸収量が減少した。3倍区は明条件では吸収量はほぼ一定であったが、暗条件下では2倍区と同様に培養期間が長くなるにつれて減少した。また、培養中の積算リン酸吸収量と球の生育との間には、有意な正の相関($r=0.92^{**}$)が認められた(第2図)。すなわち、リン酸吸収量は球の生育が良好であった2倍区、明条件で最も大きく、球の肥大が小さい区では吸収量が小さい傾向にあった。

鉢上げ後の出芽率の推移を第3図に示した。出芽率は3倍区でやや高い傾向が認められた。また、3倍区では培養中の光条件による差異は認められなかったが、標準区、2倍区では暗条件下で培養した球で出芽率が低下する傾向が認められた。また、暗条件3倍区では供試球の13.3%にあたる2球で茎立ちが認められた。

鉢上げ後90日間の球径の相対生長率を第4図に示した。同じリン酸濃度では暗条件下で培養した球の方が明条件下で培養した球に比して相対生長率が高い傾向にあった。また、明条件、暗条件ともに3倍区で相対生長率が高い傾向が認められた。



第1図 培地中のササユリ小球のリン酸吸収量

第2表 種子処理法、リン酸濃度とササユリ未熟種子の発芽指数

| 種子処理法 | リン酸濃度 | 発芽開始期 ^z (日) | 発芽速度 ^y (%/日) | 最終発芽率 ^x (%) | 発芽指数 ^w |
|---------|-----------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|-------------------|
| 無処理 | 標準 | 78.35 | 0.344 | 36.3 | 0.159 |
| | 2倍 ^y | 58.34 | 0.431 | 55.0 | 0.407 |
| NaOH浸漬 | 標準 | 38.55 | 0.477 | 80.0 | 0.990 |
| | 2倍 | 34.77 | 0.717 | 85.0 | 1.754 |
| NaClO浸漬 | 標準 | 47.13 | 0.591 | 79.0 | 0.991 |
| | 2倍 | 40.43 | 0.472 | 73.3 | 0.856 |

^z最終発芽率の1/6に達するまでの日数

^y最終発芽率の1/6から5/6に達するまでの発芽速度

^w置床後200日目の発芽率

^x最終発芽率×発芽速度/発芽開始期

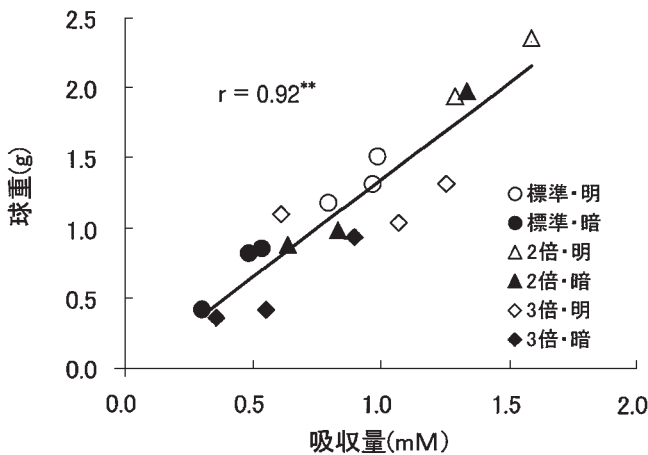
^yNa₂HPO₄の添加によりリン酸濃度をMS培地の2倍(2.50mM)に調整

第3表 培地中のリン酸濃度の差異が培養中の生育に及ぼす影響

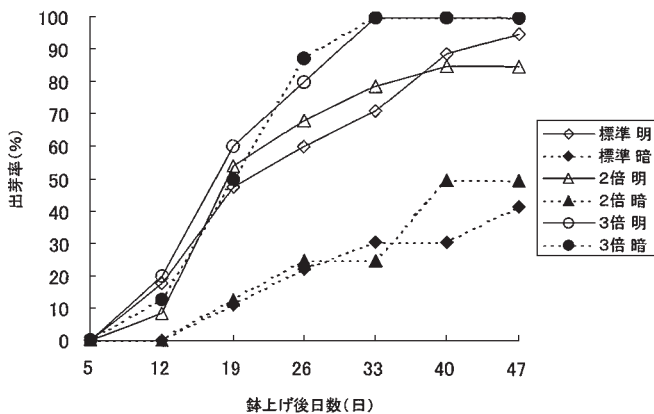
| リン酸濃度 | 光条件 | 部位別新鮮重(g) | | | 球径 (mm) | 分球数 (個) |
|-------------|-----|-----------|-------|-------|------------|------------|
| | | 球 | 根部 | 茎葉部 | | |
| 標準 | 明 | 1.34 | 0.023 | 0.097 | 10.2 | 2.0 |
| | 暗 | 0.70 | 0.025 | 0.053 | 6.3 | 0.9 |
| 2倍 | 明 | 2.05 | 0.113 | 0.280 | 12.5 | 2.1 |
| | 暗 | 1.28 | 0.055 | 0.113 | 9.5 | 0.9 |
| 3倍 | 明 | 1.15 | 0.017 | 0.095 | 9.1 | 1.0 |
| | 暗 | 0.57 | 0.017 | 0.092 | 5.2 | 0.3 |
| A(リン酸濃度) | | ** | ns | ** | * | ns |
| 分散分析 B(光条件) | | ** | ns | ns | ** | ** |
| A×B | | ns | ns | ** | ns | ns |

培養90日後

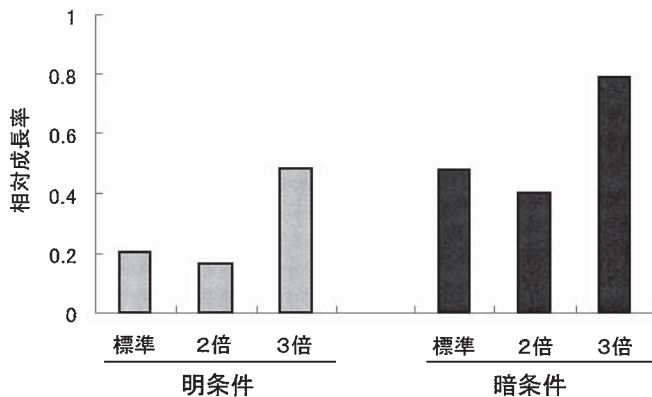
**, *はそれぞれ1%, 5%危険率で有意差あり, nsは有意差なし



第2図 培養中のリン酸吸収量と球重との関係



第3図 培養中のリン酸濃度と光条件が鉢上げ後のササユリの出芽に及ぼす影響

第4図 異なるリン酸濃度で培養したササユリ小球の鉢上げ後90日間の球径の相対生長率
相対成長率: $\ln(\text{培養終了時の球径}) - \ln(\text{鉢上げ後90日目の球径})$

考 察

リン片培養由来の小球を用いた培養における培地中のリン酸濃度の影響については、リン酸の添加が培養中の球根肥大や鉢上げ後の生育の促進に効果があることが明らかにされている(春木, 1996b)。本試験においては発芽種

子から形成された小球を供試したが、リン酸添加によって球の生育が良好となる傾向が認められ、春木らの報告と同様の結果が得られた。

さらに本試験では、培地へのリン酸添加によって未熟種子の発芽率が高まる結果が得られた。ササユリ未熟種子に対するMS培地中の無機栄養分の効果は未熟胚の生長と種子の休眠打破の二点に作用する可能性が考えられる。本試験から培地中へのリン酸添加により発芽率が高まる傾向が得られたが、このいずれかに作用しているかは明らかではない。種子発芽と無機イオン濃度の関係についてはKNO₃の添加による休眠打破が報告されているが(Williams・Harper, 1965)、リン酸の発芽促進効果については報告がみられない。

リン酸基はアデノシンと結合して結合エネルギーとともにTCAサイクル内を移動し、発芽過程の進行に不可欠なタンパク質の合成や、エネルギー生成に重要な役割を果たしていると考えられる。一般的にリンは種子中にフィチン態の形で貯えられ、分解されて利用される(千坂, 1975)。本調査の結果から培地中のリン酸は吸収されて種子中のリン酸を補完して発芽の代謝に対して何らかの影響を及ぼしたものと推察される。

ただし、標準量を超えたリン酸を添加した処理区では浸透圧やNaなどの無機イオン濃度も高まっていると考えられるが、これらの影響も否定できない。培地中へのリン酸添加が発芽に及ぼす効果のメカニズムについてはさらに詳細な検討を要するものと考えられる。

前報(稲垣ら, 2002)で明らかにしたように、水酸化ナトリウム浸漬や次亜塩素酸ナトリウム浸漬などの前処理によりササユリの未熟種子の発芽率を高めることが可能であり、本調査においてもこの効果を確認することができた。しかし、この前処理法では、発芽個体当たりの球形成率が低下することが問題であった。本試験の結果から統計的に有意ではないものの、リン酸の添加によって薬品浸漬処理区における発芽個体当たりの球形成率が高まる傾向が得られた。このことからリン酸の添加により、前処理による球形成率の低下を軽減する効果があると示唆される。河原林(1992)は、リン片培養における培地中のリン酸は子球形成までの短期間に速やかに減少したことを報告しており、リン酸が球形成に重要な役割を果たしていることが示唆される。

また、培養中のリン酸濃度は鉢上げ後の出芽にも影響を及ぼし、培地へのリン酸添加によって出芽率が高まる傾向が得られた。食用ユリでは出芽直後の茎葉部でリン酸濃度が高いことが報告されており(川岸・三浦, 1996)、リン酸はササユリ球根からの出芽にとって重要な無機栄養分であると推察される。

歌田・鈴木(1973)は地下発芽型種子の発芽過程を地下発芽誘導期、地下発芽期、小球形成期、低温感応期、展葉期の5段階に分類している。本試験からは発芽の誘導(地

下発芽誘導期・地下発芽期), 小球の形成(小球形成期), 球の養成(低温感応期), 地上への出芽(展葉期)の発芽の各過程についても培地へのリン酸添加が促進的に働くことが明らかとなった。また, 培養球からの出芽は一般的に根生葉であるか, 暗条件でリン酸3倍濃度で培養した球では茎立ちする個体が認められた。このことから, 培地中へのリン酸添加によって生育ステージを早め, 到花年数を短縮できる可能性が示唆される

春木ら(1996b)は, 培地中へのリン酸の添加によって培養中のササユリ小球の肥大と鉢上げ後の生育が良好となったことを報告しており, 標準, 2倍, 3倍のリン酸濃度の比較では, 2倍の濃度が最も良好であったとしている。しかし, 本試験では球の肥大は2倍濃度で最も良好であるという春木らと同様の傾向を示したのに対し, 鉢上げ後の出芽および球の肥大では3倍濃度で最も高い結果となり, 異なる結果となった。球の肥大と鉢上げ後の生育とでは, 最適なリン酸濃度が異なったことから各培養過程における最適なリン酸濃度についてはさらに検討を要すると考えられる

摘 要

ササユリの未熟種子培養において, MS培地中へのリン酸添加の効果について調べた。

1. 培地中へのリン酸添加によって種子の発芽率が高まった。水酸化ナトリウム(NaOH)や次亜塩素酸ナトリウム(NaClO)への浸漬処理では発芽率は高まるが, 発芽個体当たりの球形成率は低下する傾向にあった。しかし, リン酸添加培地では発芽個体当たりの球形成率も高まった。

2. 培養中の小球の肥大は明条件でリン酸濃度が2.5 mMの時に最も良かった。

3. 鉢上げ後の出芽率はリン酸濃度が3.75 mMで高かった。また, 明条件で培養した小球は暗条件のものより出芽率が高い傾向にあったが, 暗条件で培養を行っても培地中のリン酸濃度を3.75 mMとすれば明条件のものと同様の高い出芽率となった。

4. 鉢上げ後の球の肥大は暗条件で培養した球で促進される傾向にあり, かつ培養中のリン酸濃度が3.75 mMで最も促進された。

謝 辞 本論文の作成にあたり御校閲を賜った静岡県農業試験場石上清生物工学部長および加藤公彦主任研究員に深謝致します

引用文献

- 藤井義晴・渋谷知子・安田 環. 1990. 他感作用物質検索のための発芽・生育試験の, ロジスチック関数(RICHARDS関数)を用いた解析 雑草研究. 35: 353-365.
- 春木和久・山田真人・細木高志・太田勝巳. 1996a. 液体振とう培養におけるササユリ小球根の生育に及ぼす糖及び温度の影響. 園学雑. 65 363-371.
- 春木和久・山田真人・細木高志・太田勝巳. 1996b. 液体振とう培養におけるササユリ小球根の生育に及ぼす窒素源, リン酸イオンおよび硫酸イオンの影響. 園学雑. 65: 387-396.
- 稲垣栄洋・寺田吉徳・山本美智子・大塚寿夫・本間義之 2002. ササユリ(*Lilium japonicum* Thunb.)未熟種子の発芽特性と種子処理による発芽促進. 園学雑. 71. 133-138.
- 川岸康司・三浦豊雄. 1996. 春植え食用ユリにおける生育期間中の無機成分の変動. 園学雑. 65: 339-347
- 河原林和一郎. 1992. ササユリ球根の大量増殖技術の開発(第3報)液体培養における培地組成の経時変化, 子球の生長に及ぼす培養温度の影響および簡易培養槽による培養のスケールアップ 園学雑. 61(別1): 446-447
- 河原林和一郎. 1993. ササユリ球根の *in vitro* における増殖に及ぼす液体通気培養条件の影響 園学雑. 62: 197-205.
- Koller, D., M. Sachs and M. Negbi. 1964. Germination-regulating mechanisms in some desert seeds. VIII *Artemisia monosperma*. Plant Cell Physiol. 5: 85-100.
- 宮本芳城. 1998. ササユリ利用の現状と今後の展開方向. 平成10年度農林水産業近畿地域研究成果発表会発表要旨 43-57
- Murashige, T and F Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497
- 千坂英夫. 1975. 種子の休眠と発芽 p. 903. 農学大事典. 養賢堂. 東京.
- 歌田明子・鈴木基夫. 1973. ユリの繁殖に関する研究II ヤマユリ, カノコユリおよびパンフィック・ハイブリッド種子の発芽特性に関する研究. 野菜試報告 A. 12: 135-148.
- Williams, J. T. and J. L. Harper. 1965. Seed polymorphism and germination I The influence of nitrates and low temperatures on the germination of *Chenopodium album*. Weed Res. 5: 141-150.