

ササユリの培養による増殖及び PCR-RFLP/RAPD分析と育種

春木 和久

In vitro Propagation , PCR-RFLP/RAPD Analysis and Breeding in *Lilium japonicum* Thunb.

Kazuhisa Haruki*

目 次

第 I 章 緒言	1	第 2 節 PCR-RFLPを用いたユリの種間 雑種の両親の推定	37
第 II 章 ササユリ球根の増殖と液体振とう 培養による球根肥大促進	5	第 3 節 島根県内及び他県の自生ササユ リのRAPD分析	46
第 1 節 実験材料	5	第 IV 章 ササユリを片親にした異種間交雑 による新品種の育成	51
第 2 節 培養温度が球根肥大に及ぼす影響 ..	7	第 1 節 ササユリと他の野生種及び品種 の交雑	51
第 3 節 液体培地中の糖の種類が球根肥 大に及ぼす影響	11	第 2 節 育成した新系統への液体振とう 培養の応用	55
第 4 節 液体培地中の無機成分が球根肥 大に及ぼす影響	16	第 V 章 総合考察	57
第 5 節 培養中の光条件が球根肥大及び 養分吸収に及ぼす影響	24	摘 要	61
第 III 章 数種のユリ及び自生ササユリの PCR-RFLP/RAPD分析	30	引用文献	63
第 1 節 数種のユリのPCR-RFLP分析 ..	30	Summary	68

第 I 章 緒言

ユリ科ユリ属 (Liliaceae, *Lilium*) には約130種が含まれているといわれており, その自生地は日本列島を含めて北半球の亜熱帯から亜寒帯に広がっている (清水, 1987a). 日本列島には, テッポウユリ (*L. longiflorum* Thunb.), ササユリ (*L. japonicum* Thunb.), ヒメサユリ (*L. rubellum* Baker), カノコユリ (*L. speciosum* Thunb.), ヤマ

ユリ (*L. auratum* Lindley), ウケユリ (*L. alexandrae* hort. Wallace), タモトユリ (*L. nobilissimum* Makino), エゾスカシユリ (*L. dauricum* Ker-Gawl.), スカシユリ (*L. maculatum* Thunb.), コオニユリ (*L. leichtlinii* Hooker f. var. *Maximowiczii* Baker), ヒメユリ (*L. concolor* Salisb.), ノヒメユリ (*L. callosum* Sieb. et Zucc.), オニユリ (*L. lancifolium* Thunb.), クルマユリ (*L. medeoloides* A. Gray) の14種が自生している. さらに, サクユリ (*L. auratum* Salisb. var. *platyphyllum* Baker) など

* 作物部生物工学科

の亜種や変種もいくつか存在している(北村ら, 1976; 清水, 1987a)。また, これら日本に自生しているユリのうち, ササユリ, ヒメサユリ, ウケユリ, タモトユリ, ヤマユリ及びスカシユリは日本固有種である(清水, 1987a)。

日本に自生する野生種は, ユリの品種改良において交配親としてよく利用され, 種間交雑によって多くの品種が作出されている(清水, 1987b)。英国王立園芸協会は, 全ての野生種及び園芸品種を9のDivisionに分類することを提唱している(Anonymous, 1964; Leslie, 1982)。そのうち, Division IXには野生種が, Division I, Division V, Division VIIの中には日本原産の野生種を交配親に用いて育成された品種が含まれている。その中でDivision VIIはオリエンタルハイブリッド系と呼ばれる品種群を含んでおり, *Lilium*属の中の *Archelirion* 節に含まれるヤマユリ, カノコユリ, ササユリ, ヒメサユリなどが交配親として利用されている。Division VIIに含まれる品種の育種は, 19世紀にササユリ, ヤマユリ, カノコユリなどが欧米に紹介されるとともに盛んになり, 20世紀になるとニュージーランドやオーストラリアでも多くの品種が発表されるようになった(清水, 1987b)。

日本固有種の一つであるササユリは, 短筒形で横向きの淡桃色あるいは白色の花を付け, 本州の中部地方以西, 四国及び九州の一部を分布域としている(清水, 1987a)。ササユリは古くから人々に親しまれており, 万葉集や源氏物語の中にも取り上げられている。古くは奈良の都の率川社で三枝祭りとして「三枝」とよぶ花を3つもつササユリをかざしてまつる百合祭りがあったと伝えられている(相馬, 1981a; 相馬, 1981b)。奈良時代の島根県東部(出雲地方)の地形, 産物名などが記録されている出雲国風土記には, 神門郡(現在の出雲市南半分及び簸川郡南部)と仁多郡(現在の仁多郡と能義郡広瀬町の一部)の「山野に在るところの草木」として「百合」が記述されている(秋元, 1993)。このユリはササユリであったと考えられており, 島根県立八雲立つ風土記の丘(島根県松江市)では, 風土記に記載された植物を集めた「風土記植物園」でササユリを栽培展示している。

ササユリは現在でも山間部を中心に島根県内

の各地に自生している。島根県那賀郡弥栄村でみられた自生個体を図1に示した。自生個体の多くは, 淡桃色あるいは白色で芳香の強い花を6月に咲かせる。また, ごくまれに濃桃色の花をもつものもみられる。花数は1~2輪のものが多く, 草丈が1m以上の大型の個体では4輪以上花を付けるものもみられる。葉は個体間で形態的差異がみられるが, 島根県内に自生している個体は幅広で先端部の周辺が白くなっているものが多く, 日本海沿岸型の特徴を示している(清水, 1987a)。

図2にササユリ自生地(上)と自生している斜面(下)の写真を示した。このように, ササユリは人家裏の畑と山林の境界斜面で見られることが多い。特に, 毎年草刈など人手が加えられる斜面でよく見かけられる。開花時期にはよく人目をひくため採取されることが多く, 人口の多い地域では自生地が少なくなっている。また, 最近はいわゆる「里山」が放置されるようになり, ササユリの生育に適した場所が減少するとともに, 山間部でもその姿を見かけることが少なくなっている。そのため, 島根県内では, ササユリを増殖して以前の景観を取り戻そうとする町村も現れてきた。さらに, 栽培したササユリを「地域おこし」に利用しようという動きも見られるようになり, ササユリを増殖法や栽培法に関する技術開発が求められている。

ササユリを園芸植物として利用するためには, その栽培法の確立と栽培容易な品種の育成が必要である。ササユリは山口県(山村・久保田, 1985)あるいは和歌山県(宮本, 未発表)などでわずかに市場へ出荷されている例がみられるが, 他のユリに比べて栽培が難しいことから, まとまって出荷される産地は形成されていない。また, 栽培試験に利用するための均一な球根を多数集めることが困難であることから, 栽培法に関する研究は少数(仙頭, 1971; 久保田・山村, 1982; 山村・久保田, 1985)あるにすぎない。また, 品種についても, カノコユリでは「うちだかのこ」「べにこしき」(清水, 1987a)などの園芸用品種が育成されているのに対し, ササユリでは育成されていない。ササユリは, オリエンタルハイブリッド系の品種育成において桃色の花を得るためにヒメサユリと共に利用されてい



図1 ササユリ (*L. japonicum* Thunb.) の自生個体
1997年6月19日鳥根県那賀郡弥栄村にて撮影。

る(清水,1987a)程度で、育種への利用は少ない。そこで、花き園芸のための資源としてのササユリを有効に利用するために、*in vitro*での増殖と球根肥大の促進、ササユリ近縁種の類縁関係の解明と種間交雑種の親の推定、さらにササユリをもとにした育種の可能性の検討という三方向から本研究を進めることとした。

ササユリ球根は増殖率が低いことから、最近では組織培養による増殖法の研究が行われている(姫野, 1989a, 1989b)。その方法として、りん片切片の培養(浅尾ら, 1992; 市川, 1993)、カルスを利用した増殖法(Fukuiら, 1989; 水口ら, 1994; 水口・大川, 1994a, 1994b; 水口・大川, 1995; 水口ら, 1995, 1996)、苗条原基による方法(Tanakaら, 1991)が検討されている。しかし、これらの方法で得られた球根はいずれも1g以下の小さなもので、開花までには数年の球根養成期間が必要である(水口・大川, 1995; Niimi, 1995; 浅尾ら, 1994)。したがって、栽培用の球根を増殖養成する場合、あるいは短期間で新品種育成を行うためには開花までの年限の短縮が必要である。河原林(1995)は



図2 ササユリ (*L. japonicum* Thunb.) の自生地
1997年6月19日鳥根県那賀郡弥栄村にて撮影。

液体通気培養によって増殖した200~300mgの小球を低温処理を行うことによって1~3年で開花させることに成功した。この場合、球周が6cm程度の球根で翌春に80%の開花率が得られている。しかし、鳥根県内で採取したササユリはこの大きさではほとんど花芽分化せず、開花させるためには直径3.5cm(球周10cm程度)以上の球根が必要である(稲村, 未発表)。組織培養で得られた1g以下の球根を*in vitro*において短期間で1~2g程度の重量まで生育させることができれば、鳥根県産のササユリでも定植から開花までの球根養成期間を短縮することができるものと考えられる。筆者は、固形培地や液体培地で多くの植物の培養を試みてきた過程で、ササユリ球根を液体振とう培養すると固形培地に比べて球根肥大が促進することを経験した(春木・山田, 1992)。そこで、本研究の第一の課題として、液体振とう培養における球根肥大促進に有効な培養環境及び培地条件の検討をとりあげた。さらに、培養期間中の培地の糖及び無機イオン濃度の変化を調査することにより、液体振とう培養に適した培地成分の決定や環境

条件により球根肥大に差の発生する機作について検討を行った。

西日本に分布しているササユリは、日本海側と太平洋側で花芽分化時期、葉の幅及び厚さに差が見られることが指摘されている(清水, 1987a)。各地に自生するササユリの類縁関係を明らかにすることは、ササユリの育種を行ううえで有益であると考えられる。また、野生種や品種間の遺伝的距離や既存品種の親あるいはその来歴に関する知見は、新品種育成のための交配親を決定する場合に重要な情報となる。しかし、ユリの種間交雑種においては、‘スターゲザー’や‘ル・レーブ’のようにその親が公開されていないものがある(岡崎, 1993)。そこで、第二の課題としてササユリの系統間あるいは近縁種との遺伝的距離の比較、さらに種間交雑種の親の推定法の確立を取り上げた。

近年、分子生物学の発展と共に遺伝子の塩基配列を利用した植物の系統分類が行われるようになってきている。これは、2種類の植物が系統樹上で遠縁なものほどDNAの塩基の置換割合が大きいことを利用したもので、*rbcL*遺伝子(村上, 1995)や*matK*遺伝子(遠藤, 1995)の塩基配列がよく用いられている。また、園芸分野では、DNAの一部を増幅して得られたRAPD(Random Amplified Polymorphic DNA)あるいはDNAを制限酵素で消化して得られたRFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism)によって系統間の遺伝的距離を明らかにする研究が近年盛んになりつつある。そこで、ササユリの品種改良における交配親選定の基礎資料にするために、これらのDNA多型を利用することによってオリエンタルハイブリッド系品種のもとになっている野生種及びササユリの地域型の類縁関係の比較を行った。さらにその結果を利用して、交配親の明らかになっていない種間交雑種の親の推定を試みた。

ユリは切り花として重要な作物であり、生産額はキク、バラ、カーネーションに次いで第4位の地位を占めている(国重, 1993)。その中でも、オリエンタルハイブリッド系の品種は、フラワーアレンジメント、贈答用、イベント用の需要が多く、価格が大きく変動するものの、他のユリに比べて高値で取り引きされている(国

重, 1993)。現在は、‘ル・レーブ’‘カサブランカ’‘スターゲザー’‘アカブルコ’‘ベルリン’などの品種が輸入され、広く栽培されている(国重, 1993)。また、オリエンタルハイブリッド系のユリの品種改良も盛んで、毎年色鮮やかで豪華な品種が多数育成され種苗登録されている(高木, 1995; 高木, 1996; 高木, 1997)。一方、本研究の材料として取り上げたササユリは、豪華さはないものの、強い香りと繊細で清楚な風情をもっている。これは、今までに育成されたオリエンタルハイブリッド系の品種群には見られないものである。このような性質を生かして、現在までに育成された多くのオリエンタルハイブリッド系品種とは異なった性質をもつ新品種を育成することができれば、ユリの需要がさらに増加するものと期待される。そこで、第三の課題として、繊細で清楚なササユリの形質をできるだけ残した栽培容易な品種の育成を取り上げた。交配親としては、類縁関係の調査によってササユリと近縁であることが示された野生種あるいは品種を用い、交雑個体のうち球根肥大が良好で早期に開花したものについてその特性を調査した。

本研究の計画、実施及びそのとりまとめにあたっては、島根大学細木高志教授、稲葉久仁雄教授ならびに太田勝巳助教授に指導、助言を賜った。実験はおもに島根県農業試験場で行い、その実施にあたっては、山田員人元場長をはじめ古山光夫環境部長、名古屋洋治作物部長、松本敏一主任研究員、杉山万里主任研究員、近重克幸研究員、田中隆管理技師ならびに島根県立農業大学の稲村博子助教授に多大の協力、援助をいただいた。心から感謝の意を表す。また、RAPD分析を用いて各地に自生するササユリの比較を行うにあたり、静岡県農業試験場の本間義之氏、奈良県農業試験場の新井滋氏及び岡田恵子氏、和歌山県暖地園芸センターの宮本芳城氏、愛媛県農業試験場の松澤光氏には各県で採取されたササユリを分譲していただいた。厚く感謝の意を表す。なお、本研究の一部は、農林水産省の地域バイオテクノロジー実用化技術研究開発促進事業及び地域重要新技術開発促進事業によって行った。

第Ⅱ章 ササユリ球根の増殖と液体振とう培養による球根肥大促進

第1節 実験材料

培養条件の球根肥大に及ぼす影響を詳細に検討するためには、多数の均一な材料すなわちクローンを用いる必要がある。ユリ類のクローン増殖については、器官培養あるいは茎頂培養を用いた多くの報告がある(姫野, 1989a, 1989b)。ササユリではFukuiら(1989), 浅尾ら(1992), 市川(1993), 水口ら(1994), 水口・大川(1994a, 1994b, 1995), 大川ら(1995, 1996), Niimi(1995)がりん片あるいは茎, 葉の切片を用いた増殖法を検討している。また, Tanakaら(1991)は苗条原基による増殖法を, 河原林(1993a, 1993b, 1995)は液体通気培養による増殖法を開発している。これらの中で, 最も簡易な固形培地によるりん片切片を用いた培養法によって実生ササユリ数個体をクローン増殖し, その増殖率を調査した。

また, ヤマユリやヒメサユリの培養においては小球の生育が固形培地よりも液体培地で促進されることが明らかにされている(高山, 1984; 新美・斉藤, 1990)。そこで, ササユリについても固形培地による培養と液体振とう培養での球根肥大速度を比較した。

材料及び方法

島根県飯石郡吉田村で採取した3個体('T2-11' 'A2-02' 'Y1-07')の種子から胚を摘出し, 0.2%ゲランガム(和光純薬)で固化したホルモン無添加のMurashige-Skoog(MS)培地(Murashige・Skoog, 1962)で培養した。これらの胚から形成された小球を約1年間培養し, 培地上で生育の良いものを5球ずつ取り出し, それぞれの個体名の後にA~Eの記号を付してクローン増殖を行った。その中で'T2-11B' 'A2-02A'及び'Y1-07C'が培養時の分球が少なく, 球根肥大が良好であったのでそれらを供試材料とした。また, 松江市で採取した1個体(M-A)の花梗部分の切片を6-ベンジルアミノプリン(BA) $0.5\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ + α -ナフチル酢酸(NAA) $0.5\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ を添加したMS培地で培養して得られた小球も

供試材料とした。

各クローンの約5mm角りん片切片をBAとインドール酢酸(IAA)を添加したMS固形培地(0.2%ゲランガムで固化)を入れた10cm径のプラスチックシャーレに置床した。BAとIAAの濃度はそれぞれ0, 0.1, 1.0 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ とし, これを組み合わせた9種類の培地で実験を行った。培養条件は25°C, 3,000lx(約40 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)照明(12時間照明12時間暗黒)とし, 60日後に小球の発生数を調査した。発生した小球は, 葉の発生しているものと, 葉の発生がなく球根のみが形成されたものとを区別して調査した。さらに, このようにして得られた'T2-11B'の小球をホルモンフリーMS培地で2~6か月間培養し, 球根の重量と球径を測定し, 両者の相関関係を調査した。

また, りん片切片から形成された小球を植物培養用フラスコを用いてMS固形培地で1か月程度培養し, 約0.1gになった球根を用いて固形培地と液体培地での生育の違いを調査した。固形培地区では0.2%ゲランガムで固化したMS培地を200ml容植物培養用フラスコに75ml入れ, 小球を5球ずつ置床して培養した。液体培地区では, 150mlのMS培地を入れた300ml容三角フラスコに, 小球を10球ずつ入れ, 空気の透過を確保するため除菌フィルター付シート(サンキャップシート, 岩城硝子)でふたをし, 100rpmで振とう培養(旋回式)を行った。培養条件はいずれも20°C暗黒条件(フラスコ全体をアルミホイルで被覆)とした。また, 固形培地区, 液体培地区とも培地を1か月毎に同成分の新しい培地に更新し, 同時に球根重量を測定した。

液体振とう培養を行う際の, 振とう培養器及び小球を入れた培養用フラスコの状況として, 500ml容三角フラスコを使用した場合の例を図4(左上, 左下)に示した。なお, 本論文の他の実験においてもフラスコ容量以外は特別の記述がない限り同様にして振とう培養を行った。

結果及び考察

ササユリ4系統のりん片からの小球発生数を表1に示した。吉田村内で採取した3系統('T2-11B' 'A2-02A' 'Y1-07C')は, 同じ村内で採取し

たにもかかわらず小球の発生数が大きく異なった。その中では‘Y1-07C’が最も小球が発生しやすく、‘T2-11B’が最も少なかった。松江市で採取した‘M-A’は小球の発生数が多く‘Y1-07C’とほぼ同程度であった。また、培養中の小球の色は、‘T2-11B’と‘A2-02A’は赤紫色であったのに対して‘Y1-07C’と‘M-A’は緑色であった。

いずれの系統においても、IAAを添加することによって小球発生数が増加し、IAAが低濃度の場合にはBAを加えることにより小球形成数が増加する傾向を示した。また、BAの添加によって葉の伸長した小球が増加する傾向が認められた。葉の伸長しないものと伸長したものをあわせた小球発生数の最も多い条件は、‘T2-11B’では、IAA1.0mg・l⁻¹添加区の0.65であり、‘A2-02A’ではBA0.1mg・l⁻¹+IAA1.0mg・l⁻¹の1.58であった。これに対して、‘Y1-07C’及び‘M-A’ではBA0.1mg・l⁻¹+IAA0.1mg・l⁻¹添加区で、それぞれ、2.84及び3.56であった。

また、葉の伸長しない小球の発生数は、‘T2-11B’と‘A2-02A’ではIAA1.0mg・l⁻¹添加区でそれぞれ0.65及び1.52となり、‘Y1-07C’ではIAA0.1mg・l⁻¹添加区の2.78であった。‘M-A’では、BA0.1mg・l⁻¹+IAA0.1mg・l⁻¹添加区で葉の伸長しない小球の発生数が2.83で最高になったが、IAA1.0mg・l⁻¹添加区でも2.58の値を示し、両者に大きな差はなかった。

以上の結果から、BA添加は葉の伸長を促す効果が見られるものの、小球発生数の増加に対する効果はごくわずかであるので、りん片切片からの小球発生用の培地としてはIAAを0.1mg・l⁻¹~1.0mg・l⁻¹の濃度で単独で添加した培地が適当であると考えられる。添加濃度については系統によってIAAに対する反応に差が見られることから、それぞれの系統毎に検討する必要があるものと考えられる。この方法によれば、10cm径のシャーレに10個のりん片切片を置床し、40枚のシャーレで合計400個の切片を培養すれば、計算上‘T2-11B’では約300個、‘Y1-07C’では

表1 BA及びIAA濃度とササユリのりん片1切片からの小球形成数

添加ホルモン(mg・l ⁻¹)		T2-11B			A2-02A		
BA	IAA	供試数	葉発生球 ²	小球 ³	供試数	葉発生球	小球
0	0	80	0.08±0.05 ^x	0.40±0.14	50	0.10±0.05	0.56±0.13
0	0.1	80	0.01±0.01	0.35±0.09	50	0.08±0.06	1.48±0.24
0	1.0	80	0	0.65±0.15	50	0.04±0.03	1.52±0.23
0.1	0	80	0.06±0.03	0.21±0.07	50	0.08±0.06	0.48±0.14
0.1	0.1	80	0.08±0.03	0.26±0.08	50	0.18±0.08	0.86±0.18
0.1	1.0	80	0.01±0.01	0.23±0.09	50	0.16±0.07	1.42±0.20
1.0	0	80	0	0.03±0.02	50	0.02±0.02	0.66±0.16
1.0	0.1	80	0.01±0.01	0.05±0.05	50	0.12±0.07	0.70±0.16
1.0	1.0	80	0.05±0.05	0.23±0.10	50	0.12±0.07	0.84±0.16

添加ホルモン(mg・l ⁻¹)		Y1-07C			M-A		
BA	IAA	供試数	葉発生球	小球	供試数	葉発生球	小球
0	0	50	0	1.68±0.12	40	0	1.33±0.27
0	0.1	50	0.02±0.02	2.78±0.25	40	0.03±0.03	2.08±0.29
0	1.0	50	0	2.06±0.25	40	0	2.58±0.25
0.1	0	50	0.82±0.13	0.68±0.16	40	1.03±0.15	0.85±0.20
0.1	0.1	50	0.58±0.12	2.26±0.30	40	0.73±0.15	2.83±0.32
0.1	1.0	50	0.28±0.11	2.00±0.30	40	0.35±0.14	2.50±0.32
1.0	0	50	0.52±0.13	0.44±0.13	40	0.65±0.16	0.55±0.15
1.0	0.1	50	0.64±0.15	0.82±0.17	40	0.80±0.17	1.03±0.19
1.0	1.0	50	1.32±0.21	0.60±0.15	40	1.65±0.23	0.75±0.18

² 発生した小球から葉が伸長したもの。

³ 発生した小球で葉が伸長していないもの。

^x 標準誤差。

約1,000個の球根が得られることになる。

また、球根重量と球径の相関図を図3に示した(相関係数0.94)。球根重量は、球根の体積に比例し、球根の体積は球根の直径の3乗に比例すると考えられるので、 y を球径(mm)、 x を球根重量(g)として

$$y = ax^{1/3} + b$$

の曲線で近似したところ、図に示したような曲線が得られ、最小二乗法による近似式は

$$y = 20.3x^{1/3} - 7.2$$

となった。無菌条件で行う必要がある培養実験で生育の経時変化を調査する場合には、球径を測定するよりも球根重量を測定の方が容易である。そこで、以後の実験では生育調査においては球根重量を測定し、必要に応じてこの図および数式から球径を推定することにした。

ササユリの大量増殖法については、茎頂からの小球形成とその小球のりん片培養を組み合わせた増殖法(Fukuiら, 1989)、苗条原基による

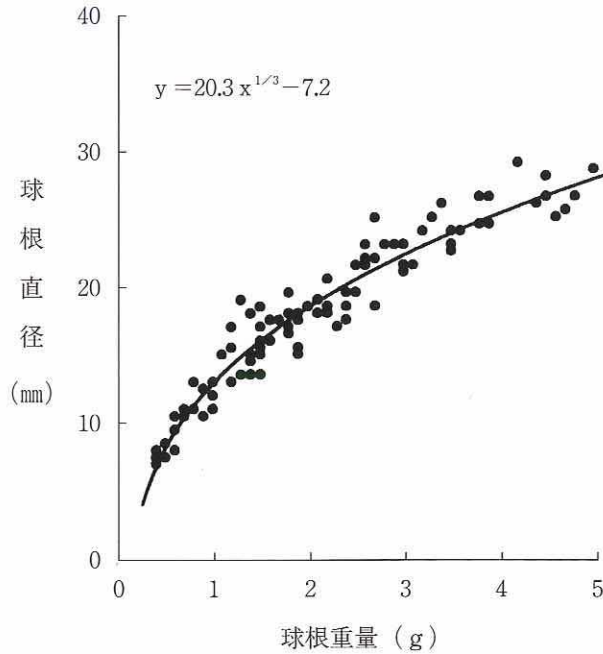


図3 球根重量と球径の相関



図4 液体振とう培養の状況と得られたササユリ球根

左上：液体振とう培養の状況。

左下：ササユリ小球の培養用三角フラスコ。

右：液体振とう培養で得られた球根(右列)
と固形培地で得られた球根(左列)。

方法 (Tanakaら, 1991), 液体通気培養による方法 (河原林, 1993a), カルスによる方法 (水口ら, 1994; 水口・大川, 1994a) が報告されており, これらはいん片切片による増殖法よりも効率の良い増殖法であることが示されている. 実用化の際にはこれらの方法を利用するものとして, 本論文の目的の一つである球根肥大促進法を検討するに当たっては, 実験に適した球根を選択することを考慮しても, 一度に数百個の小球が得られれば十分であるので, IAA添加MS培地を用いたりん片切片培養を材料養成に利用することとした.

‘T2-11B’を固形培地及び液体培地で培養した場合の培養終了時の球根の状況を図4(右)に示し, 球根重量の経時変化を図5に示した. 培養開始30日までは生育に大きな差は見られなかったが, 60日後頃から次第に液体振とう培養での生育が良好となり, 90日後には約2倍の重量になった. その後, 固形培地での球根の生育が向上し, 120日後には球根重量の差は1.5倍程度に縮小した. 液体振とう培養における球根は, 図4(右)に示すように, 固形培地で培養した球根に比べて横方向の肥大が良好であった. このことから, 固形培地に比べて液体振とう培養では, りん片への養分蓄積量が多いことが示唆される. 石破ら (1992) 及び加藤ら (1994) は

オリエンタル系ハイブリッドのユリの小球を用いて液体振とう培養を行い, 急速に球根が肥大することを観察している. これは, 今回の実験とほぼ同様な結果である. 増殖したササユリ球根の開花までに要する期間は, 定植時の球根の大きさに影響されることが示されており (水口・大川, 1995; Niimi, 1995; 浅尾ら, 1994; 河原林, 1995), ササユリの増殖球根を早期に開花させるためには, 培養時にできるだけ大きな球根を養成することが一つの方法であると考えられる. この実験で明らかとなった液体振とう培養による球根肥大促進効果は, 培養による球根生産において開花までの期間を短縮するための有効な手段になるものと期待される. そこで, 以下の実験において, ササユリの液体振とう培養のための培養温度, 培地に添加する糖の種類, 培地中の無機成分, 培養中の光条件について詳細に検討することとした.

第2節 培養温度が球根肥大に及ぼす影響

組織や器官の *in vitro* での培養において培養温度は重要な環境条件の一つである. 固形培地を用いたササユリ球根の培養における温度条件については, 山岸 (1991), 浅尾ら (1992) によって検討されている. そこで, 液体振とう培養における培養温度について検討した.

材料及び方法

ブドウ糖3%を添加したMS培地200mlを入れた500ml容三角フラスコに第1節で述べた方法で増殖したササユリ ‘T2-11B’ の小球 (0.1~0.2g) 30個を入れ, 暗黒条件で液体振とう培養を行った. 振とう培養は, 回転式100rpmで行った. 培養温度は20℃及び25℃とし, 各区3個のフラスコを用いて実験を行った. また, 各区とも小球を入れないフラスコを同じ条件で液体振とう培養し, ブランクとした. 培養16週間後に球根重量を調査し, 1g以上に肥大していた球根を各区4個のフラスコにほぼ同数ずつになるように移植してさらに6週間同じ条件で培養を続けた. 培地の更新は, 培養12週間後までは4週間間隔で, その後は2週間間隔で行った. 培地更新時に培地中のブドウ糖, アンモニウムイオン

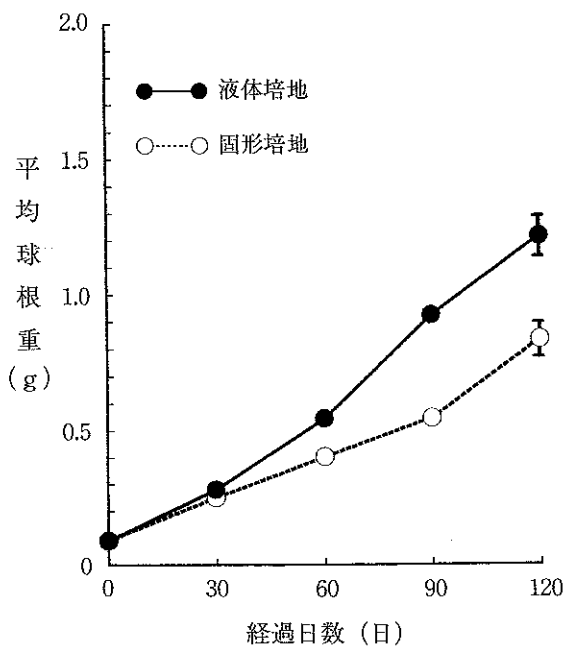


図5 固形培地と液体培地における球根肥大
図中のバーは標準誤差を示す.

(NH_4^+) 及び硝酸イオン (NO_3^-) の濃度, フラスコ内に残っている培地の残存量を測定した.

ブドウ糖濃度の測定は, 臨床血液検査用の試薬グルコースC IIテストワコー (和光純薬) によって行った. NH_4^+ はイオンクロマトグラフィー (DX-100, 日本ダイオネックス) によって測定した. NO_3^- の測定はIC-Pak Anion (日本ウォーターズ・リミテッド) カラムを取り付けたHPLC (LCモジュール1, 日本ウォーターズ・リミテッド) を利用した. 溶離液は, カラム取扱説明書に従って Borate/Gluconate 溶離液を用い, 214nmで吸光度を測定して定量した.

得られた球根はホルモン無添加のMS固形培地 (0.2%ゲランガムで固化) に移植し, フラスコに入れたまま 0°C 暗黒条件で1~3か月間低温処理を行った後, パーミキュライトを入れた直径30cmの素焼鉢に植え付けた. また, 定植前に重量, 球径を調査し, 定植3か月後に発芽および抽だいを調査した.

結果

20°C 及び 25°C で培養した場合の球根重量の変化を図6に示した. 培養8週間後までは両者の間に差はほとんどみられなかったが, その後 20°C 培養区では球根の肥大速度が徐々に増加し, 16週間後の平均重量は 25°C 培養区に比べて20%程度大きくなった. この時点で1g以下の球根を取りのぞき, 1g以上の球根のみを新しいフラスコに移植して培養密度を下げた. 移植約4週間後までは両区ともほぼ同様に球根重量が増加した. しかし, その後 20°C 培養区ではひきつづき球根重量が増加したのに対して, 25°C 培養区では重量増加がほぼ停止した. また, 培養終了時の 25°C 区ではりん片が褐変する球根が多数観察された.

20°C 及び 25°C における培養16週間後 (移植時) と22週間後 (培養終了時) における球根重量の度数分布を図7に示した. 16週間後の度数分布のピークは, 20°C 区では1.9g付近にみられたが, 25°C 区では1.5g付近と0.5g付近の2か所にみられた. 22週間後には, 20°C 区では1~5gまでの広範囲に分布したのに対して, 25°C 区では2.5g付近をピークとする分布となった.

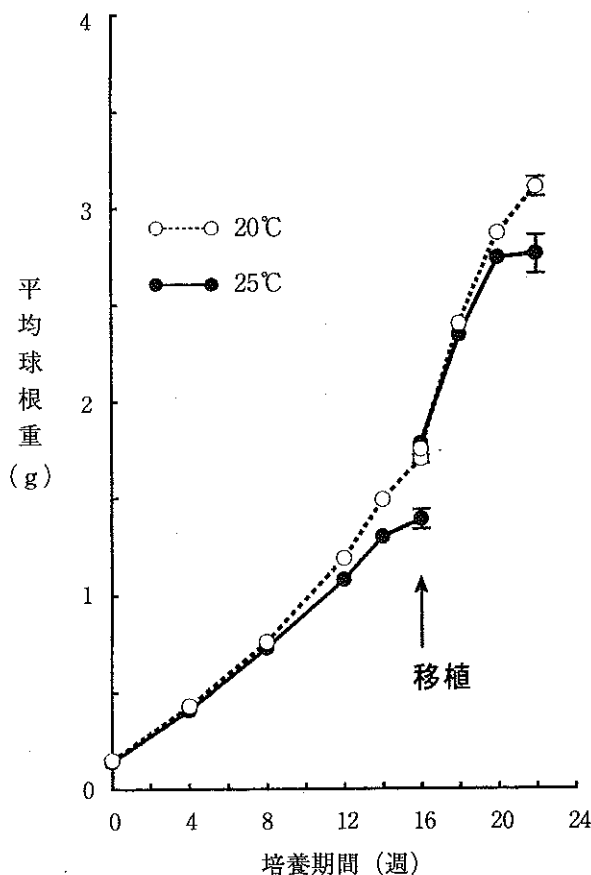


図6 培養温度が球根肥大に及ぼす影響

矢印は, 1g以上の球根のみを培養密度を下げた移植した時期. 図中のバーは標準誤差. 移植時及び培養終了時の平均球根重はt-検定(5%)で有意差あり.

培地からのブドウ糖, NH_4^+ , NO_3^- の吸収量を比較するために, 培養期間中の1球あたりの積算吸収量を算出し, 図8に示した. NH_4^+ は, 20°C 培養区が 25°C 区に比べてわずかに高かったが, ブドウ糖及び NO_3^- は培養温度による差はほとんど見られなかった.

異なる温度で培養して得られた球根を低温処理した後定植した場合の生育状況を表2に示した. 低温処理開始時の平均球根重量は 20°C 培養区では約3.1g, 25°C 培養区では約2.8gであったが, 低温処理中にも球根はわずかに肥大する傾向があり, 定植時には処理期間の長いものほど球根重量が大きくなった. 1か月低温処理区では発芽は全くみられず, 3か月低温処理区で最も発芽率が高かった. また, 20°C 培養区は 25°C 培養区に比べて発芽率が高かった. 抽だいは 20°C 培養3か月低温処理区で最も高く68%となった. この区について更に栽培を続けたところ, 翌年には25個体中2個体が開花した.

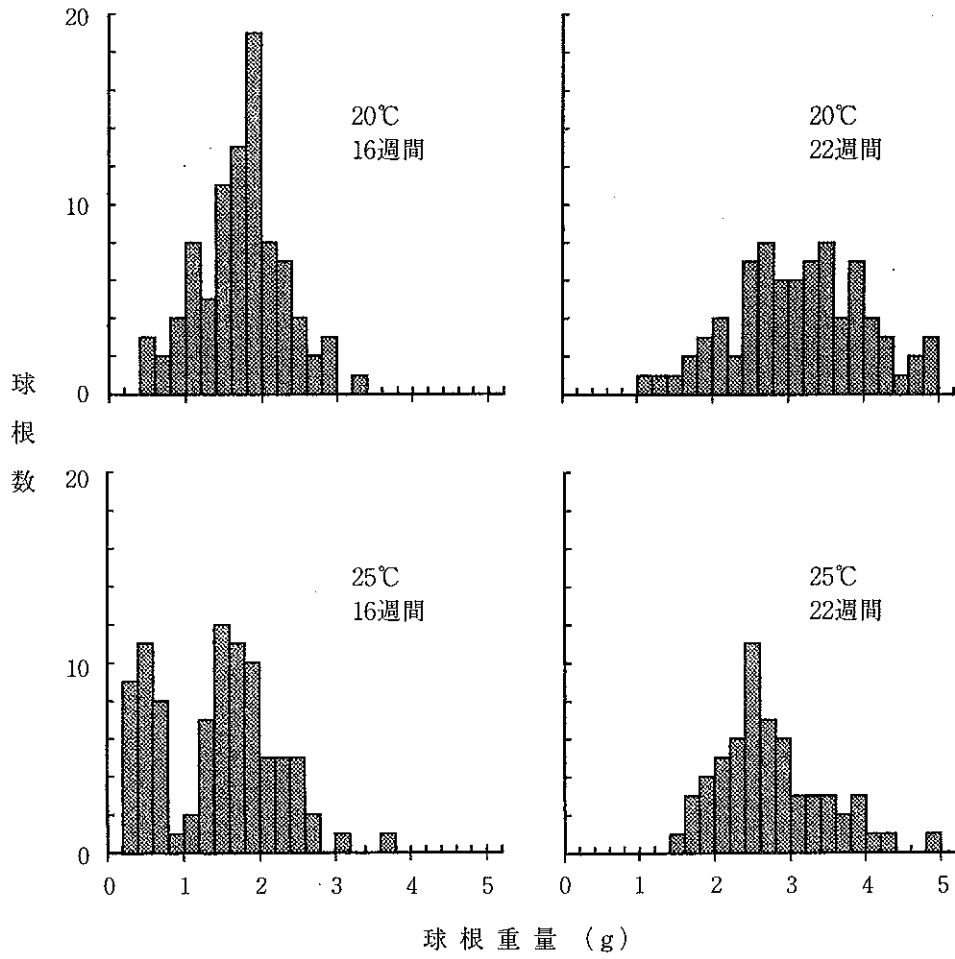


図7 移植時及び培養終了時における球根重量の度数分布
 培養開始16週間目に1g以上の球根のみを取り出し、培養密度を下げてさらに6週間培養を続けた。

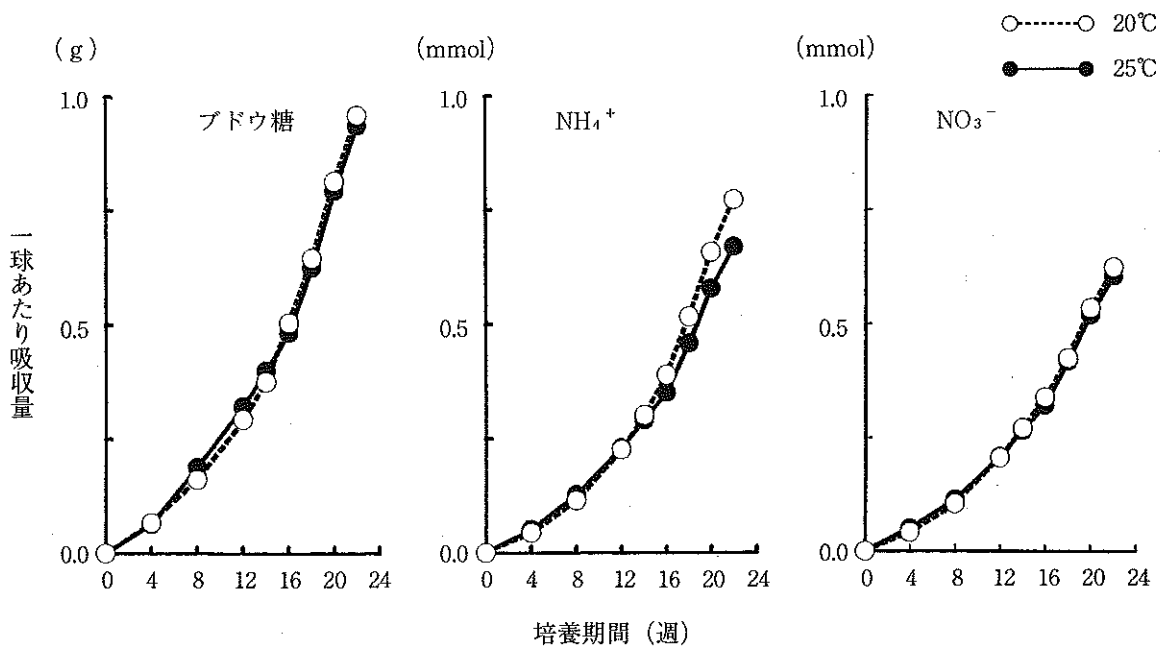


図8 培養期間中のブドウ糖、 NH_4^+ 、 NO_3^- の積算吸収量の変化

表2 液体振とう培養における培養温度、低温処理期間とササユリ球根定植後の生育

培養温度 (℃)	低温処理期間 (月)	供試数	定植時		定植3か月後		
			球重(g)	球径(mm)	発芽率(%)	抽だい率(%)	開花率(%)
20	1	34	3.4±0.17 ^a	22±0.43	0	0	0
20	2	20	3.6±0.16	22±0.40	50	30	0
20	3	25	4.0±0.17	24±0.80	92	68	0
25	1	28	2.8±0.13	23±0.57	0	0	0
25	2	15	2.9±0.13	23±0.41	60	0	0
25	3	25	3.3±0.17	24±0.68	60	8	0

^a 標準誤差.

考 察

Takayama・Misawa (1979) は、20～30℃で固形培地を用いたヤマユリのりん片培養を行い、形成された小球の重量は20℃で最大となるとしている。ササユリを用いた本実験でも、培養温度は25℃より20℃が適当であることが明らかとなり、22週間の培養で重量は約3g、球径約22mm（第1節の重量－球径換算式から）の球根が得られた。浅尾ら(1992)は固形培地においてショ糖濃度、培養環境を検討し、150日後に約1.5gの球根を得ている。しかし、本実験では液体培地を用いることにより、この約2倍の球根を得ることができた。

山岸(1991)は固形培地を用いたササユリ小球の培養実験で、26℃では外側のりん片が褐変する現象を認め、その原因が呼吸量の増加にあることを示している。本実験でも、25℃の培養区においてりん片の褐変を観察した。また、球根肥大に影響の大きいブドウ糖の吸収量は両区ともほぼ同じ値を示しているにもかかわらず(図8)、球根重量は20℃区で優れていた(図6)。したがって、このことは、液体培養において20℃区に比べて25℃区の球根肥大が劣るのは、25℃区では呼吸量が大きく、吸収したブドウ糖を呼吸で消費したためであると推察される。

また、培養開始16週間後の25℃培養区では、順調に肥大した球根と、肥大が抑制され1g以下にしかならなかつた球根に分かれ(図7)、そのため培養終了時に得られる球根数が20℃区に比べて少なくなった。培養初期の段階で肥大が停止する球根はいずれも褐色あるいは黒変していた。一般に、ユリの培養研究では一部(Takayama・

Misawa, 1979; Yamagishi, 1995)を除いて25℃で行われている場合が多い(姫野, 1989a, 1989b)が、ササユリの液体振とう培養においては、25℃では生育障害が発生しやすいため、20℃がより適当と考えられる。

ササユリ球根は培養中に休眠に入るので、定植後直ちに発芽させるためには定植前に低温処理が必要である(Niimi, 1995)。本実験から、20℃培養球では0℃で約3か月の処理で休眠が打破できることが明らかとなった(表2)。また、25℃培養球では、同条件では20℃培養球に比べて発芽率、抽だい率が低いことから、さらに長期間の低温処理が必要であると考えられる。最も発芽及び抽だい率の高かつた20℃培養3か月低温処理区では定植時に重量約4g、球径約25mm(第1節の重量－球径換算式から)になっており、半数以上が抽だいし、さらに翌年には25球中2球で開花した。Niimi(1995)は試験管内で0.4g以上に生長した球根を用い、開花するまでに少なくとも2年の栽培が必要であるとしている。水口・大川(1995)は約0.045gに生長した培養球を用い、3年目に開花したことを報告しており、更に球周が約12cm以上になるとほぼ100%が開花することを示している。したがって、本実験で得られた球根の開花年限を短縮し、開花率を向上させるためには、培養終了時の球根重量をさらに増加させる必要がある。そこで、以下の節では培養温度を20℃として、球根肥大促進をはかるために他の培養条件を検討する。

第3節 液体培地中の糖の種類が球根肥大に及ぼす影響

培養においてエネルギー源として糖は重要な働きをしており、培地へ添加する糖の種類と濃

度ばかりでなく、培養中の糖の濃度変化を知ることは、培養条件を検討する上で重要である。しかし、これらに関する報告は、ササユリ（河原林，1992），オリエンタルハイブリッド系ユリ（加藤ら，1994）などでショ糖について検討されているにすぎない。多くの植物は、ショ糖を転流物質，デンプンを貯蔵物質として利用し，これらの分解産物であるブドウ糖をエネルギー源として利用している（増田，1994）。そこで，ショ糖，ブドウ糖，さらにデンプンがアミラーゼによって分解されてできるマルトースを培地に添加し，これらの糖の培地からの吸収状況と球根肥大に及ぼす影響を検討した。

材料及び方法

第1節で示した方法で得られたササユリ‘T2-11B’の0.1~0.3gの小球を材料として用いた。各種の糖を添加したホルモンフリーMS培地を250ml入れた500ml容三角フラスコに20個の小球を入れ，直径10mmの除菌フィルター付のシート（サンキャップシート，岩城硝子）でふたをし，20℃暗黒条件，100rpm（巡回式）で液体振とう培養を行った。添加する糖は，3%ブドウ糖，3%または6%ショ糖，3%または6%マルトースとし，フラスコは各区2個ずつ用いた。培地の更新は，培養5週間及び9週間後に行い，13週間後まで培養を続けた。培地更新時と培養終了時に球根重量を，また培養終了時に乾物重を測定し，りん片数を調査した。また，培養中は10日間隔で培養液を1mlずつ採取し，糖濃度を測定した。

乾物重は，試料を120℃の乾燥器に入れ，重量変化がなくなった時点での重量を測定して求めた。糖濃度はHPLC（日本ウォーターズ・リミテッド）を用いて測定した。カラムはマイクロボンドスフェアー（5 μ NH2 100Å 15cm，日本ウォーターズ・リミテッド）を，溶離液はアセトニトリル：水=80：20（V/V）とし，カラム温度は40℃，流速は1.0ml/分として，示差屈折計で測定した。

さらに，液体培地に添加する糖を1.5，3.0，4.5及び6.0%のブドウ糖として，上記実験と同様に0.1~0.3gのササユリ‘T2-11B’の小球を培

養した。150mlの培地を入れた300ml容三角フラスコに10個の小球を入れ，フラスコを各区3個ずつ用いて上記と同様にして実験を行った。培地更新は培養6，10週間後に行い，13週間後まで培養し，培地交換時及び培養終了時に球根重量とブドウ糖濃度を調査した。ブドウ糖濃度は，臨床血液検査用の試薬グルコースCⅡテストワコー（和光純薬）によって測定した。

結果

各種の糖を培地に添加した場合の球根の肥大状況を図9に示した。ブドウ糖及びショ糖添加区では球根重量が5週間後には約2倍に増加した。その後，ブドウ糖3%添加区では球根重量が急速に増加したのに対して，ショ糖3%添加区では球根重量は増加したものの，その増加割合はブドウ糖3%添加区より低かった。ショ糖6%添加区では9週間後までは球根重量がわずかつ増加したが，その後はほとんど変化がなかった。マルトース添加区では3%，6%添加区とも球根の重量増加はごくわずかであり，9週間後から11週間後の間はほとんど増加しなかった。

培養終了時の乾物重及びりん片数を表3に示した。乾物重はブドウ糖添加区で最高の値を示

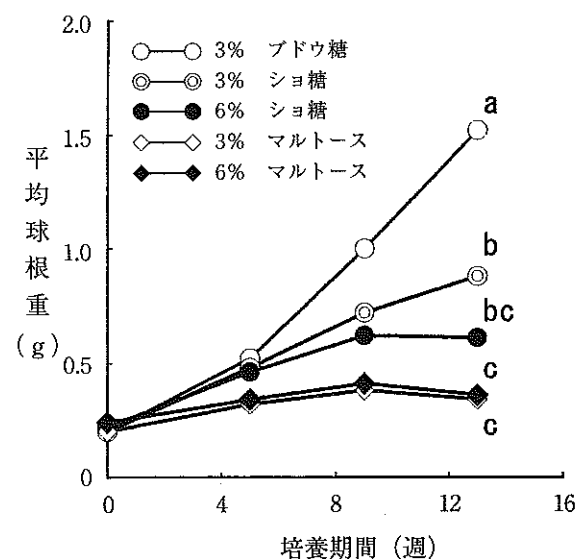


図9 液体振とう培養における糖の種類及び濃度と球根肥大

a-cの文字は，ダンカンの多重検定（5%レベル）の結果を示し，同種の文字は有意差のないことを示す。

表3 液体振とう培養における糖の種類と濃度がササユリ球根の乾物重とりん片数に及ぼす影響

糖	濃度 (%)	乾物重(DW) (g)	DW/FW ²	りん片数
ブドウ糖	3.0	0.37 a ¹	0.24	10.8 a
シヨ糖	3.0	0.20 b	0.23	9.7 a
シヨ糖	6.0	0.16 b	0.26	7.6 b
マルトース	3.0	0.06 c	0.18	8.1 b
マルトース	6.0	0.07 c	0.19	8.0 b

² DW：乾物重，FW：生体重.

¹ ダンカンの多重検定 (5%レベル)，同種文字に有意差なし.

し，他の区に対して有意差が認められた。これに対し，マルトース添加区では0.06～0.07 gで他の区に劣った。また，球根の充実度を示す乾物重と生体重の比 (DW/FW) はシヨ糖及びブドウ糖添加区ではほぼ同程度でマルトース添加区では低かった。りん片数はブドウ糖添加区におい

て約10枚であるのに対して，球根重量の最も小さいマルトース添加区で約8枚であり，その差はわずかであった。

培地中の糖の濃度変化を図10に示した。ブドウ糖濃度は培養期間の経過とともに減少し，球根の重量増加とともにその減少量が大きくなっ

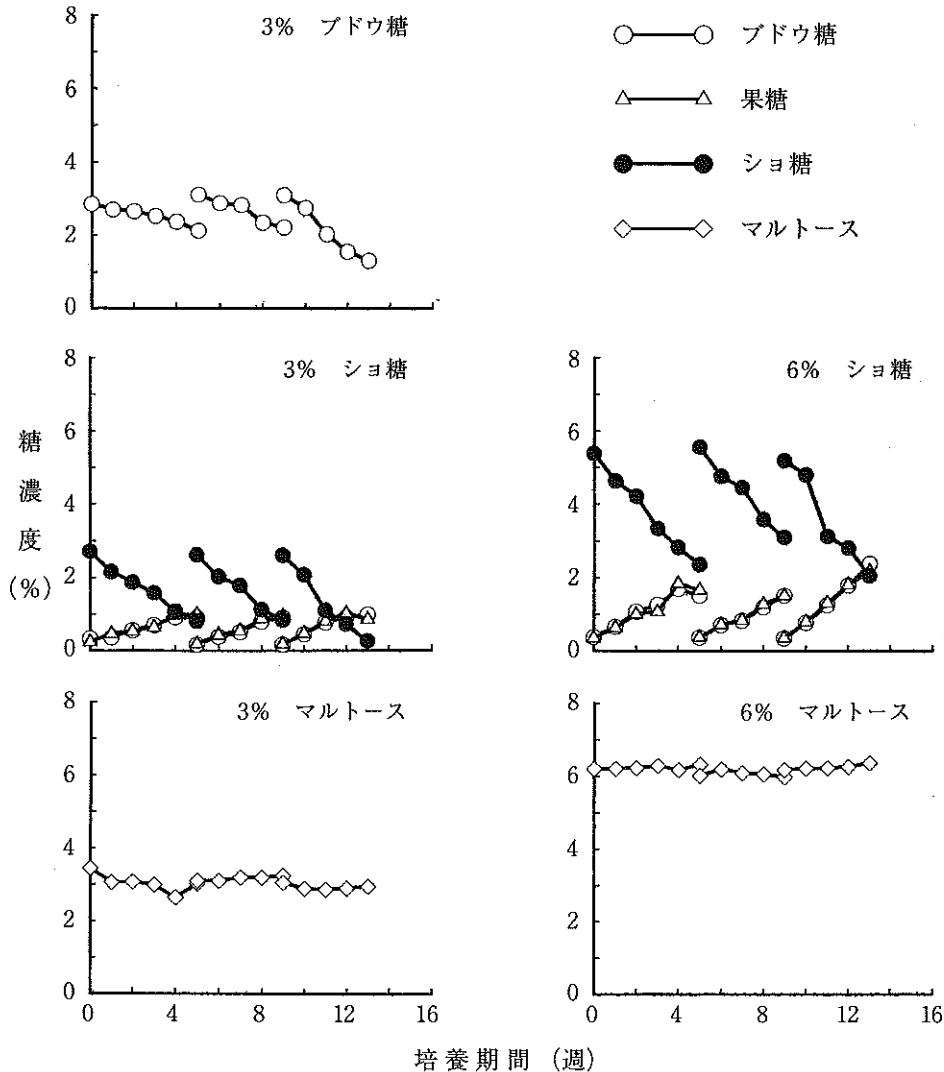


図10 異なった糖を添加した培地を用いた液体振とう培養における培養中の各種濃度の変化

た。シヨ糖添加区では、シヨ糖濃度が急速に減少し、ブドウ糖及び果糖濃度が増加した。その際、ブドウ糖と果糖の濃度はほぼ等しかった。シヨ糖3%添加区では、培養終了時にはシヨ糖はほぼなくなり、ブドウ糖及び果糖に変わっていた。シヨ糖6%添加区でも同様にシヨ糖濃度が減少したが、ブドウ糖及び果糖の増加量が多く、糖の合計量は培地交換時とほとんど差がなく、糖の吸収量は少なかった。マルトースは培養期間中にほとんど減少しておらず、吸収量のごくわずかであることが明らかとなった。

培地に異なる濃度のブドウ糖を添加した場合の球根重量の経時変化を図11に示した。球根重量はブドウ糖3.0%添加区で最も良好な増加を示し、1.5%及び4.5%添加区がこれに次いだ。6.0%添加区では重量増加が少なく、3.0%添加区に比べて培養終了時の重量は半分以下であった。継代培養を続けた場合、培地更新前後の培地中の残存ブドウ糖濃度を表4に示した。各区とも培地更新時には培養開始時の1/2以上のブドウ糖が残存しており、いずれの区も培養中に糖欠乏の状態にはならなかったことが示されている。ブドウ糖濃度の減少量は第一回目の培養では4.5%区が最も多く、次いで6.0%、3.0%、1.5%区の

順になったが、2回目以降は球根重量増加の最も良好な区である3.0%区で最も減少が大きかった。

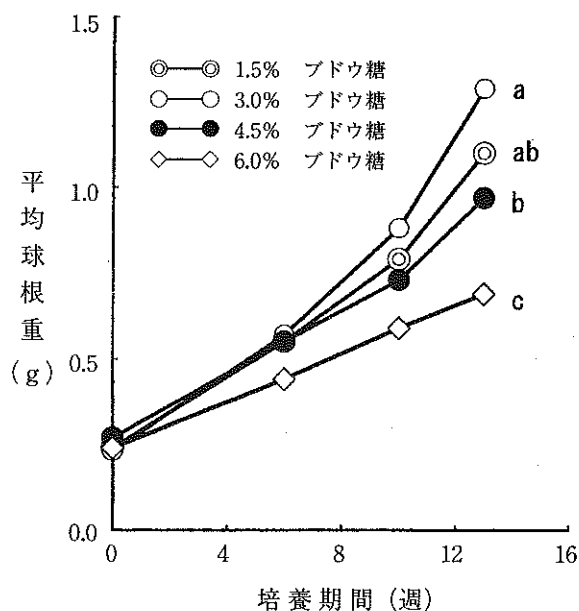


図11 液体振とう培養におけるブドウ糖濃度と球根肥大

a-cの文字は、ダンカンの多重検定(5%レベル)の結果を示し、同種の文字は有意差のないことを示す。

表4 ササユリ小球根の液体振とう培養において添加するブドウ糖濃度と培養前後でのブドウ糖濃度の変化

ブドウ糖濃度 (%)	培養	培養期間 (週)	ブドウ糖濃度		
			開始時 (%)	終了時 (%)	差 (%)
1.5	初代培養	6	1.50	1.03±0.05 ²	0.47
	継代 I	4	1.50	1.16±0.23	0.34
	継代 II	3	1.59	0.87±0.05	0.72
3.0	初代培養	6	2.89	2.38±0.01	0.51
	継代 I	4	3.33	2.29±0.12	1.04
	継代 II	3	3.02	2.23±0.04	0.79
4.5	初代培養	6	4.80	3.94±0.03	0.86
	継代 I	4	5.03	4.43±0.26	0.60
	継代 II	3	4.50	4.09±0.21	0.41
6.0	初代培養	6	6.44	5.83±0.13	0.61
	継代 I	4	6.68	6.53±0.55	0.15
	継代 II	3	6.09	5.75±0.38	0.34

² 標準誤差。

考 察

ササユリ球根の培養においては一般にショ糖が用いられており、培養中の植物体に対する他の糖の影響については検討されていない。そこで、液体振とう培養に用いる糖としてショ糖以外にブドウ糖、マルトースを用いて検討したところ、ブドウ糖で球根の肥大が最も良好であった。

ショ糖を利用した場合には3%の濃度で比較的肥大が良好であるのに対して、6%では肥大が劣ることが認められた。新美・斎藤(1990)はヒメサユリを用いた実験で培地の浸透ポテンシャルについて考察し、ショ糖濃度5%が子球生長の限界であると推定しており、ササユリに関する本実験においてもこれに矛盾しない結果が得られた(図9)。

植物の種子や球根の貯蔵養分は主としてデンプンであり、これは一般に酵素によってマルトースやブドウ糖に分解されて利用されている(増田, 1994)。ショ糖を培地に用いた場合には、その一部がブドウ糖と果糖に分解後吸収利用されることが明らかとなっており(山岸, 1991; 河原林, 1992; 加藤, 1994)、本実験でも、球根の生育状況には関係なく培養中にショ糖が分解されてブドウ糖と果糖が生成されていることが示された。

ショ糖3%添加区と6%添加区を比較すると球根肥大の劣る6%添加区の方がショ糖の分解量が多くなっている(図10)。ショ糖6%添加区では培養開始時の糖のモル濃度は0.09Mであり、終了時の0.11Mとほとんど差がないのに対して、6%添加区では培養開始時には0.18Mで終了時には0.31Mとなり、約2倍にモル濃度が上昇している。これは、3%添加区では分解と吸収がほぼ均衡しているのに対して、6%添加区では吸収される以上に分解したためと考えられる。さらに、これによって6%添加区では培地の浸透ポテンシャルが低下していると推定される。これに対して、ブドウ糖3%添加区では培養開始時に0.17Mで終了時には0.07Mとなり濃度が大幅に低下し、それにもなって培地の浸透ポテンシャルも上昇していると考えられる。

ブドウ糖添加量の実験においては、3%添加区で最も肥大が良好で、6%添加区で肥大が抑制されることが示されたが(図11)、6%添加区の培養開始時モル濃度0.33Mは、球根肥大が抑制されたショ糖6%添加区の培養終了時の糖のモル濃度0.31Mとほぼ等しく、球根肥大が培地の低浸透ポテンシャルによって抑制されることが推定される。

これらの結果から、ショ糖6%添加区において培養後期に球根肥大が停滞するのは、ショ糖が分解されて培地の浸透ポテンシャルが低下し、養分吸収量が低下して肥大が悪くなり、そのために糖の吸収がさらに低下して培地の浸透ポテンシャルが低下するという悪循環に陥るためであると推察される。したがって、ショ糖を培地に用いる場合には吸収量と分解量が均衡するように培地の量、糖濃度、球根の数を調節する必要があると考えられる。加藤ら(1994)も、オリエンタルハイブリッド系ユリにおいて同様のことを指摘している。これに対してブドウ糖を用いる場合には培養過程で糖の分解による培地の浸透ポテンシャルの低下を考慮する必要はないので、培地に利用する糖としてブドウ糖が適していると考えられる。

ワサビの培養では、培地に添加したマルトースが利用されることが明らかとなっている(長谷川ら, 1995)。しかし、ササユリ球根をマルトースを用いて培養した場合、球根の生体重はわずかに増加するものの、乾物重の増加は微少であることから、生体重の増加は水分を吸収したためであり、マルトースはほとんど利用されないものと考えられる。マルトースは、種子発芽などのデンプンが分解される過程で生成され、さらにブドウ糖に分解されて利用されている(増田, 1994)。液体振とう培養を行っている球根は、貯蔵養分を消費する発芽の過程ではなく、貯蔵養分を蓄積する球根肥大過程にあると考えられる。そのため、マルトースを分解する酵素がほとんど誘導されず、マルトースの利用ができなかった可能性が考えられる。

新美・斎藤(1990)はヒメサユリ子球の充実度を示す乾物率を調査し、約20%であることを明らかにしている。ササユリにおいてもブドウ糖あるいはショ糖を用いた場合23~26%の値を

示しており(表3), ほぼ同程度の値といえる。なお球根の充実度を比較するために, 別途に固形培地で培養したもの及び土壌中で栽培した球根の乾物重(DW)と生体重(FW)の比の値を調査したところ, 固形培地では0.24, 土壌中のものは0.33であった。ブドウ糖あるいはショ糖を用いた液体振とう培養で得られた球根は土壌中のものと比べるとやや小さな値となったが, 固形培地とは大きな差はなかった。したがって, ササユリの液体振とう培養でも水分吸収ばかりでなく乾物重の増加を伴った肥大が行われていることが明らかとなった。しかし, 球根重量の大きなブドウ糖添加区と球根重量の小さなマルトース添加区において, 重量の差に比べてりん片数の差が小さいことから(表3), 重量増加がりん片数増加よりもむしろりん片への養分蓄積の結果であると考えられる。

以上のように, ササユリ球根の液体振とう培養に利用する糖としてはブドウ糖が最も適当であると考えられたので, 以下の実験では3%ブドウ糖を用いて行うことにした。

第4節 液体培地中の無機成分が球根肥大に及ぼす影響

組織培養において培地組成は生育に影響を及ぼす重要な条件の一つであり, 基本培地の選択がその後の生育に及ぼす影響は大きい。MS培地あるいはB5培地(Gamborgら, 1968)などは一般によく用いられているが, これらの培地はタバコカルスやダイズの培養細胞を対象にして考案されたもので, 培養する作物あるいは培養方法によって必ずしも最適とはいえない。ニンジン(Tsujiら, 1993)あるいはジャガイモ(Kozaiら, 1995)の液体培養などでは, 培地成分あるいは培地量と培養物の生育との関係について養分吸収の面から検討され, これらの培地を一部修正する必要があることが示されている。

ササユリの培養に関しては, ショ糖の添加量(浅尾ら, 1992), サイトカイニンあるいはオーキシンの種類と濃度(水口ら, 1994; 水口・大川, 1994a)などについて検討されているが, 培地の無機成分の添加濃度あるいは培養中の濃度変化に関する報告は河原林(1992)の報告以外ほとんどみられない。そこで, 培養中に吸収量

の多い無機多量成分について培地への添加量を検討した。

材料及び方法

1. 培地中の無機多量成分濃度の変化

第1節で述べた方法で増殖したササユリ'T2-11B'のりん片切片をホルモン無添加MS培地で培養して得られた約1gの小球を材料とした。ショ糖にかえてブドウ糖3.0%を添加し, 1N NaOHでpH5.8に調整した後オートクレーブで滅菌したMS培地を150ml入れた300ml容三角フラスコ3個に小球を15個ずつ入れ, 直径10mmの除菌フィルター付きシート(サンキャップシート, 岩城硝子)でふたをして20℃暗黒条件, 100rpm(巡回式)で液体振とう培養を行なった(培養条件は以下の実験と同様とする)。培養開始時を含めて10日間隔で4回, 約1.5mlの培地を採取し, 硝酸イオン(NO_3^-), 硫酸イオン(SO_4^{2-}), リン酸イオン(H_2PO_4^-), アンモニウムイオン(NH_4^+), カリウムイオン(K^+), マグネシウムイオン(Mg^{2+}), カルシウムイオン(Ca^{2+})の濃度を測定した。

2. 窒素源と球根の生育

培地に含まれる NH_4^+ と NO_3^- の比率($\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$)について検討した。MS培地の NH_4^+ と NO_3^- の濃度をそれぞれ0/60mM, 10/50mM, 20/40mM, 30/30mM及び40/20mMに変更し, ショ糖のかわりにブドウ糖3.0%を添加して用いた。培地成分の調整は硝酸アンモニウム(NH_4NO_3), 硝酸カリウム(KNO_3), 硝酸ナトリウム(NaNO_3), 塩化アンモニウム(NH_4Cl)を用いて行った。培地の無機イオン濃度は, 全ての区で浸透ポテンシャルがほぼ等しくなるように塩化ナトリウム(NaCl)を0~20mM添加して20℃での全無機塩による浸透ポテンシャルが-0.32MPになるように調整した(吉田, 1972)。また, 培地は1N NaOHを用いてpH5.8に調整し, その後オートクレーブで滅菌した。

培地は300ml容三角フラスコに150mlずつ分注し, りん片培養で得られた0.1~0.2gの小球(平均約0.15g)を各フラスコに10個ずつ入れ, 振とう培養を行なった。各区3フラスコずつ用

い、培地の更新は120日目までは30日ごとに、その後は15日間隔で2回行い、合計150日間培養を続けた。培養開始時と培地更新時に球根重量、培地残存量、培地中のブドウ糖、 H_2PO_4^- 、 NH_4^+ 及び NO_3^- 濃度を測定し、培養中の積算吸収量を計算した。

さらに、培地中の NH_4^+ をグルタミン (GLN) にかえて実験を行なった。GLN、 NH_4^+ 及び NO_3^- の濃度はそれぞれ10/0/40mM、5/0/50mM、0/10/50mMとなるように上記と同様にして調整した。pHは1N NaOHで5.8に調整した後オートクレーブで滅菌した。なお、GLNはオートクレーブ後に、所定の濃度になるようにpH5.8に調整した100mM溶液をろ過滅菌して添加した。りん片培養で得られた約0.2gの小球を、150mlの培地を入れた300ml容三角フラスコに10個ずつ入れ、各区3フラスコずつ用いて実験を行なった。培地は30日毎に2回更新し、その後20日間培養を続けた後、球根及び根の重量を調査した。

また、3.0%ブドウ糖を添加したMS培地で約4か月間液体振とう培養して得られた約1.0gの球根を各フラスコに10個ずつ供試し、GLN、 NH_4^+ 及び NO_3^- の濃度の比率 (GLN/ NH_4^+ / NO_3^-) をそれぞれ10/0/40mM、0/0/60mM及び0/20/40mMになるように上記と同様にして調整し、pH5.8とした培地で培養した (GLNはオートクレーブ後に添加)。各区3個のフラスコを実験に用い、培養30日後に培地を更新し、さらに20日間培養を続けた後発根率、球根及び根の重量を測定した。また、培養中に10日間隔でGLN、 NH_4^+ 及び NO_3^- 濃度を測定した。

窒素源の異なる培地で培養した球根の定植後の生育をみるために、MS培地で約6か月間液体振とう培養して得られた根の伸長していない約2gの球根を、前述と同様にしてGLN、 NH_4^+ 及び NO_3^- を組み合わせ、pHを5.8に調整した培地 (250mlの培地を入れた500ml容三角フラスコを各区2個使用) で60日間培養した。培地更新は15日毎に行なった。得られた球根はホルモン無添加MS培地 (シヨ糖3.0%、ゲランガム0.2%で固化) に移植し、5℃暗黒条件で3か月間低温処理したのち、パーミキュライトを入れた直径30cmの素焼き鉢に定植し、昼温 (8時~17時) 23℃、夜温17℃になるように調節したガラス室

に置いて60日後に発芽状況を調査した。

3. リン酸濃度と球根の生育

約0.25gの小球を、ブドウ糖3.0%添加のMS培地 (1倍区) 及び H_2PO_4^- 濃度を変更した培地で液体振とう培養し、球根の生育状況を比較した。 H_2PO_4^- 濃度は培地にリン酸二水素ナトリウム ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) を1.25mM (2倍区) あるいは2.5mM (3倍区) 添加することによって変更した。pHは、 H_2PO_4^- の濃度調整後1N NaOHで5.8に調整し、その後オートクレーブで滅菌した。培地の浸透ポテンシャル調整は、添加する NaH_2PO_4 濃度のごくわずかであるので特に行なわなかった。培地更新は30日間隔で4回行い、最後の培養は15日で打ち切った。更新時と培養終了時に球根重量を、また、培養開始時及び更新時に培地の量ならびにブドウ糖、 NH_4^+ 、 NO_3^- 及び H_2PO_4^- の濃度を測定し、培地の更新ごとに各成分の吸収量を計算して積算吸収量を求めた。

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

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

4. 硫酸イオン濃度と球根の生育

硫酸ナトリウム (Na_2SO_4) をMS培地に添加して球根の生育を比較した。添加量は、0、1.6mM及び3.2mMとし、浸透ポテンシャル調整はとくに行なわなかった。pHは、培地作成後1N NaOHで5.8に調整し、その後オートクレーブで滅菌した。培養には約0.2gの小球を用いた。培地更新は培養30日後、60日後及び75日後に行ない、全培養

期間は90日とした。また培地更新前後で、培地の残存量、 NH_4^+ 、 NO_3^- 、 H_2PO_4^- 、 SO_4^{2-} 及びブドウ糖濃度を測定し、培養中の積算吸収量を算出した。

5. 培地成分の測定法

NH_4^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 及び Ca^{2+} はイオンクロマトグラフィー (DX-100, 日本ダイオネックス) を用い、 NO_3^- 及び SO_4^{2-} はキャピラリー電気泳動装置 (Watersクウォンタ4000, 日本ウォーターズ・リミテッド) を用いて測定した (Jones・Jandik, 1991)。 H_2PO_4^- はリン・バナド・モリブデン酸法 (中村・貝沼, 1989) によって測定した。ブドウ糖は、臨床血液検査用試薬グルコースC II テストワコー (和光純薬) を用いて測定した。

グルタミン濃度は、PICO-TAG法 (Waters PICO-TAG法) 及び桑野ら (1987) の方法を簡易化してHPLCで測定した。すなわち、試験管にエタノール0.7ml, トリエチルアミン0.1ml, チオイソシアン酸フェニル0.1mlを入れ、よく混合した後、試料 (培地) を0.1ml添加混合して20分間室温に放置した。その後、9mlの希釈液 (5%アセトニトリル-5mMリン酸ナトリウム緩衝液, リン酸でpH7.4に調整) で希釈し、0.45 μm のフィルターで濾過した試料をHPLCで分析した。カラムはWakopak WS5C18 20cm (和光純薬), 溶離液はPICO-TAG溶離液A (和光純薬) を用い、流速1.0ml/分とし、254nmの吸光度で測定して定量した。

結果

1. 培地中の無機多量成分濃度の変化

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

培養開始時の各成分の濃度を100%とした場合の濃度変化を図12に示した。30日の培養期間中に減少した成分は H_2PO_4^- 、 SO_4^{2-} 、 NH_4^+ 及び NO_3^- であり、なかでも H_2PO_4^- は特に減少が早かった。また、窒素源のうち NO_3^- は NH_4^+ より吸収が遅く、調査終了時には75%程度残存していた。 K^+ 、 Mg^{2+} 及び Ca^{2+} は減少率がごくわずかで、培養終了時には培養開始時の90~95%が残存していた。

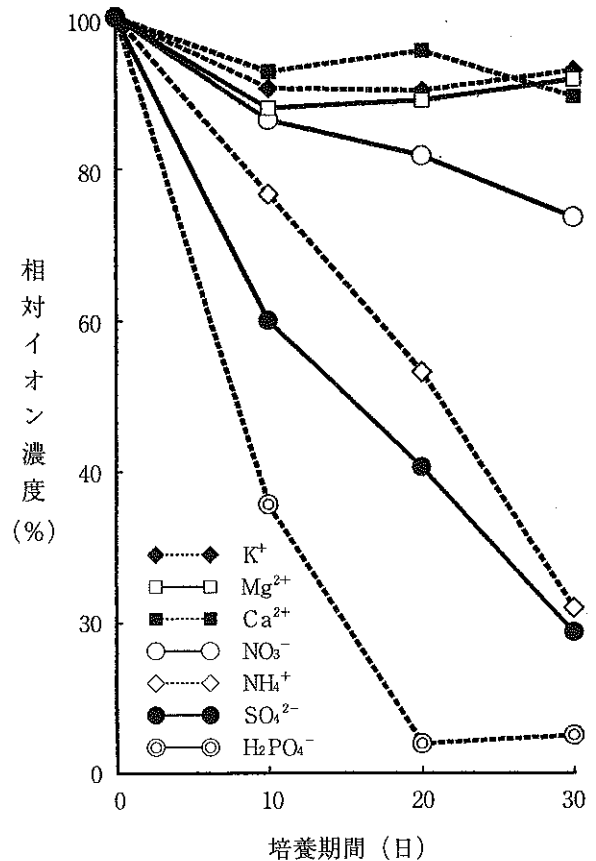


図12 ササユリ球根の液体振とう培養における培地中の無機イオン濃度の経時変化

相対イオン濃度は、培養開始時の濃度を100とした場合の相対値。

2. 窒素源と球根の生育

全窒素量を同量とし、 NH_4^+ と NO_3^- の比率をかえて培養した場合の球根重量の変化を図13に示した。球根重量の増加は、20/40mM区と10/50mM区で大きく、培養終了時には他の区に対して有意差が認められた。 NH_4^+ を含まない0/60mM区及び NH_4^+ のもっとも多い40/20mM区では他の区に比べて球根の生育は劣った。20/40mM区及び0/60mM区で培地のpHを測定したところ、オートクレーブ処理後 (培養開始時) は両区とも4.8で、培地更新時にはそれぞれ3.4と4.2まで低下していた。

培地成分の積算吸収量を表5に示した。ブドウ糖及び H_2PO_4^- の吸収量は球根重量の増加にほぼ対応し、20/40mM区及び10/50mM区で多く、他の区に対して有意差があった。窒素源のうち NO_3^- の吸収量は球根重量の増加とほぼ同様な傾向を示し、 $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ 比の影響がみられたが、 NH_4^+ の吸収量は10/50mM、20/40mM及び

30/30mM区でほとんど差がなかった。40/20mM区ではNH₄⁺及びNO₃⁻のいずれも吸収量が大幅に低下した。

図14に培養終了時の球根の状態を示した。NH₄⁺を20mM以上含む区では、1 mm程度の突起状の根がみられたが、褐変して伸長していなかった。これに対して、10/50 mM区では太い根が2～3 cmに伸びていた。0/60mM区では球根肥大は劣るものの、根が長く伸長し、フラスコ内に充満した。

NH₄⁺のかわりにGLNを添加して培養した結果を表6に示した。NH₄⁺を添加した区に比べてGLNを5mM添加した区では重量が小さく、逆にGLNを10mM添加した区では大きくなった。GLN添加区では全ての球根で根が伸長し、フラスコ内に充満した。球根重量にしめる根の割合 (RW/BW) もGLN添加区で大きかった。

液体振とう培養で約1 gに生育したものの根が伸長していない球根を窒素源の異なる培地で

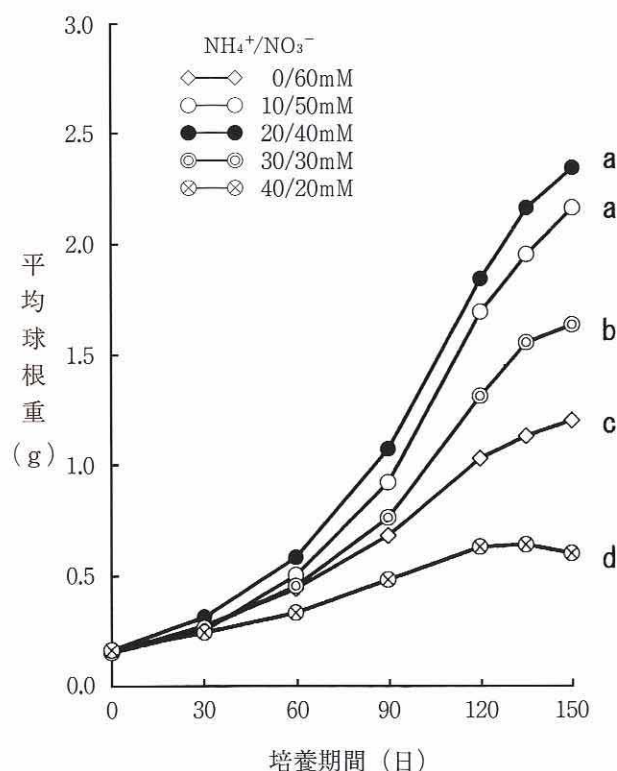


図13 ササユリ球根の液体振とう培養における培地中のNH₄⁺/NO₃⁻比の球根肥大に及ぼす影響

a - dの文字は、ダンカンの多重検定 (5%レベル)の結果を示し、同種の文字は有意差の無いことを示す。



図14 液体振とう培養における培地中の窒素成分と球根の生育状況

上：NO₃⁻60mM区(左)とNH₄⁺20mM+NO₃⁻40mM区(右)。
下：左からNO₃⁻60mM, NH₄⁺10mM+NO₃⁻50mM, NH₄⁺20mM+NO₃⁻40mM, NH₄⁺30mM+NO₃⁻30mM, NH₄⁺40mM+NO₃⁻20mM。

表5 ササユリ球根の液体振とう培養における培地中のNH₄⁺/NO₃⁻比がブドウ糖、H₂PO₄⁻、NH₄⁺及びNO₃⁻の積算吸収量に及ぼす影響

培地中窒素濃度		積算吸収量			
NH ₄ ⁺ (mM)	NO ₃ ⁻ (mM)	ブドウ糖 (g)	H ₂ PO ₄ ⁻ (mmol)	NH ₄ ⁺ (mmol)	NO ₃ ⁻ (mmol)
0	60	0.35 c ²	0.041 b	—	0.30 c
10	50	0.82 a	0.060 a	0.62 a	0.52 a
20	40	0.87 a	0.063 a	0.59 a	0.40 ab
30	30	0.64 b	0.044 b	0.60 a	0.32 bc
40	20	0.33 c	0.021 c	0.27 b	0.14 d

² ダンカンの多重検定 (5%レベル), 同種文字に有意差なし。

表6 ササユリの液体振とう培養におけるグルタミン (GLN) 添加の球根重量と根の伸長に及ぼす影響

培地中空素濃度			球根重量 (g)	根の伸長した	
GLN (mM)	NH ₄ ⁺ (mM)	NO ₃ ⁻ (mM)		球根の割合 (%)	RW ^z /BW ^y
10	0	40	1.30 a ^z	100	0.45
5	0	50	0.79 c	100	0.37
0	10	50	1.01 b	40	0.12

^z 根の重量.

^y 球根重量 (根も含む).

^x ダンカンの多重検定 (5%レベル), 同種文字に有意差なし.

表7 ササユリの液体振とう培養におけるグルタミン (GLN) 及び NH₄⁺添加の球根重量と根の伸長に及ぼす影響

培地中空素濃度			根の伸長した		
GLN (mM)	NH ₄ ⁺ (mM)	NO ₃ ⁻ (mM)	球根重量 (g)	球根の割合 (%)	RW ^z /BW ^y
10	0	40	2.32	100	0.05
0	0	60	1.94	100	0.12
0	20	40 ^x	2.11	17	0.02
NS					

^z 根の重量.

^y 球根重量 (根も含む).

^x MS培地の濃度にはほぼ等しい.

NS ダンカンの多重検定 (5%レベル) で有意差なし.

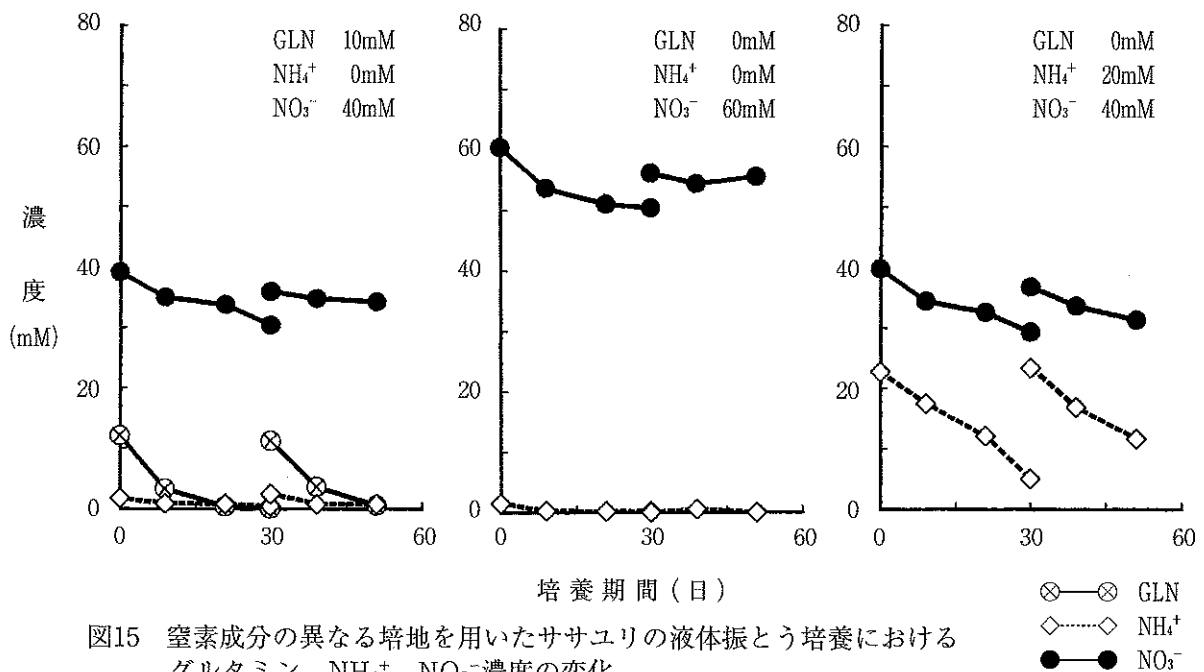


図15 窒素成分の異なる培地を用いたササユリの液体振とう培養におけるグルタミン, NH₄⁺, NO₃⁻濃度の変化

培養した結果を表7に示した。培養終了時の球根重量はいずれの区も有意差がなかったが、NH₄⁺添加区では根の伸長した球根はわずかであったのに対して、NO₃⁻のみ添加区及びGLN添加区では全ての球根で根が伸長した。

図15に培地中のGLN, NH₄⁺及びNO₃⁻の濃度変化を示した。NO₃⁻はいずれの区でも培養中に5~10mM程度の濃度低下がみられたが、培地更新時に多量に残存していた。NH₄⁺添加区においては、NH₄⁺はNO₃⁻に比べて吸収量が多く、

15~20mMの濃度低下となり、培地更新時の残存量は10mM前後であった。GLNは培養開始とともに急速に吸収され、培地更新時にはほとんどすべてが吸収された。

MS培地で前培養した発根していない球根を用い、窒素源の異なる培地で培養した後定植した場合の生育状況を表8に示した。NH₄⁺を含まない区では培養中に根が伸長した。定植時の球根重量には有意差はなく、GLN添加区及びNO₃⁻のみ添加区ではほとんど全ての球根で発根していたのに対して、標準区では発根個体は全くなかった。定植後の発芽率、抽だい率及び平均葉数は発根した球根で高かった。抽だいたした個体の葉数はいずれの区も差がなかった。

3. リン酸イオン濃度と球根の生育

H₂PO₄⁻添加量と球根重量についての結果を表9に示した。いずれの区でも球根重量に有意な差はなく、ブドウ糖、NH₄⁺、NO₃⁻及びSO₄²⁻の積算吸収量に差はなかった。しかし、H₂PO₄⁻吸収量は培地への添加濃度にほぼ比例して増加した。培地更新時に古い培地のH₂PO₄⁻濃度を測定した結果を表10に示した。標準区及び2倍区では第2回培地更新以降は、培地更新時にH₂PO₄⁻はほとんど残存していなかった。

H₂PO₄⁻を培地に追加した場合には、オートクレーブ処理後に培地が濁る現象がみられ、とくに3倍区で顕著であった。そこで、培養途中でのH₂PO₄⁻追加を検討し、その結果を表11に示し

表8 窒素成分の異なる培地で液体振とう培養を行って得られたササユリ球根²の定植後の生育

培地中窒素濃度			定植時		定植60日後				
GLN (mM)	NH ₄ ⁺ (mM)	NO ₃ ⁻ (mM)	球根重量 (g)	発根球割合 (%)	発芽 (%)	抽だい (%)	葉数/球	葉数/抽だい球	
10	0	40	4.39	90	80	60	4.0 a ^y	5.5	
0	0	60	4.79	85	95	70	4.5 a	5.6	
0	20	40 ^x	4.28	0	60	10	1.4 b	5.0	
NS								NS	

² MS培地で前培養し、約2gに肥大し根の伸長していない球根を窒素成分の異なる培地で2か月間培養。培養終了後5℃3か月間低温処理した後定植。

^y ダンカンの多重検定(5%レベル)、同種文字に有意差なし。

^x 培地組成がほぼMS培地に等しい。

NS ダンカンの多重検定(5%レベル)により有意差なし。

表9 液体振とう培養における培地のH₂PO₄⁻濃度が球根重量、培地からの養分吸収及び定植後の生育に及ぼす影響

培地中のH ₂ PO ₄ ⁻ 濃度		球根重量 (g)	培地からの吸収量				
(mM)	レベル		ブドウ糖 (g)	H ₂ PO ₄ ⁻ (mmol)	NH ₄ ⁺ (mmol)	NO ₃ ⁻ (mmol)	SO ₄ ²⁻ (mmol)
1.25	×1	2.4	0.71	0.042 c ²	0.56	0.50	0.044
2.50	×2	2.6	0.71	0.081 b	0.58	0.53	0.046
3.75	×3	2.4	0.76	0.107 a	0.57	0.53	0.046
NS		NS	NS	NS	NS	NS	NS

培地中のH ₂ PO ₄ ⁻ 濃度		培地からの吸収量		
(mM)	レベル	発芽率 (%)	抽だい率 (%)	開花率 (%)
1.25	×1	81.7	30.0	0
2.50	×2	87.1	32.3	0
3.75	×3	90.0	48.3	0

² 異なった文字はダンカンの多重検定により有意差(5%レベル)のあることを示す。

NS 有意差なし。

表10 ササユリ液体振とう培養において培養開始時の H_2PO_4^- 濃度を変更した場合の培養終了時の H_2PO_4^- 濃度

培地中の H_2PO_4^- 濃度 (mM) レベル	初代培養 (mM)	継代培養			
		1代 (mM)	2代 (mM)	3代 (mM)	4代 (mM)
1.25 × 1	0.65±0.01 ^z	0.13±0.03	0.05±0.00	0.03±0.00	0.02±0.01
2.50 × 2	1.07±0.08	0.66±0.08	0.13±0.04	0.05±0.00	0.05±0.02
3.75 × 3	2.95±0.04	1.56±0.07	0.71±0.15	0.12±0.07	0.45±0.12

^z 標準誤差.表11 ササユリの液体振とう培養における H_2PO_4^- 濃度とその施用方法が球根の生育、培地からのグルコースと H_2PO_4^- の積算吸収量及び定植後の生育に及ぼす影響

培地中の H_2PO_4^- 濃度 (mM) レベル	添加方法	球根重量 (g)	積算吸収量		定植60日後	
			H_2PO_4^- (mmol)	グルコース (g)	発芽率 (%)	抽だい (%)
1.25 × 1	一括添加	3.1	0.078 c ^z	1.06	83	10
3.75 × 3	一括添加	3.2	0.158 a	1.05	97	13
3.75 × 3	三回分割	3.5	0.123 b	1.23	93	17
		NS		NS		

^z 異なった文字はダンカンの多重検定により有意差 (5%レベル) のあることを示す。NS 有意差なし。表12 液体振とう培養における培地の SO_4^{2-} 濃度が球根の重量、培地からの養分吸収及び定植後の生育に及ぼす影響

培地中の SO_4^{2-} 濃度 (mM) レベル	球根重量 (g)	培地からの積算吸収量				
		ブドウ糖 (g)	H_2PO_4^- (mmol)	NH_4^+ (mmol)	NO_3^- (mmol)	SO_4^{2-} (mmol)
1.6 × 1	1.7	0.42 a	0.032 a	0.31 a	0.28 a	0.027
3.2 × 2	1.3	0.27 b	0.022 b	0.22 ab	0.17 b	0.031
4.8 × 3	1.0	0.22 b	0.014 b	0.18 b	0.15 b	0.034
	NS					NS

^z 異なった文字はダンカンの多重検定により有意差 (5%レベル) のあることを示す。NS 有意差なし。

た。球根重量及びブドウ糖の積算吸収量には有意差がなかったが、 H_2PO_4^- の吸収量は3倍量培養開始時一括添加区で多く、次いで3倍量三回分割添加区、標準区の順になった。培養開始時の培地のpHは、3倍量培養開始時一括添加区では5.0、標準区では4.6であり、培地更新時にはそれぞれ3.7、3.2まで低下した。また、三回分割添加区では3.8に低下した。

定植後の生育に関しては、 H_2PO_4^- 濃度の高い区で発芽率及び抽だい率が高い傾向にあった(表9,表11)。

4. 硫酸イオン濃度と球根の生育

表12に SO_4^{2-} 添加量と球根重量を示した。有意差はないものの、重量は標準区で最大で、

SO_4^{2-} 添加量の増加とともに小さくなる傾向を示した。また、ブドウ糖、 NH_4^+ 、 NO_3^- 及び H_2PO_4^- の積算吸収量は球根重量に対応しており、標準区がもっとも大きかった。一方 SO_4^{2-} の吸収量に有意差はなかった。

考 察

ササユリの液体培養における養分吸収については液体通気培養で調査されており、 H_2PO_4^- がもっとも早く吸収され、次いで NH_4^+ 、 NO_3^- 、 K^+ の順であることが示されている(河原林, 1992)。これに対して液体振とう培養においては、 H_2PO_4^- 、 SO_4^{2-} 及び NH_4^+ の吸収が多く、 K^+ 、 Mg^{2+} 及び Ca^{2+} はごくわずかであった。液体振とう培養で

は球根肥大はするものの、根及び葉の発生がほとんどみられなかったことから、核酸やタンパク質などの合成に必要な H_2PO_4^- 、 SO_4^{2-} 及び NH_4^+ は多量に吸収されたのに対し、葉に多量に含まれる K^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} （吉田，1972；山崎，1982）は吸収量が少なかったものと考えられる。

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

ストックを用いた実験では、 NH_4^+ は NO_3^- に対して相対的に低濃度で生長に促進的に働く可能性が示されている（溝添ら，1992）。ササユリ球根の液体振とう培養においても、 NH_4^+ は低濃度では球根肥大を促進し、30mM以上の高濃度になると肥大を阻害する傾向がみられ（図13）、本実験の濃度範囲ではストックの場合とほぼ同様な結果が得られた。また、培地からの NO_3^- 吸収量は NH_4^+ 吸収量に比べて培地の $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ 比の影響が大きかった（表5）。しかし、 $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ 比の異なる培地では培養中のpH低下程度に差ができることが原因となり NO_3^- 吸収量に違いが生じた可能性が考えられる。

一方、図14に示したように窒素源として NO_3^- のみを用いた場合、根の著しい伸長が観察された。また、10/50mM区では根が2~3cmに伸長した。これは、 NH_4^+ が NO_3^- よりも早く吸収されるため、10/50mM区では培養後期になると培養液中の NH_4^+ がなくなり、 NH_4^+ 無添加区とほぼ同じ条件になったためと考えられる。これに対

して、 NH_4^+ 濃度が20mM以上の区では根の伸長は全くみられなかった。Ichihashi（1977，1978，1979a，1979b）はシランの実生について $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ 比が生育に大きな影響を及ぼすことを示し、その値が1以下の時生育が良好で、 NH_4^+ 濃度が低いときに根の生育がまさを明らかにしており、本実験とほぼ同様な結果が得られている。

細胞内に取り込まれた NO_3^- は NO_2^- 、 NH_4^+ 、GLNと変化して利用されることが知られている（榊原ら，1992）。そこで、窒素源として NH_4^+ のかわりにGLNを与えて培養したところ、 NO_3^- のみを窒素源として培養した場合と同様に根が伸長した（表6）。また、約1gになるまでMS培地で根を伸長させずに液体振とう培養し、その後 NH_4^+ をGLNに置き換えた培地で培養した場合にも根の伸長がみられた（表7）。これらの実験から NH_4^+ が根の発生あるいは伸長の阻害に関与していることが示唆される。また、高濃度の NH_4^+ を含むために根の伸長が見られない区の球根でも1mm程度の突起状の褐変した根が観察されることから、 NH_4^+ は根の発生よりもむしろ伸長を阻害しているものと考えられる。

さらに、根の伸長した球根は定植後の生育が良好になることが明らかとなった（表8）。液体振とう培養を行なう場合、根が伸長すると移植などの操作が煩雑になるので、培養中に発根させずに球根を肥大させた後、 NH_4^+ を含まない培地あるいは NH_4^+ をGLNに置き換えた培地で培養して根の伸長を促すことは、液体振とう培養による球根肥大促進法の実用化のために有効な手段になるものと考えられる。

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

H_2PO_4^- 濃度をかえた場合には球根重量、ブドウ糖、 NH_4^+ 、 NO_3^- 及び SO_4^{2-} の吸収量にほとんど差がないのに対して、 H_2PO_4^- の吸収量は、少ないものでは1球当たり約 $40\mu\text{mol}$ 、多いものでは約 $100\mu\text{mol}$ となり、微量であるが大きな違いが見られた。また、 H_2PO_4^- を培養中に追加した場合にも、 H_2PO_4^- 吸収量が増加したが、球根重量には差はなかった。ニンジン幼植物の培養においては、 H_2PO_4^- が培養後期に激減するため、 H_2PO_4^- の添加によって草丈の伸長速度と乾物重が増加したことが示されている (Tsujiら, 1993)。ササユリにおいても、 H_2PO_4^- の添加あるいは培養中に追加することにより H_2PO_4^- 濃度を高く維持した場合、定植後の生育が良好になる傾向がみられた。したがって、球根内に蓄積された H_2PO_4^- が定植後の生育に対してなんらかの影響を与えたものと考えられる。なお、培養液中の H_2PO_4^- 濃度をMS培地の3倍にした場合、オートクレーブにかけた後に培地が濁る現象がみられたが、この影響については今後検討する必要がある。

高濃度の SO_4^{2-} は、球根の重量増加及び養分吸収を抑える傾向がみられた (表12)。 Na_2SO_4 の添加量は最高 3.2mM でMS培地の全塩類濃度に比べてごくわずかであり、浸透ポテンシャルの低下が球根肥大に影響したとは考え難い。また、 $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ 比あるいは H_2PO_4^- 濃度に関する実験において、培地中の Na^+ 濃度の増加 ($2.5\sim 20\text{mM}$)による養分吸収の低下は見られていないことから、添加した Na_2SO_4 の濃度範囲では Na^+ による影響も考えにくい。しかし、 Na_2SO_4 添加の影響は、 NH_4^+ に比べて H_2PO_4^- と NO_3^- に対して大きい傾向が見られることから、 SO_4^{2-} による拮抗的吸収阻害が発生している可能性も考えられ、今後さらに検討する必要がある。

MS培地は他の培地に比べて塩類濃度が高く、窒素成分のうち NH_4^+ の比率が高い (庄野, 1972)。本実験では NH_4^+ と NO_3^- が $20/40\text{mM}$ の時に球根肥大がよいことを示したが、これはMS培地における窒素成分の比率とほぼ等しい。しかし、培養中に H_2PO_4^- が急速に減少することが明らかになったので、ササユリの球根肥大用の培地は、MS培地に $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ を 2.5mM 添加したものを用いるかあるいは培養中に分割して添加す

るとよいものと考えられる。さらに、肥大した球根は、発根促進用培地、すなわちMS培地の NH_4NO_3 を 40mM NaNO_3 に置き換えた培地に移植することによって、定植後に生育良好な球根を得ることができるものと考えられる。

第5節 培養中の光条件が球根肥大及び養分吸収に及ぼす影響

ササユリの液体通気培養において、照明はりん片に形成された子球からの葉の伸長や発根を促進するものの球根肥大に対しては促進効果を示さないことが明らかにされている (河原林, 1993a)。固形培地を用いた場合の照明の影響については、定植後の球根腐敗が減少すること (Niimi, 1995) や球根肥大に対し促進的に働くこと (浅尾ら, 1992; 市川, 1993) が報告されている。一方、福井ら (1990) は固形培地を用いて、明条件で形成された小球を暗黒条件に移すことによって球根肥大が促進されることを示している。

このように、既存の報告からは、培養球の大きさや培養条件によって照明の球根肥大に対する効果に差のあることが示されている。そこで、液体振とう培養における照明が、小球根の培地からの養分吸収及び球根肥大に及ぼす影響を明らかにするため、照明条件下での糖及び無機イオンの吸収と球根肥大との関係について検討した。

材料及び方法

第1節で述べた方法で増殖したササユリ 'T2-11B' のりん片を用い、明条件下のMS培地で培養して得られた小球 (生体重 $0.3\sim 0.4\text{g}$) を用いた。150mlの液体培地を入れた300ml容三角フラスコに小球を10個ずつ入れ、直径10mmの除菌フィルター付きシート (サンキャップシート, 岩城硝子) でふたをして振とう培養 (巡回式100rpm) を行った。培養条件は、 20°C 暗黒条件及び明条件とした。照明は、白色蛍光灯を用いて $40\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ($3,000\text{lx}$) で1日12時間行った。

培地組成は表13に示した。第4節と同様に、供試小球を種類と濃度の異なる糖を添加した球

表13 実験に用いた培地成分

多量要素 ²	球根肥大用培地	根伸長用培地
	(BEM) (mg · l ⁻¹)	(REM) (mg · l ⁻¹)
NH ₄ NO ₃	1650	
KNO ₃	1900	190
NaNO ₃		3400
KH ₂ PO ₄	170	170
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	390	390
CaCl ₂ · 2H ₂ O	440	440
MgSO ₄ · 7H ₂ O	370	370

² 微量元素, ビタミン類はMS培地のものを利用.

根肥大用培地 (BEM) を用いて培養後, 根伸長用培地 (REM) で培養し, 根の伸長を促した. すなわち, 球根肥大用培地には3%ブドウ糖, 3%ショ糖または6%ショ糖を添加し, 1N NaOH でpH5.8に調整したものをを用いた. 培地の更新は, 30日毎に3回行い, 合計120日間培養を続けた. 根伸長用培地には球根肥大用培地と同様に糖を添加し, pH調整を行った. この培地の更新は15日間隔で行い, 合計45日間培養を続けた. 実験はフラスコを各区3個ずつ用いて行った.

培地更新時と全培養期間終了時に球根重量 (生体重) を測定し, 各継代培養の前後に培地量及び果糖, ブドウ糖, ショ糖, NO₃⁻, H₂PO₄⁻, NH₄⁺, K⁺, Mg²⁺, Ca²⁺の濃度を測定した. さらに, それらの値から各継代培養中の培地からの養分吸収量を算出し, 全培養期間の積算吸収量を計算した.

糖濃度の測定は, Wakosil 5NH2 4.0φ × 200mm カラム (和光純薬) を用い, HPLC (日本ウォーターズ・リミテッド) で行った. アセトニトリル:水=75:25 (V/V) を溶離液とし, カラム温度は40℃, 流速は1.0ml/分として, 示差屈折計で測定した. NO₃⁻の測定はHPLC (LCモジュール1, 日本ウォーターズ・リミテッド) を利用した. カラムはIC-Pak Anion (日本ウォーターズ・リミテッド) を, 溶離液はカラム取扱説明書に従って Borate/Gluconate 溶離液を用い, 214nmで吸光度を測定して定量した. H₂PO₄⁻はリン・バナド・モリブデン酸法 (中村・貝沼, 1989) によって測定した. NH₄⁺, K⁺, Mg²⁺およびCa²⁺の定量はイオンクロマトグラフィー (DX-100, 日本ダイオネックス) を用いた.

また, 培養終了時に培養球の一部を各フラスコから取り出し, 120℃で重量変化がなくなるまで加熱した後乾物重 (DW) を測定し, 生体重 (FW) に対する割合 (DW/FW) を求めた.

さらに, 明条件の液体振とう培養によって約3gに肥大させた球根を植物培養用フラスコに移植し, 2.5及び3.5か月間5℃で低温処理した後, バーミキュライトを入れた育苗箱に定植してその後の生育を調査した. 定植は4月中旬及び5月中旬に行い, MS培地の無機塩類を10倍に希釈して10日に1度の割合で施用した. 定植2か月後に発芽率, 抽だい率, 葉数及び草丈を調査した.

結果

培養開始120日後の球根肥大用培地から根伸長用培地に移植する時点における球根の一部を図16に示した. 培養開始時には赤紫色をおびた緑色であった小球は, 明条件で培養した場合には, 培養中に発生したりん片がしだいに緑色を呈するようになった. さらに, 培養終了時には, 全体が濃緑色になる球根と, 全体が濃赤紫色で一部が緑色を呈する球根がみられた. これに対し暗黒条件では, 培養開始後に新たに発生したりん片はすべて黄白色で, 培養終了時にはわずかに赤紫色をおびた球根になった. また, 根伸長用培地 (REM) に培地を変更した後は, 明条件では球根の緑色がさらに濃くなり, 明条件, 暗黒条件ともに根が伸長した.



図16 ササユリの液体振とう培養における光条件と球根肥大
上: 暗黒条件.
下: 明条件 (3000lx, 1日12時間照明).

図17に明条件及び暗黒条件で培養した場合の球根重量(生体重)の経時変化を示した。球根の肥大は、球根肥大用培地及び根伸長用培地のいずれの培地を用いた場合も暗黒条件に比べて明条件が良好であった。球根重量が最も大きかったのは、明条件3%ブドウ糖添加区であり、培養全期間の終了時には生体重が約5.3gとなった。ついで明条件6%ショ糖添加区、明条件3%ショ糖添加区、暗黒条件3%ブドウ糖添加区の順となり、いずれも有意差が認められた。暗黒条件での3%あるいは6%ショ糖添加区は他の区に比べて球根肥大が劣った。これらのショ糖及びブドウ糖添加区におけるDW/FWの値は、いずれの区も0.25前後で、糖の種類と濃度による差異はほとんどなかった(図18)。

培地からの糖の積算吸収量の経時変化を図19に示した。ショ糖添加区では、培地の糖濃度を測定した結果、培地中のショ糖の一部が培地更新前にブドウ糖と果糖に分解されていることが

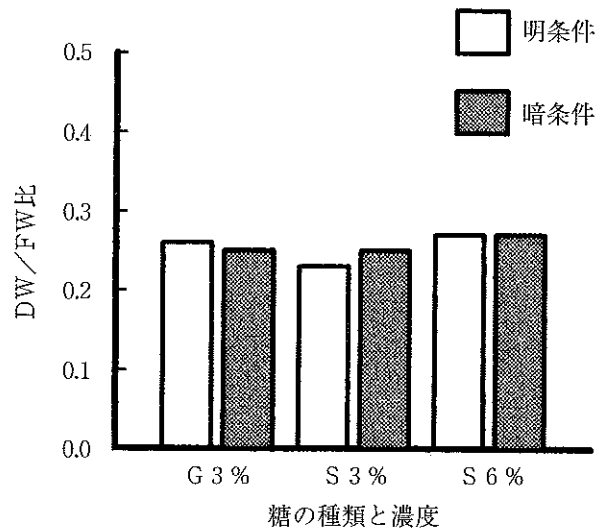


図18 ササユリの液体振とう培養における光条件、培地に添加する糖の種類、濃度が球根の乾物重と生体重の比(DW/FW)に及ぼす影響

G:ブドウ糖添加, S:ショ糖添加。

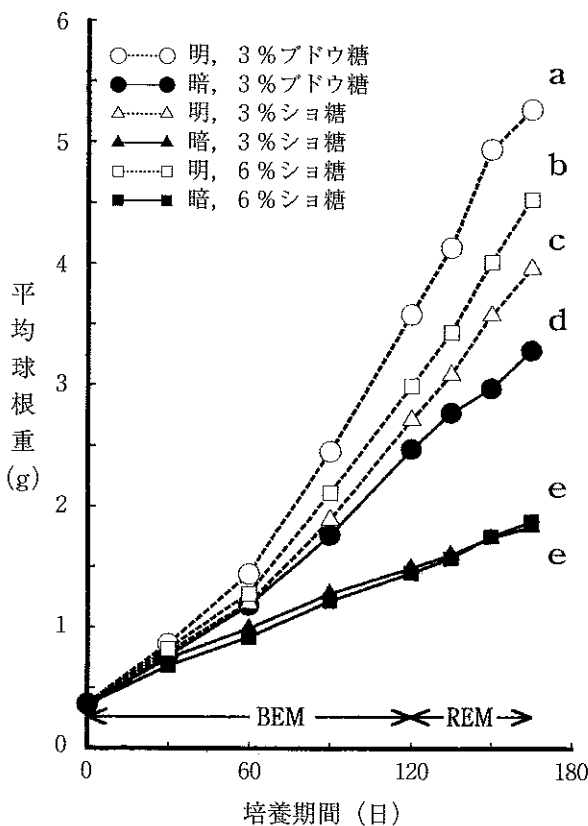


図17 ササユリの液体振とう培養における光条件、培地中に添加する糖の種類、濃度と球根肥大

a-eの文字は、ダンカンの多重検定(5%レベル)の結果を示し、同種の文字は有意差のないことを示す。

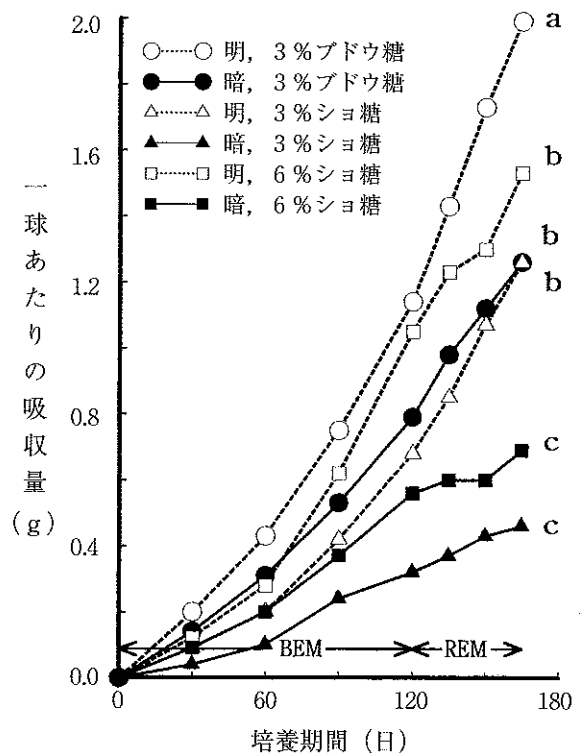


図19 ササユリの液体振とう培養における光条件、培地に添加する糖の種類、濃度と培地からの糖の積算吸収量の経時変化

図中のa-cの文字は、ダンカンの多重検定(5%レベル)の結果を示し、同種の文字は有意差のないことを示す。

BEM:球根肥大用培地使用, REM:根伸長用培地使用。

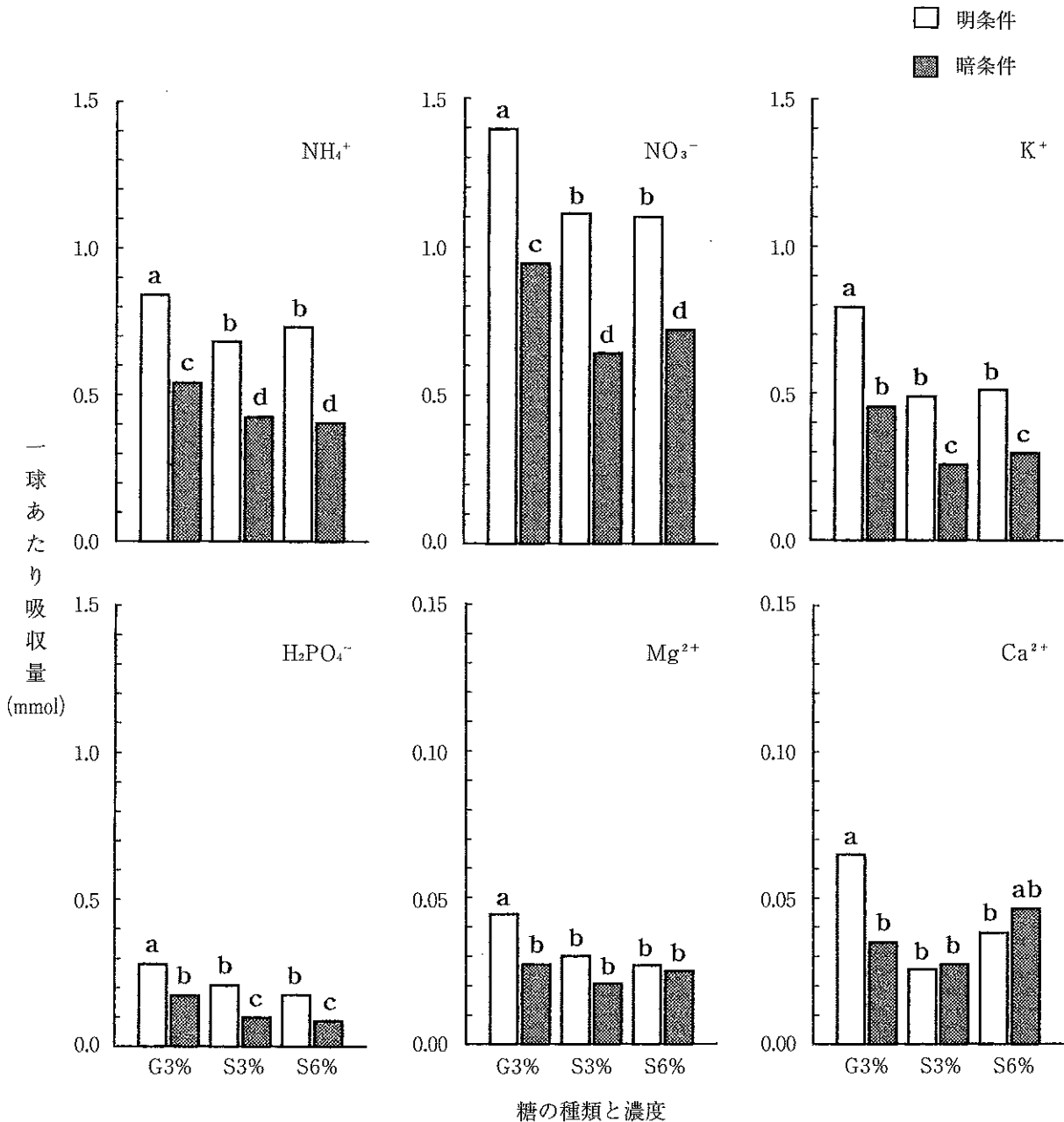


図20 ササユリの液体振とう培養における光条件，培地に添加する糖の種類，濃度が培地からの無機イオンの積算吸収量に及ぼす影響

a - cの文字は，ダンカンの多重検定（5%レベル）の結果を示し，同種の文字は有意差のないことを示す。

G：ブドウ糖添加，S：ショ糖添加。

明らかとなったので，ブドウ糖，果糖及びショ糖の合計値に基づいて糖の吸収量を算出した。糖の吸収量は，添加した糖の種類と濃度が同じ場合には，暗黒条件に比べて明条件で吸収量が多く，有意差が認められた。同一光条件下での糖の吸収量は，3%または6%ショ糖添加区に比べて3%ブドウ糖添加区が多かった。

全培養期間におけるNH₄⁺，NO₃⁻，H₂PO₄⁻，

K⁺，Mg²⁺及びCa²⁺の積算吸収量を図20に示した。NH₄⁺，NO₃⁻，H₂PO₄⁻及びK⁺の吸収量は，添加した糖の種類と濃度が同じ場合には暗黒条件に比べて明条件で多かった。また，同一光条件下では，3%ブドウ糖添加区の吸収量が最も多かった。Mg²⁺も他の無機イオンと同様に，明条件3%ブドウ糖添加区での吸収量が最も多く，他の区に比べて有意差が認められたが，他の培

養条件ではその差はわずかであった。これに対し、 Ca^{2+} の吸収量は、ブドウ糖3%添加区では明条件が有意に高かった。しかし、3%及び6%シヨ糖添加区では有意差はなく、暗黒条件がやや高い傾向が見られた。

明条件の液体振とう培養によって得られた球根の定植後の生育状況を図21に、生育調査の結果を表14に示した。発芽率は、2.5か月低温処理区に比べて3.5か月低温処理区ではやや低かったが、いずれも80%以上で実用上問題のない高い値となった。

抽だい率、平均葉数は3.5か月低温処理区が2.5か月低温処理区に比べて高い値を示し、低温処理の効果が認められた。草丈は、2.5か月低温処理区が高かった。また、この実験とは別に3,000lx 12時間照明12時間暗黒条件下で培養した約3gの球根を3か月間0℃で低温処理し、11月に定植して翌々年の6月に開花したものを図22に示した。これらの球根は、定植翌年には約半数で抽だいたしたが、開花したものはなかった。そして、定植後2作目の6月には、図22に示したように開花個体が見られた。



図21 明条件の液体振とう培養によって培養した球根の定植後の生育状況 (3.5か月間低温処理)。

考 察

浅尾ら(1992)は、約90mgのササユリ小球を用い、明条件及び暗黒条件下の固形培地で培養を行い、球根の肥大状況を比較した。その結果、培養100日目(球根重量0.8g程度)までは光条件による大きな差異はなかったが、その後50日間の培養で明条件下の球根が急速に肥大し、暗黒条件下の球根に比べ約1.5倍の1.4g程度に肥大したと述べている。これに対し、河原林(1993a)はりん片を用いて液体通気培養を行い、8週間の培養期間で球径が約2mmの小球が得られたものの、照明による球根の肥大促進効果は認めていない。液体振とう培養を用いた本実験では、培養中に照明を行うことによって、暗黒条件に比べて球根肥大が顕著に促進された。

本実験では、培養30日目(球根重量0.6~0.8g)までは球根重量に対する光条件の影響は明らかでなかった。しかし、その後60日間の培養で、最も球根肥大の良好な3%ブドウ糖添加区では、



図22 定植2年後の開花個体

表14 明条件で培養した球根の定植後の生育

低温処理 期間	供試数	定植前 球根重量 (g)	発芽率 (%)	抽だい率 (%)	発芽個体 平均葉数	抽だい個体 平均草丈 (cm)
2.5か月	65	2.9±0.1 ^z	96.9	27.7	3.6±0.2	19.1±1.2
3.5か月	66	2.8±0.1	87.9	45.5	4.6±0.2	16.1±0.4

^z 標準誤差。

明条件で2.5g, 暗黒条件で1.7gとなり, 明条件区の重量が暗黒条件の約1.5倍になった. これは, 固形培地での報告(浅尾ら, 1992)とほぼ同様な傾向といえるが, 球根肥大の速度は固形培地に比べて液体振とう培養が優れていた. また, 固形培地(浅尾ら, 1992), 液体通気培養(河原林, 1993)及び本実験の液体振とう培養の結果から, 照明の球根肥大に対する影響は, 球根重量が0.8g程度以下の球根では小さく, それ以上の球根では大きいことが示唆された.

明条件で培養した球根は緑色になるのに対し暗黒条件では黄白色であることから, 明条件で球根肥大が促進される原因として, 光合成による養分の蓄積が考えられる. そこで, 同じ種類の糖で明条件と暗黒条件における培養終了時の生体重の比(明条件での生体重/暗黒条件での生体重)と糖吸収量の比(明条件での吸収量/暗黒条件での吸収量)を計算した結果, 3%ブドウ糖添加区ではそれぞれ1.6と1.6, 3%ショ糖添加区ではそれぞれ2.2と2.7, 6%ショ糖添加区ではそれぞれ2.4と2.2でありほぼ等しかった. このことは, 培地からの糖の吸収は球根重量の増加にほぼ比例することを示している. さらに, DW/FW値は明条件と暗黒条件ではほぼ等しいことから, 明条件での球根重量の増加は水分吸収量の増加によるものではないことが明らかである. 仮に明条件での球根肥大促進の原因に対して光合成による寄与が大きいとすれば, 光合成によって得られた糖が球根に蓄積して球根重量を増加させることになるので, 明条件と暗黒条件における生体重の比は糖吸収量の比に比べて大きくなると考えられる. しかし, 本実験で明条件と暗黒条件における生体重の比と糖吸収量の比がほぼ等しかったことから, 球根重量の増加に対する光合成の寄与はわずかであったと推定される.

また, 培養小植物体の純光合成速度の上昇には, $100\sim 200\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 以上の比較的強い照明が必要であるといわれている(北宅ら, 1995). 本実験の照明は $40\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ で行ったが, これは培養容器表面での測定値であり, フラスコ全体を透過した光をフラスコの下で測定したところ $27\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ であった. したがって, 培地中の球根表面の照度は $40\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$

よりさらに低い照度であったと推定され, 光合成速度を上昇させるには照度が不足していると考えられる. さらに, 培養終了時の球根は, 明条件で培養した場合緑色になっていたものの, 本実験では液体培地中に浸っており, 照明により球根肥大が促進されたのは, 光合成産物の蓄積の結果ではなく, 培地からの糖の吸収が促進されたことが主要因と考えられる.

ハウレンソウの細胞懸濁培養あるいはタバコのカルス培養において, 照明により細胞内のデンプンの蓄積量が増加することが知られており(Hughes, 1981), 本実験と同様に照明によって培地からの糖の吸収が促進されることが示唆される. また, 林ら(1993)はバレイシヨの継代培養された小植物体で, Moriniら(1990)はスモモ及びモモ×アーモンドの茎頂を用いて明暗周期が生育に影響を及ぼすことを指摘し, その原因として培養容器内の二酸化炭素濃度の差, フィトクローム活性, 内生ホルモンバランスあるいは酵素活性の変化などをあげている. 本実験でも, 照明がフィトクロームを介して糖の吸収やデンプン合成に関与する酵素の活性を上昇させ, 糖吸収量の増加につながった可能性が考えられる. また, Miyajima(1994)はコマツナの水耕栽培における葉中の糖濃度は, 培養液の濃度が高い場合に低濃度と比べて低くなることを述べている. この原因として, 高培養液濃度では窒素成分の吸収量が多くなり, それがアミノ酸に変化する過程でその原料となる糖の要求量が増加することをあげている. 本実験では, 照明条件下で NH_4^+ 及び NO_3^- の吸収が促進されており, それにともなって糖の要求量が増加し, 培地からの糖の吸収量も増加した可能性も考えられる. さらに, 圃場の作物では糖の供給量は光合成能力に依存するため, 窒素成分の吸収量が増加し糖の消費が増えると貯蔵される糖の量が減少することが示されている(Miyajima, 1994). これに対し, 本実験では培地中に糖が十分供給されており, 窒素成分吸収増加による球根の生育促進によって, 細胞を構成する各種成分や貯蔵用デンプンの合成のために糖の吸収量がさらに増加した可能性も考えられる. 今後, 照明が培地からの糖の吸収を促進する機作について詳細に検討する必要がある.

本実験で調査した無機イオンの中では、 NH_4^+ 、 NO_3^- 、 H_2PO_4^- 及び K^+ の吸収量が球根重量あるいは糖の吸収量とほぼ同様に、照明により有意に促進され、 Mg^{2+} でも有意な差はなかったものの促進される傾向が認められた。これに対し、 Ca^{2+} の吸収量は他の無機イオンと異なり、照明による吸収促進効果に一定の傾向は認められなかった。川岸・三浦 (1996) は食用ユリの生育期間における各器官の無機成分含量を調査し、球根中に窒素、リン、カリが多く蓄積されるのに対し、葉や茎にはマグネシウムとカルシウムが多く蓄積されることを示している。特にカルシウムは地下部に植物体全量の4~6%が含まれ、その割合は他の部分に比べて小さいことが示されている。本実験で球根肥大の促進された明条件において吸収量が増加した成分は、食用ユリの栽培中の球根における各成分の蓄積状況 (川岸・三浦, 1996) とほぼ対応した結果となり、球根に多く蓄積される成分は照明によって吸収が促進される傾向が認められた。

植物の窒素代謝に重要な働きを有する亜硝酸還元酵素とグルタミン合成酵素は葉緑体に存在し、亜硝酸を還元する作用は照明により誘導されることが知られている (Mohr・Schopfer, 1995)。ササユリ球根の液体振とう培養において NH_4^+ と NO_3^- の吸収が促進されたのは、照明が窒素代謝に関与する酵素の活性上昇を促したためと考えられる。しかし、他の成分については、照明がフィトクロームを介して直接吸収促進につながったのか、あるいは NH_4^+ 、 NO_3^- 及び糖の吸収促進による植物体の生育促進の結果として間接的に吸収が促進されたのか明らかではなく、今後検討する必要がある。

浅尾 (1992) とNiimi (1995) は、明条件で培養した球根は暗黒条件で培養したものに比べて定植後に茎の伸長する割合が低いことを指摘しており、本実験で得られた結果を直ちに実用化することは難しいものと考えられる。しかし、明条件で液体振とう培養した球根を用いて低温処理を行った本実験では、低温処理期間を長くすることにより抽だい率が向上することが明らかとなった。このことから、明条件で培養した場合の抽だい率低下は、低温処理期間を検討することにより回避できる可能性が示唆される。

また、本実験では $3,000\text{lx}$ ($40\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) 程度の照明により球根肥大が顕著に促進され、0.3~0.4gの小球を半年間に暗黒条件の場合の1.5倍の約5gに肥大させることが可能となり、このような球根は図3の球根重量と球根直径の関係式から球径約28mm、球周約9cmと推定される。水口・大川 (1995) は、培養球を3~4年間養成して球周が約10cmになると90%の球根が開花したと述べている。また、浅尾ら (1994) は、1年間の球根養成後5g以上の球根では開花率が75%以上になることを示している。液体振とう培養で得られた球根でも図22に示したように定植2年後に一部が開花が確認された。また、本実験の照明下の液体振とう培養で得られた球根は、低温処理を十分に行うことによって図21及び表14に示したように定植後約半数が抽だいている。以上の結果から、本実験の明条件で培養した球根の定植後の生育を順調に進めることができれば、植え付け後1~2年の短期間で開花が期待できるものと考えられる。

第三章 数種のユリ及び自生ササユリのPCR-RFLP/RAPD分析

第1節 数種のユリのPCR-RFLP分析

ユリの分類では、Comberの分類 (1949) が、交雑結果や雑種稔性の観察結果から妥当な分類法と考えられている (浅野, 1987)。このほかに、多数の形質にもとずいた数量分類法 (Asano, 1986) や染色体のギムザ染色によって観察されるGバンドによる分類 (Smythら, 1989) も行われている。

近年、ランダムプライマーあるいはセミランダムプライマーを用いたRAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) 分析により、ユリの野生種、品種、個体の識別が行われている (Yamagishi, 1995)。RAPD分析は操作が簡便なことから、アザレア (Kobayashiら, 1995)、ウメ (Shimadaら, 1994)、レモン (Dengら, 1995)、オリーブ (Fabbriら, 1995)、ワサビ (杉山ら, 1995) などの栄養繁殖性作物の品種識別で多く利用されている。また、PCR (Polymerase Chain Reaction) 産物を制限酵素で切断して断片長を比較するPCR-RFLP (PCR-based Restriction Fragment

Length Polymorphism) 法を用いて、コニファーの分類 (Tsumuraら, 1995), パラの種間交雑種の識別と親の推定 (武内ら, 1995a, 1995b), カキの分類 (Yonemoriら, 1996) あるいはイネの生殖質の分類 (Ghareyazieら, 1995) などが行われている。

そこで, ササユリが含まれる *Lilium* 属の *Archelirion* 節 (Comber, 1949) を中心として他の節のユリを含めて9種類のユリと1種類の種間交雑種 (シンテツポウユリ) について, PCR-RFLPを利用して遺伝的類似性を比較した。

材料及び方法

1. 供試材料とDNA抽出

ササユリ (*L. japonicum*), ヒメサユリ (*L. rubellum*), タモトユリ (*L. nobilissimum*), カノコユリ (*L. speciosum*), ヤマユリ (*L. auratum*), サクユリ (*L. auratum* var. *platyphyllum*), キカノコユリ (*L. henryi*), チョウセンヒメユリ (*L. concolor* var. *pulchellum*), コオニユリ (*L. leichtlinii* var. *maximowiczii*), 及びシンテツ

ポウユリ (*L. × formolongi*) の9種と1種間交雑種を用いて実験を行った。それぞれの若い葉約50mgから全DNAをDNA抽出用キット ISOPLANT (ニッポンジーン) によって抽出し, PCRのテンプレートとした。抽出したDNAはTEバッファー (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA) に溶解し, 利用するまで-30℃で保存した。DNA濃度は260nmのUV吸収により測定したところ, 約100ng・l⁻¹であった。

PCR用のプライマーは, GENETYX-MAC (ver.7.0) と GENETYX-MAC/CD (ver.29.0.0) のソフトウェアパッケージ (SOFTWARE DEVELOPMENT Co., Ltd.) を用いて, データベースGenBankから検索したユリの ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase large subunit (rbcL) 遺伝子とイネの核のrRNA遺伝子の塩基配列から設計した。プライマーの塩基配列を表15に, 遺伝子内でのプライマーの位置関係を示す模式図を図23に示した。

PCR反応液は, PCR用10×Bufferを10μl, Taq DNA polymerase (Biotech International)

表15 PCRに用いたプライマーの塩基配列

プライマーNo.	対象遺伝子	塩基配列
(葉緑体)		
SH018	rbcL	5'-ACTGGTACATGGACAACACTGT-3'
SH019	rbcL	5'-GGTAAAATCAAGTCCACCGCG-3'
SH020	rbcL	5'-CGCGGTGGACTTGATTTTACC-3'
SH021	rbcL	5'-GGCATATGCCAAACATGAATACC-3'
(核)		
SH013	rRNA	5'-ACACACCGCCCGTCGCTCCTA-3'
SH015	rRNA	5'-ACTCGATGGTTCACGGGATTCTG-3'

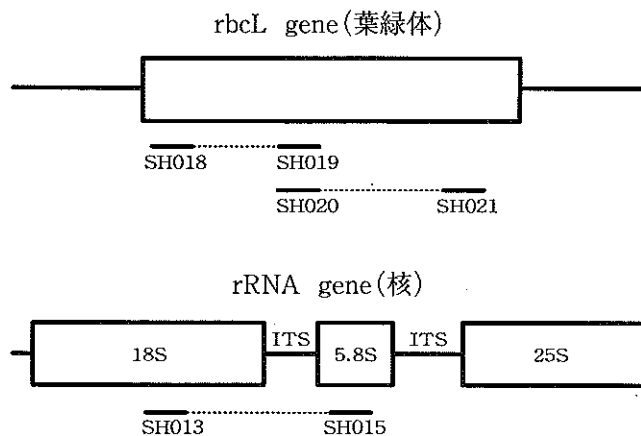


図23 プライマーの位置を示す様式図

を2unit, テンプレートDNAを $2\mu\text{l}$, 25mM MgCl_2 を $10\mu\text{l}$, 各25mM dNTP溶液を $0.4\mu\text{l}$, 2種類の $100\mu\text{M}$ プライマーをそれぞれ $1\mu\text{l}$ 混合し, 最終容量 $100\mu\text{l}$ になるようにした. さらに, ミネラルオイルを2滴反応液上にたらし, 反応液の蒸発を防いだ. 反応液はサーマルサイクラーにかけ, 94°C 1分間の変成処理を行った後, 94°C 1分- 55°C 1分- 72°C 2分の反応を35サイクル行い, 最後に 72°C に3分間保った. PCR処理後の反応液は, ミネラルオイルを除いて新しいチューブに移し, $100\mu\text{l}$ のクロロホルムを入れて約5秒間ボルテックスにかけ, 約 $10,000\times g$ で5分間遠心分離を行った. その後, DNAを含んだ水層部分を取り, 3M酢酸ナトリウム $10\mu\text{l}$ とエタノール $200\mu\text{l}$ を添加して沈殿したDNAを $10,000\times g$ で15分間の遠心分離によって回収し, さらに, 70%エタノールで洗った後乾燥させた. 得られたDNAは, 蒸留水に溶かしてRFLP分析を行った. 以上一連の実験は, 2回以上繰り返して行った.

2. PCR産物の制限酵素処理とその消化産物の検出

PCR産物は, 各制限酵素の使用説明書にしたがって4時間の制限酵素処理を行った. 利用した制限酵素は, *Cfo* I (GC↓GC), *Msp* I (C↓CGG), *Rsa* I (GT↓AC), *Hae* III (GG↓CC), *Mvn* I (CG↓CG), *Hin* d II (GTPy↓PuAC), *Alu* I (AG↓CT), *Hin* f I (G↓ANTC), *Sau* 3A I (↓GATC), *Sau* 96 I (G↓GNCC), *Sma* I (CCC↓GGG), *Ban* I (G↓G(T/C)(A/G)CC), *Scr* F I (CC↓NGG), *Taq* I (T↓CGA), *Hsp* 92 II (CATG↓), *Dde* I (C↓TNAG), *Tru* 9 I (T↓TAA), *Sty* I (C↓C(A/T)(T/A)GG), *Bsp*1286 I (G(G/A/T)GC(C/A/T)↓C), *Eco* R I (G↓AATTC) (Promega Co., Ltd. または Boehringer Mannheim Co., Ltd.) の20種類とした. また, $100\mu\text{l}$ のPCR反応液から回収したDNAの1/2に対して制限酵素を5~10 unitを用いた.

処理後の反応液は, 3.0% Nusieve GTG アガロース (FMC Bio Products) を用いて $0.5\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ のエチジウムブロマイドを含んだ TAE バッファー (40mM Tris-acetate pH8.0, 1mM EDTA) による電気泳動で分離し, UVランプによってバン

ドを検出した.

3. クラスタ分析

rRNA遺伝子を用いたPCR-RFLPで得られた多型をもとにしてクラスタ分析 (Romesburg, 1989) を行った. 得られたデータは, バンドの有無を+及び-で表し, 単純見合い係数 (Simple Matching Coefficient) を類似度係数として, 類似マトリックスを作成した. さらにこれをもとにして, UPGMA法 (Unweighted Pair-group Method Using Arithmetic Averages) を用いて樹形図を作成し, コーフェン相関係数 (Cophenetic Correlation Coefficient) を計算した.

結果

2組のプライマーを用いてrbcL遺伝子内部を増幅した場合には, 全ての供試個体で明瞭な一本のバンドが得られ多型は観察されなかった. SH018とSH019のプライマー対で得られたバンドは約400bpのサイズで, SH020とSH021のプライマー対では約570bpのサイズであった. SH020とSH021のプライマー対で得られた産物を制限酵素 *Alu* I, *Cfo* I 及び *Bsp* 1286 I で処理した場合に現れたバンドのうち6バンドで多型が見られた. rbcL遺伝子を用いたPCR-RFLP分析の一例を図24左に示し, その結果は表16に示した. この結果から, 供試した9種と1種間交雑種のユリはグループI (ササユリ, タモトユリ, カノコユリ, サクユリ), グループII (ヒメサユリ, ヤマユリ), グループIII (キカノコユリ, チョウセンヒメユリ, コオニユリ, シンテッポウユリ) の3グループに分けられた.

SH013とSH015のプライマー対でrRNA遺伝子内部を増幅した場合には, 全ての供試個体で約520bpのサイズの一本のバンドが得られ, 多型は示さなかった. そこで, 制限酵素処理をしたところ, 処理をした20種類の酵素のうち13種類で多型バンドが観察された. rRNA遺伝子を用いたPCR-RFLP分析の一例を図24右に示し, その結果を表17に示した. また, 表17から類似度係数 (単純見合い係数) を計算し, 表18に類似マトリックスを示した. 類似度係数が最も小さいのは, ヒメサユリとシンテッポウユリの間の類

似度係数で0.071であった。これに対して、ササユリとヤマユリ、あるいはカノコユリとタモトユリは類似度係数が1.000で、rRNA遺伝子を用いたPCR-RFLPでは区別できなかった。

核のrRNA遺伝子のPCR-RFLP分析結果をUPGMAクラスター分析することによって得られた樹形図を図25に示した。コーフェン相関係数は0.940で十分に大きく、類似マトリクスと樹形図との間のクラスター化法によるゆがみは十分に小さいことを示している。供試したユリ

は、類似度係数0.8レベルでグループI（タモトユリ、カノコユリ、ササユリ、ヤマユリ、サクユリ、ヒメサユリ）、グループII（キカノコユリ）、グループIII（チョウセンヒメユリ、コオニユリ）及びグループIV（シンテッポウユリ）の4グループに分けられた。さらに、グループIは0.9レベルでサブグループI（カノコユリ、タモトユリ）とサブグループII（ササユリ、ヤマユリ、サクユリ、ヒメサユリ）の2つに分けられた。

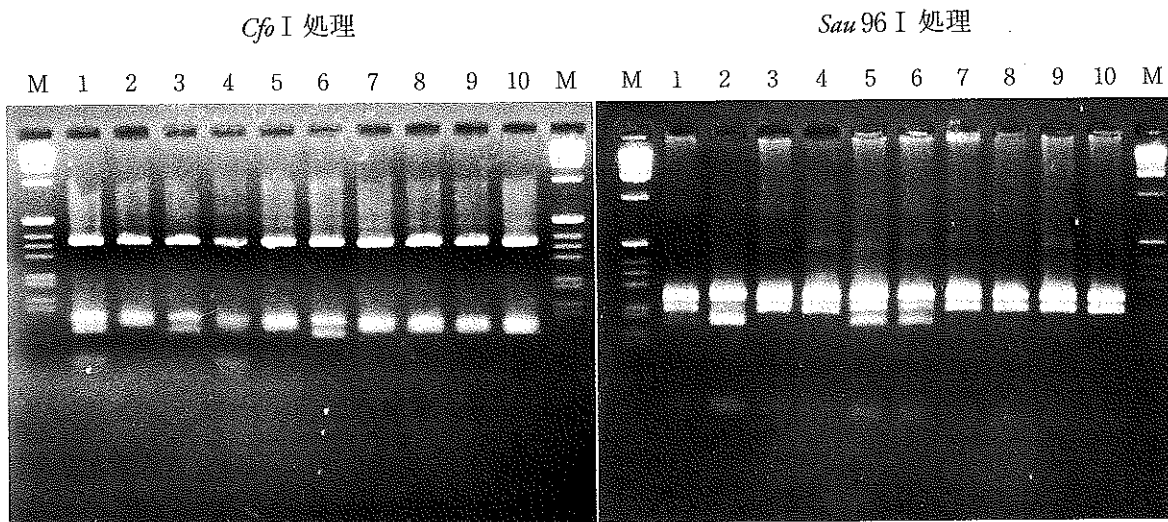


図24 ユリのPCR-RFLP分析例

左：SH020+SH021を用いたPCR産物を *Cfo* I で処理したもの (rbcL遺伝子)。
 右：SH013+SH015を用いたPCR産物を *Sau* 96 I で処理したもの (rRNA遺伝子)。

表16 プライマーSH020とSH021を用いてrbcL遺伝子を増幅して得られたPCR産物のRFLP分析によって検出されたPCR-RFLPマーカー

制限酵素	断片長 (bp)	種あるいは交雑種 ^a									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>Alu</i> I	270	+ ^y	- ^y	+	+	-	+	+	+	+	+
<i>Alu</i> I	210	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Cfo</i> I	100	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+
<i>Cfo</i> I	80	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-
<i>Bsp</i> 1286 I	370	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Bsp</i> 1286 I	200	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-

^a 1:ササユリ (*L. japonicum*) 2:ヒメサユリ (*L. rubellum*)
 3:タモトユリ (*L. nobilissimum*) 4:カノコユリ (*L. speciosum*)
 5:ヤマユリ (*L. auratum*) 6:サクユリ (*L. auratum* var. *platyphyllum*)
 7:キカノコユリ (*L. henryi*) 8:チョウセンヒメユリ (*L. concolor* var. *pulchellum*)
 9:コオニユリ (*L. leichtlinii* var. *maximowiczii*)
 10:シンテッポウユリ (*L. × formolongi*),
^y +:有, -:無.

表17 プライマーSH013とSH015を用いてrRNA遺伝子を増幅して得られたPCR産物のRFLP分析によって検出されたPCR-RFLPマーカー

制限酵素	断片長 (bp)	種あるいは交雑種 ²									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>Msp</i> I	260	+ ^y	+	+	+	+	+	+	- ^y	-	-
<i>Msp</i> I	220	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>Rsa</i> I	400	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Rsa</i> I	100	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Hae</i> III	340	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>Hae</i> III	280	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>Hae</i> III	220	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Hae</i> III	180	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>Hin</i> f I	240	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>Hin</i> f I	180	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>Sau</i> 96 I	180	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>Scr</i> F I	300	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>Scr</i> F I	220	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>Mvn</i> I	240	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>Mvn</i> I	160	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Hsp</i> 92 II	300	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
<i>Hsp</i> 92 II	220	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
<i>Taq</i> I	160	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Taq</i> I	100	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+
<i>Dde</i> I	390	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>Trn</i> 9 I	290	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Trn</i> 9 I	230	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Bsp</i> 1286 I	300	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>Bsp</i> 1286 I	210	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>Cfo</i> I	360	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Cfo</i> I	330	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Cfo</i> I	190	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Cfo</i> I	140	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-

² 表16参照.^y +:有, -:無.表18 表17から算出したrRNA遺伝子に基づく類似度係数(Similarity Coefficient)²と類似マトリックス

	1 ^y	2	3	4	5	6	7	8	9
1									
2	0.929								
3	0.893	0.821							
4	0.893	0.821	1.000						
5	1.000	0.929	0.893	0.893					
6	0.964	0.964	0.857	0.857	0.964				
7	0.643	0.643	0.607	0.607	0.643	0.679			
8	0.357	0.286	0.321	0.321	0.357	0.321	0.500		
9	0.321	0.321	0.286	0.286	0.321	0.357	0.536	0.964	
10	0.143	0.071	0.250	0.250	0.143	0.107	0.286	0.786	0.750

² 類似度係数 = $\frac{\text{表示 (+ または -) の一致した数}}{\text{多型を示したバンド数 (28)}}$

^y 1: ササユリ (*L. japonicum*) 2: ヒメサユリ (*L. rubellum*)
 3: タモトユリ (*L. nobilissimum*) 4: カノコユリ (*L. speciosum*)
 5: ヤマユリ (*L. auratum*) 6: サクユリ (*L. auratum* var. *platyphyllum*)
 7: キカノコユリ (*L. henryi*) 8: チョウセンヒメユリ (*L. concolor* var. *pulchellum*) 9: コオニユリ (*L. leichlinii* var. *maximowiczii*)
 10: シンテツボウユリ (*L. formolongi*).

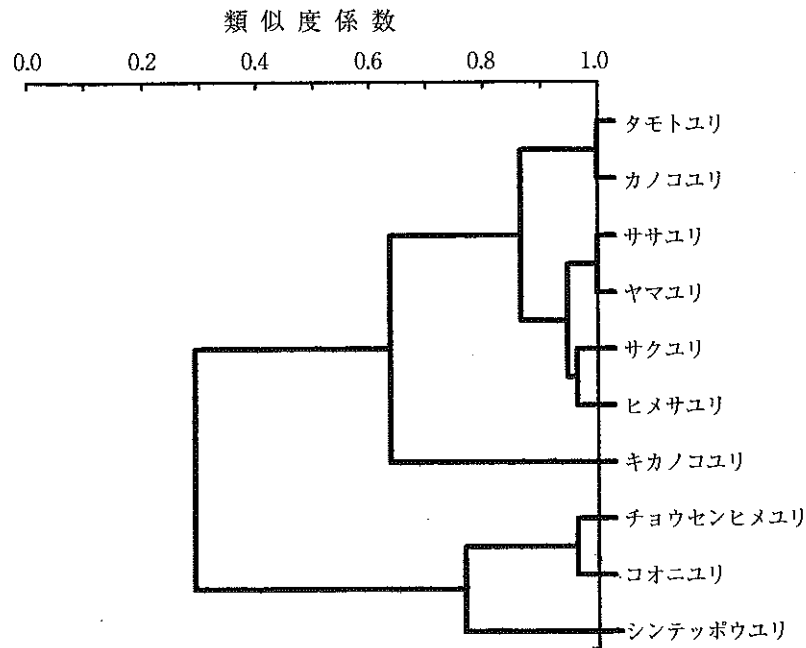


図25 核のrRNA遺伝子を利用したPCR-RFLPの結果に基づく樹形図

考 察

Palmerら (1988) は、葉緑体遺伝子は核遺伝子に比べて塩基配列の保存性が高く、塩基置換率は核遺伝子の1/2~1/3であることを述べている。葉緑体のrbcL遺伝子と核のrRNA遺伝子を用いた本実験では、rRNA遺伝子を用いた場合に多くの多型が観察され、Palmerの記述がうらぎけられた。

図26にrbcL遺伝子とrRNA遺伝子の両方で得られた結果をまとめて示した。シンテッポウユリ、チョウセンヒメユリ、コオニユリ及びキカノコユリはrbcL遺伝子の分析結果から一つのグループにまとめられ、他の6種と区別することができた。さらに、このグループは、rRNA遺伝子の分析結果から3つのグループ (group 1, group 2, group 3)に分けることができた。また、ササユリ、サクユリ、カノコユリ、タモトユリ、ヒメサユリ及びヤマユリの6種では、rbcL遺伝子の分析結果からはタモトユリ、カノコユリ、ササユリ、サクユリが同一グループに含まれたのに対して、rRNA遺伝子の分析結果からはササユリ、サクユリ、ヒメサユリ、ヤマユリが同一グループになった。したがって、両者の結果を組み合わせると、これら6種のユリはさらに3グループ

(group4-a, group4-b, group 4-c)に分けられるものと考えられる。

Smythら (1989) は、染色体のCバンド染色の結果と Comber (1949) の分類とを比較検討してユリの分類を行っており、今回の供試材料のうち、チョウセンヒメユリとコオニユリは *Sinomartagon* 節に、キカノコユリは *Leucolirion a* 節に、ササユリ、カノコユリ、タモトユリ、ヒメサユリ及びヤマユリは *Archelirion* 節に分類されている。また、今回用いたシンテッポウユリの親であるテッポウユリとタカサゴユリは *Leucolirion b* 節に含まれるとされている。図26に示した結果は、Comber及びSmythらの分類とは矛盾せず、さらに *Archelirion* 節に属する6種を3グループに分けることができた。

サクユリはヤマユリの変種とされ、*L. auratum* var. *platyphyllum* という学名が付けられている (北村ら, 1976)。また、Asano (1986) は53種類の形態的特徴を用いてクラスター分析することによってササユリとヒメサユリが近いことを示している。しかし、rbcL遺伝子及びrRNA遺伝子を用いたPCR-RFLP分析の結果をあわせて考えた場合、ササユリとサクユリ、ヤマユリとヒメサユリがそれぞれ近いことが示された。

清水 (1987a) によれば、カノコユリは中国大陸から九州及び四国南部に分布しており、タモ

トユリは西南諸島の一部に自生している。ササユリの分布域は四国、九州の一部及び本州西部で、本州東部を分布域とするヤマユリとは近畿東部から東海地方でその分布域が重なっている。一方、サクユリの自生地は伊豆諸島であり、ササユリとヤマユリの分布域には重ならず、ササユリとヤマユリの共通分布域である東海地方の近くに位置している。ヒメサユリは、ヤマユリの分布域の中に入っており、ササユリとは分布域が離れている。この分布地域とPCR-RFLP分析で得られた結果、さらに、葉緑体遺伝子の塩基配列が核の遺伝子よりも安定であることを考

慮すると、中国大陸から渡ってきたカノコユリがタモトユリとサクユリにわかれ、サクユリがさらにササユリとヤマユリに分かれてヤマユリからヒメサユリが生まれたという図式が系統関係を示す仮説の一つとして考えられる(図27)。今後、さらに他の遺伝子を用いた検討が必要である。

また、ササユリ・サクユリグループ(group 4-b)とヒメサユリ・ヤマユリグループ (group 4-c)は葉緑体にあるrbcL遺伝子では異なるのに対して、核にあるrRNA遺伝子では近いことがPCR-RFLP分析から示された。rRNA遺伝子は多数のコピー

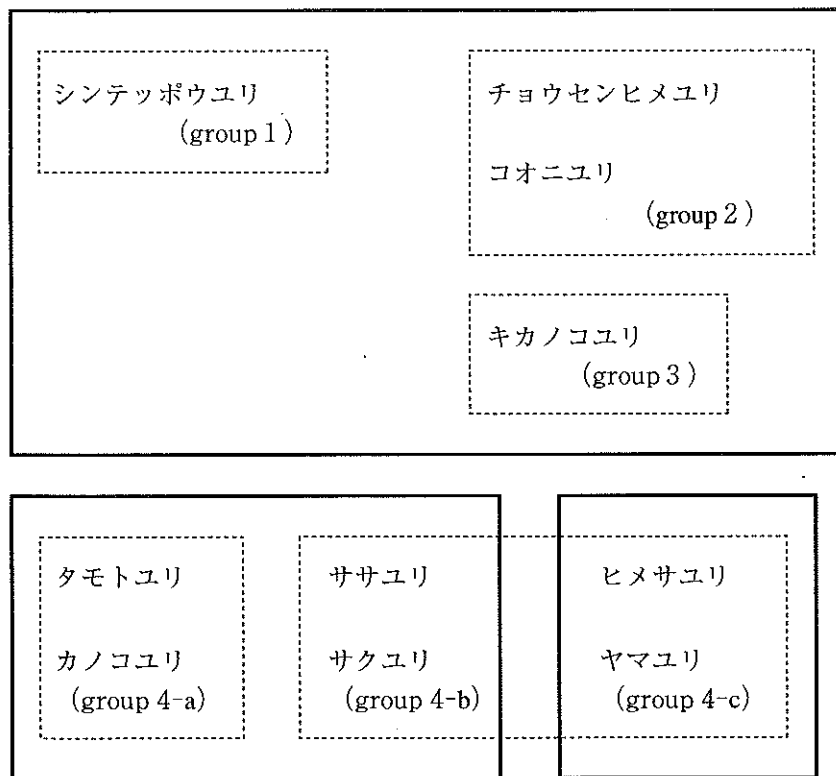


図26 rbcL及びrRNA遺伝子をもとにした9種1交雑種の関係
実線：rbcL遺伝子（葉緑体）による分類。
破線：rRNA遺伝子（核）による分類。

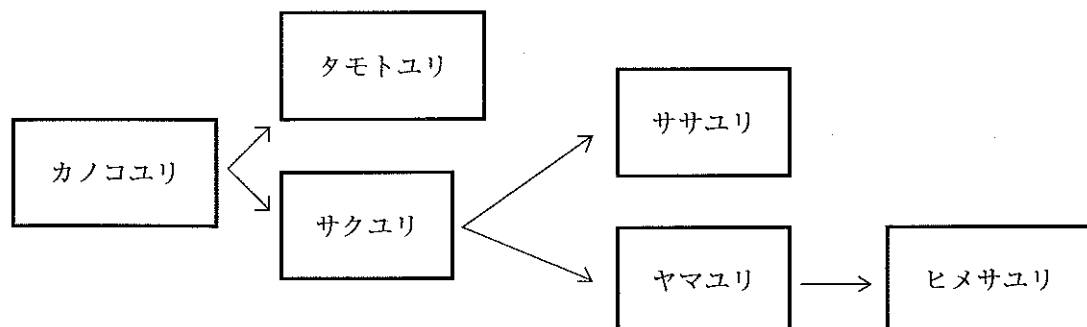


図27 PCR-RFLP分析に基づいた *Archelirion* に含まれる6種の系統発生の模式図 (仮説)

がゲノム内に存在しており (Albertsら, 1983), 一部の遺伝子の塩基配列に差が生じた種間で相互に交雑が行われた場合, rRNA遺伝子が入り混じり合い, 種間の差が検出しにくくなると考えられる. 実際, ササユリとヤマユリは交配が容易で, 自然交雑種が伊豆地方で発見されている (渡辺, 1987). また, 核型変異の研究から, 伊豆半島ではササユリとヤマユリが自然状態で交雑していることが推定されている (荻原, 1966; 野田, 1987). したがって, ササユリ, ヤマユリ, サクユリ及びヒメサユリは, 進化の過程で葉緑体のrbcL遺伝子に差が生じてから以降も, 相互に交雑しあいながらしだいに異なった種に分かれてきたものである可能性が推察される.

以上のように, PCR-RFLP分析は, *Lilium* 属の分類に有効であることが明らかとなった. RAPD分析は簡便であり, 容易に結果を得ることができるが, 使用する酵素の種類, サーマルサイクラーの機種の違いにより結果が異なる場合があり, 再現性が低い. これに対して, 遺伝子の特定部位を20塩基程度の比較的長いプライマーを用いて増幅するPCR-RFLP分析は, 増幅用の酵素の種類やサーマルサイクラーの機種には依存しないため, 高い再現性が期待できる. したがって, 特定遺伝子を安定的に増幅できるプライマーの設計に成功すれば, PCR-RFLP分析は種間あるいは節間の比較に極めて有効であると考えられる. さらに, この方法では, rbcL遺伝子やrRNA遺伝子のように葉緑体あるいは核に特異的な遺伝子を用いて解析できることから, 細胞質と核を区別して類縁関係を調査することができる. 現在のところ, 調査した遺伝子数が少ないため, 種間の遺伝的差異を誤りなく示しているとは必ずしも言えないが, 今後供試する遺伝子数を増やすことによってさらに信頼性を増すことができるものと考えられる.

第2節 PCR-RFLPを用いたユリの種間雑種の両親の推定

ユリは毎年多くの品種が育成され, 種苗登録されている (高木, 1995, 1996, 1997). 英国王立協会の分類 (Anonymous, 1964; Leslie, 1982) によるDivision VII に含まれるユリの交雑品種は

オリエンタルハイブリッド系品種と呼ばれており, ササユリ, ヤマユリ, サクユリ, ヒメサユリ, カノコユリ, タモトユリなど日本に自生しているユリを交雑してつくられたものである. ユリの新品種を育成するための交配親を選定する場合に, 親として用いる品種の両親あるいは来歴に関する情報は重要であるにもかかわらず, 明らかにされていない場合が多い.

第1節でPCR-RFLPを用いてユリの野生種の遺伝的関係を明らかにしたが, その過程で, 一部の野生種に特異的なマーカーが明らかとなった. そこで, この方法を用いて, Division VII に含まれる品種の交配親となっているユリの原種を区別することのできるマーカーを検索し, 種間交雑種の親あるいは来歴を明らかにすることを試みた.

材料及び方法

Lilium 属の *Archelirion* 節に含まれるササユリ, ヤマユリ, サクユリ, ヒメサユリ, カノコユリ, タモトユリ及び市販の種間交雑種を材料として用いた (表19). 表のNo. 1~6の野生種はPCR-RFLP分析によるマーカー検索のために用いた. また, No. 3, 7及びNo. 8の5個体の交雑個体 (シンテツポウユリ×カノコユリ) はPCR-RFLPマーカーが遺伝することを証明するために用いた. シンテツポウユリとカノコユリの交雑個体は, 花柱切断受粉法 (浅野, 1987) によって得られた未熟胚をホルモン無添加MS培地で胚培養して再生させたものを用いた. さらに, 検索されたPCR-RFLPマーカーを用いて市販品種のNo. 9~14について, その親を推定した.

DNA抽出とPCR-RFLP分析は第1節と同様に行った. プライマーは, 第1節で用いたものに加えて, GENETYX-MAC(ver.7.0)とGENETYX-MAC/CD(ver.29.0.0)のソフトウェアパッケージ (SOFTWARE DEVELOPMENT Co., Ltd.) を用いてデータベースGenBankから検索したATPase subunit B (atpB) 遺伝子の塩基配列 (Moonら, 1987) から設計して用いた. さらに, Ooiら (1995) 及び遠藤 (1995) が設計したmatK遺伝子 (Johnson・Soltis, 1994) 内のプライマーを用いた. 本節で用いたプライマーの塩基配列

表19 実験に用いた *Lilium* 属の種と種間交雑品種

No.	種と品種	入手先
1.	サクユリ #1	大和農園
	サクユリ #2	タキイ種苗
2.	ササユリ #1	タキイ種苗
	ササユリ #2	自生個体 (島根県松江市)
	ササユリ #3	自生個体 (島根県松江市)
	ササユリ #4	自生個体 (島根県吉田村)
	ササユリ #5	自生個体 (奈良県農業試験場)
3.	カノコユリ '内田かのこ'	サカタのタネ
	カノコユリ '紅かのこ'	タキイ種苗
4.	タモトユリ	サカタのタネ
5.	ヤマユリ #1	大和農園
	ヤマユリ #2	春草園
6.	ヒメサユリ #1	春草園
	ヒメサユリ #2	タキイ種苗
7.	シンテッポウユリ 'No. 22'	島根県農業試験場育成
8.	シンテッポウユリ×カノコユリ	島根県農業試験場育成
	'HB-1'	
	'HB-2'	
	'HB-3'	
	'HB-4'	
	'HB-5'	
9.	'スターゲザー'	タキイ種苗
10.	'ル・レーブ'	第一園芸
11.	'カサブランカ'	第一園芸
12.	'サマードレス'	サカタのタネ
13.	'ピンクパール'	第一園芸
14.	'マルコポーロ'	タキイ種苗

を表20に、遺伝子内での位置関係を示す模式図を図28に示した。PCRはサーマルサイクラーを用いて行い、94℃ 1分間での変成処理後、94℃ 1分-55℃ 2分-72℃ 2分を35サイクル、最後に72℃ 3分間の処理を行った。なお、*matK*遺伝子内で設計したプライマーを用いる場合には、アニーリング温度を55℃から50℃に変更してPCRを行った。全ての反応は、異なった実験で最低2回繰り返して行った。

供試材料No. 1~6のPCR産物は、制限酵素 *Cfo* I (GC↓GC), *Msp* I (C↓CGG), *Rsa* I (GT↓AC), *Hae* III (GG↓CC), *Mvn* I (CG↓CG), *Hin* d II (GTPy↓PuAC), *Alu* I (AG↓CT), *Hin* f I (G↓ANTC), *Sau* 3A I (↓GATC), *Sau* 96 I (G↓GNCC), *Sma* I (CCC↓GGG), *Ban* I (G↓G(T/C)(A/G)CC), *Scr* F I (CC↓NGG), *Taq* I (T↓CGA), *Hsp* 92 II (CATG↓), *Dde* I (C↓TNAG), *Tru* 9 I (T↓TAA), *Sty* I (C↓C(A/T)(T/A)GG), *Bsp* 1286 I (G(G/A/T)GC(C/A/T)↓C), *Eco* R I (G↓AATTC), *Vsp* I

(AT↓TAAT), *Mbo* II (GAAGA↓) を5~10unit用いて消化した。さらにこの処理によってPCR-RFLPマーカーが得られた酵素を用いて No. 9~No.14のPCR産物を消化した。また、No.3, No.7及びNo.8の5個体のPCR産物は *Cfo* I 及び *Hae* III で消化し、PCR-RFLPマーカーの遺伝を確認した。制限酵素による消化産物は、3.0% Nusieve GTG アーガロース (FMC Bio Products) 又は1.5% Agarose S (ニッポンジーン) を用いて0.5mg・l⁻¹エチジウムブロマイドを含んだTAEバッファー中で電気泳動を行い、UVランプ下で観察した。

結 果

1. *Archelirion* 節に含まれる6種のユリを用いたPCR-RFLP分析

プライマーSH020とSH021を用いて増幅して得られたDNA断片は約570bpであり、それを22種類の制限酵素で消化したところ3種類の酵素

表20 実験に用いたPCR用プライマー

対象遺伝子	プライマー	塩基配列
葉緑体 rbcL	SH020 ^z	5'-CGCGGTGGACTTGATTTTACC-3'
	SH021 ^z	5'-GGCATATGCCAAACATGAATACC-3'
rbcL-atpB	SH019 ^y	5'-GGTAAAATCAAGTCCACCGCG-3'
	SH022 ^y	5'-GCACTCATAGCTACAGCTCTAAC-3'
matK	matK-AF ^x	5'-CTATATCCACTTATCTTTCAGGAGT-3'
	matK-MR ^x	5'-CCAGAAGAGGTTAATCGTAAATGA-3'
核 rRNA	SH013 ^z	5'-ACACACCGCCCGTCGCTCCTA-3'
	SH015 ^z	5'-ACTCGATGGTTCACGGGATTCTG-3'

^z 第2節参照.

^y ユリのrbcL遺伝子及びイネのatpB遺伝子をもとにして設計.

^x Ooiら(1995)とEndo(1995)から引用.

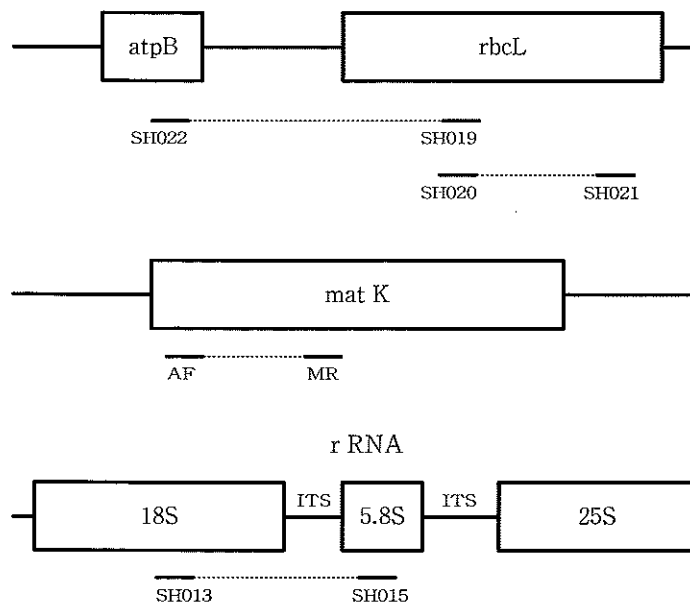


図28 プライマーの遺伝子内での位置関係
atpB, rbcL, matK遺伝子は葉緑体に存在し, rRNA 遺伝子
クラスターは核に存在する.

で切断した場合に多型が見られた。また、SH019とSH022, あるいはmatK-AFとmatK-MRを用いて増幅した場合に得られる断片はそれぞれ約1,500bp及び650bpであった。これらを22種類の制限酵素で消化した場合, それぞれ1及び3種類の酵素で多型が観察された。SH013とSH015を用いて得られたDNA断片は約520bpで, 22種中2種類の制限酵素で多型が観察された。供試した4組のプライマーと22種類の制限酵素の組み合わせ88組み合わせで得られた159バンドのうち

わずか16組み合わせでしか多型が見られなかったことから, 供試した6種は遺伝的に近縁であることが示唆される。

PCR-RFLP分析の例を図29に示し, 検出されたPCR-RFLPマーカを表21に示した。本実験では, 第1節で明らかとなったマーカ以外に, 葉緑体遺伝子でいくつかのマーカを新たに検出することができた。カノユリは, rbcL-atpBの *Vsp*I₈₅₀ で他の種と区別することができ, タモトユリは matK の *Hinf*I₁₃₀ あるいは *Sau*3A I₃₀₀

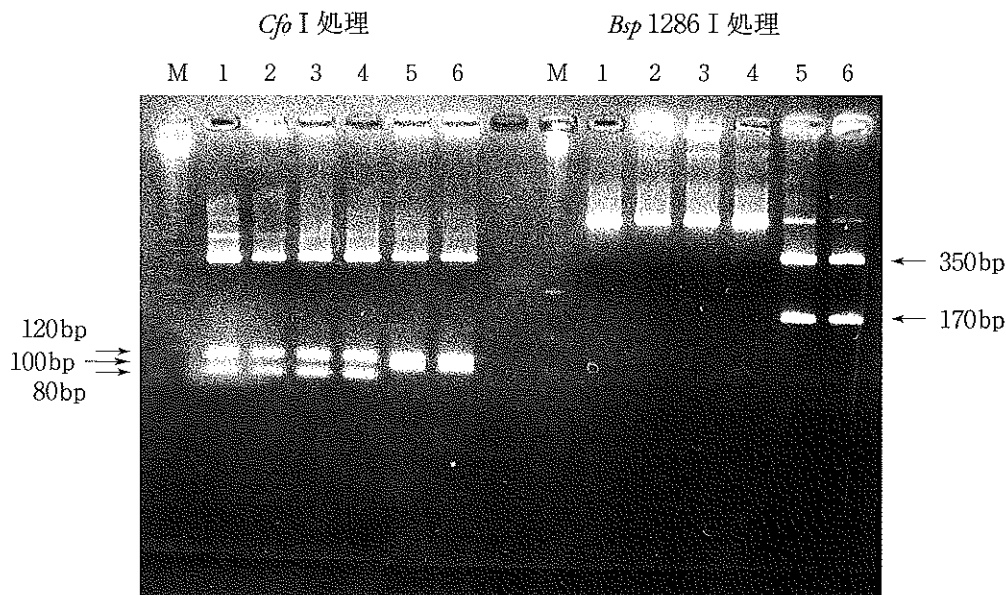


図29 プライマー-SH020+SH021を用いたPCR産物のPCR-RFLP分析例

1 : サクユリ 2 : ササユリ 3 : カノコユリ
 4 : タモトユリ 5 : ヤマユリ 6 : ヒメサユリ
 M : 50bp ladder marker.

表21 4種類のプライマーの組み合わせを用いてrbcL, matK及びrRNA遺伝子を増幅して得られたPCR産物のPCR-RFLPパターン

プライマー	制限酵素	制限断片 (bp)	種 ²					
			1	2	3	4	5	6
葉緑体								
SH020+SH021 (rbcL)	<i>Alu</i> I	270	+ ^y	+	+	+	- ^y	-
	<i>Alu</i> I	210	-	-	-	-	+	+
	<i>Cfo</i> I	100	-	-	-	-	+	+
	<i>Cfo</i> I	80	+	+	+	+	-	-
	<i>Bsp</i> 1286 I	350	-	-	-	-	+	+
	<i>Bsp</i> 1286 I	170	-	-	-	-	+	+
SH019+SH022 (rbcL-atpB)	<i>Vsp</i> I	950	+	+	-	+	+	+
	<i>Vsp</i> I	850	-	-	+	-	-	-
matK-AF+matK-MR (matK)	<i>Hinf</i> I	150	+	+	+	+	+	-
	<i>Hinf</i> I	130	-	-	-	-	-	+
	<i>Sau</i> 3A I	300	-	-	-	-	-	+
	<i>Mbo</i> II	320	+	+	+	-	+	+
	<i>Mbo</i> II	170	-	-	-	+	-	-
核								
SH013+SH015 (rRNA)	<i>Sau</i> 96 I	180	+	+	-	-	+	+
	<i>Hsp</i> 92 II	300	-	-	+	+	-	-
	<i>Hsp</i> 92 II	220	-	-	+	+	-	-

² 1:サクユリ 2:ササユリ 3:カノコユリ 4:タモトユリ
 5:ヤマユリ 6:ヒメサユリ.

^y +:有, -:無.

で識別することができた。また、ヤマユリは、rbcLに *Bsp*1286 I_{350,170}が^sあり、matKに *Hinf* I₁₃₀あるいは *Sau*3A I₃₀₀がないことで識別できた。

しかし、ササユリとサクユリはこれらのマーカーでは識別できなかった。一方、第1節で明らかとなった核のrRNA遺伝子におけるマーカーを

用いて、カノコユリとタモトユリのグループと他の4種のグループを識別することができた。

PCR-RFLPマーカーを種の識別用マーカーとして用いるためには、種内の異なる個体間でこのマーカーに差の無いことが必要である。そこで、表19に示した同じ種内の異なる個体や品種間でのマーカーの違いをPCR-RFLP分析で検討し、その例を図30に示した。サクユリ2個体、ササユリ5個体、ヤマユリ2個体、ヒメサユリ2個体及びカノコユリ2品種についてPCR-RFLPマーカーを調査した結果、それぞれの種内での個体間において差はみられなかった。

2. PCR-RFLPマーカーの遺伝

シンテッポウユリを母親、カノコユリを花粉親として交配して得られた交雑個体の一部を図31に示した。胚培養で得られた小球を3月に定植したところ、9～10月に開花し、シンテッポウユリの性質である早期開花性を受け継いでいるものと考えられた。また、いずれも赤色の色素が花に発現し、カノコユリから遺伝したと思われる乳頭状突起がみられた。花径は20cm以上となったが、花卉の基部が弱いため開花2日目頃から花形が乱れる欠点が認められた。花粉形成量のごくわずかで、自殖した場合に種子は得られなかった。そこで、赤色の花を持つこと

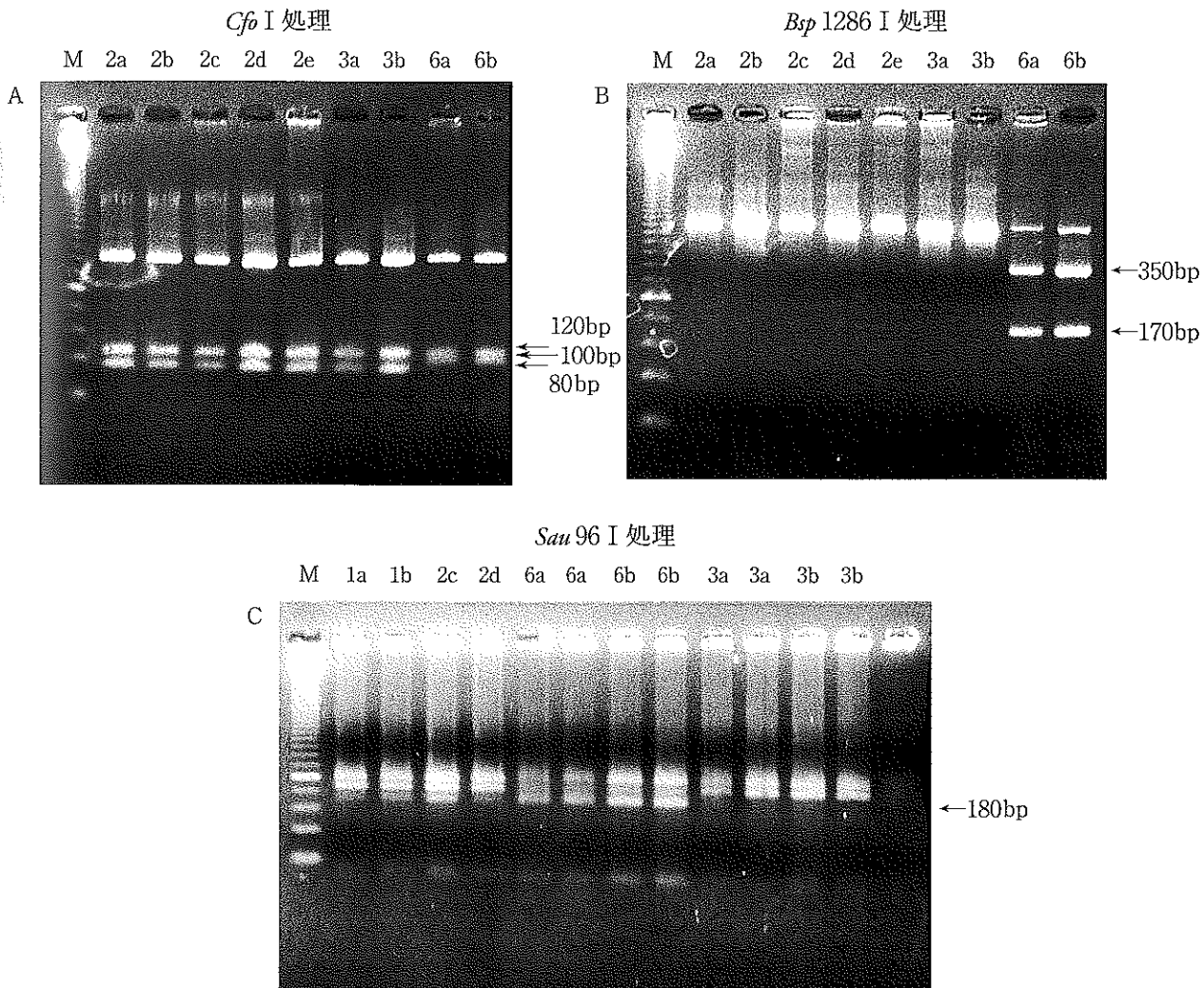


図30 同一種内複数個体のPCR-RFLP分析例

A : SH020+SH021を用いたPCR産物のCfo Iによる消化結果。

B : SH020+SH021を用いたPCR産物のBsp 1286 Iによる消化結果。

C : SH013+SH015を用いたPCR産物のSau 96 Iによる消化結果。

1a-1b : サクユリの個体#1-#2

2a-2e : ササユリの個体#1-#5

3a : カノコユリ '内田かのこ'

3b : カノコユリ '紅かのこ'

6a-6b : ヒメサユリ個体#1-#2

M : 50bp ladder marker.



図31 シンテッポウユリ (母親) とカノコユリ (花粉親) の交雑個体の3例

花柱切断受粉法により得られた胚から胚培養によって再生した交雑個体。

が確認された5個体の交雑個体を用いてPCR-RFLP分析を行い、その結果を図32に示した。母親として用いたシンテッポウユリの $rbcL$ 遺伝子において特異的にみられるPCR-RFLPのバンド $CfoI_{100}$ が全ての交雑個体で観察され、カノコユリに特異的な $CfoI_{80}$ は交雑個体ではみられなかった。これに対して、 $rRNA$ 遺伝子でみられるバンドは、父親のパターンと母親のパターンがあわさったものが全ての交雑種で観察された。

3. オリエンタルハイブリッド系品種の交配親の推定

表22に‘スターゲザー’‘ル・レーブ’‘カサブランカ’‘サマードレス’‘ピンクパール’及び‘マルコポーロ’の6市販品種を用いたPCR-RFLP分析の結果を示し、図33にPCR-RFLP分析の例を示した。‘カサブランカ’(No.11)‘サマードレス’(No.12)及び‘ピンクパール’(No.13)はカノコユリの葉緑体の $rbcL-atpB$ 遺伝子に特異的なマーカーである $VspI_{850}$ をもっていた。また、‘スターゲザー’(No.9)‘ル・レーブ’(No.10)及び‘マルコポーロ’(No.14)はサクユリとササユリの葉緑体でみられるPCR-RFLPマーカーと全く同じマーカーをもっていることが明らかとなった。核の $rRNA$ 遺伝子におけるPCR-RFLPマーカーは、‘スターゲザー’(No.9)‘ル・レーブ’(No.10)‘カサブランカ’(No.11)及び‘ピンクパール’(No.13)で同じパターンを示し、‘サマードレス’と‘マルコポーロ’はそれぞれ異なったパターンを示した。

考 察

種間雑種の親を推定するためには、親となっている種を他の種と区別することのできるマーカーを検索することが必要である。さらにそのマーカーは、ある特定の種のみが存在し、その存在によってその種が特定できるような種特異的なマーカーであることが望ましい。また、そのマーカーは種内の個体間では差がなく、種間交雑をした場合に次世代に遺伝することが必要である。第1節では $rbcL$ 遺伝子の一部を増幅し、3種類の制限酵素($AluI$, $CfoI$, $Bsp1286I$)で消化することによって6個のマーカーを検出した。これによってヤマユリとヒメサユリを他の4種(サクユリ, タモトユリ, カノコユリ, ササユリ)と区別することができた。本節の実験で、 $matK$ 遺伝子の内部及び $rbcL$ 遺伝子と $atpB$ 遺伝子の間を増幅し、4種類の制限酵素($VspI$, $HinfI$, $Sau3AI$, $MboII$)で消化することによって、さらに7個のマーカーを検出することができた。これらのマーカーを用いることによってサクユリとヤマユリを除く4種のユリを区別することができた。

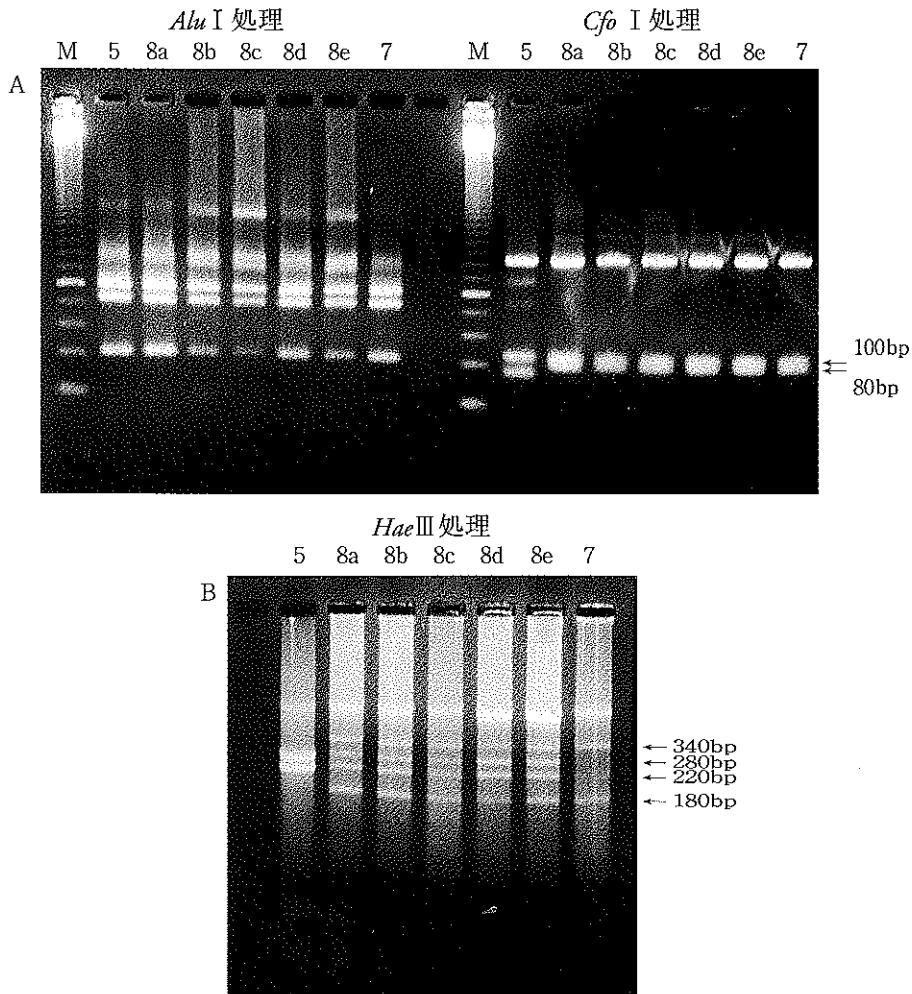


図32 PCR-RFLPマーカーの遺伝性の検証

A : SH020+SH021 (葉緑体遺伝子) を用いたPCR産物の *Alu* I および *Cfo* I で消化

B : SH013+SH015 (核遺伝子) を用いたPCR産物の *Hae* III で消化

5 : カノユリ ‘紅かのご’ 8a-8e : ‘HB-1’ - ‘HB-5’

7 : シンテッポウユリ.

表22 調査した6品種で検出されたPCR-RFLP マーカー

プライマー	制限酵素	制限断片 (bp)	品種*					
			9	10	11	12	13	14
葉緑体 SH020+SH021 (<i>rbcL</i>)	<i>Alu</i> I	270	+ ^y	+	+	+	+	+
	<i>Alu</i> I	210	- ^y	-	-	-	-	-
	<i>Cfo</i> I	100	-	-	-	-	-	-
	<i>Cfo</i> I	80	+	+	+	+	+	+
	<i>Bsp</i> 1286 I	350	-	-	-	-	-	-
	<i>Bsp</i> 1286 I	170	-	-	-	-	-	-
SH019+SH022 (<i>rbcL-atpB</i>)	<i>Vsp</i> I	950	+	+	-	-	-	+
	<i>Vsp</i> I	850	-	-	+	+	+	-
matK-AF+matK-MR (<i>matK</i>)	<i>Mbo</i> II	320	+	+	+	+	+	+
	<i>Mbo</i> II	170	-	-	-	-	-	-
核 SH013+SH015 (<i>rRNA</i>)	<i>Sau</i> 96 I	180	+	+	+	-	+	+
	<i>Hsp</i> 92 II	300	+	+	+	+	+	-
	<i>Hsp</i> 92 II	220	+	+	+	+	+	-

* 9: ‘スターゲザー’ 10: ‘ル・レーブ’ 11: ‘カサブランカ’
12: ‘サマードレス’ 13: ‘ピンクパール’ 14: ‘マルコポーロ’.

^y +:有, -:無.

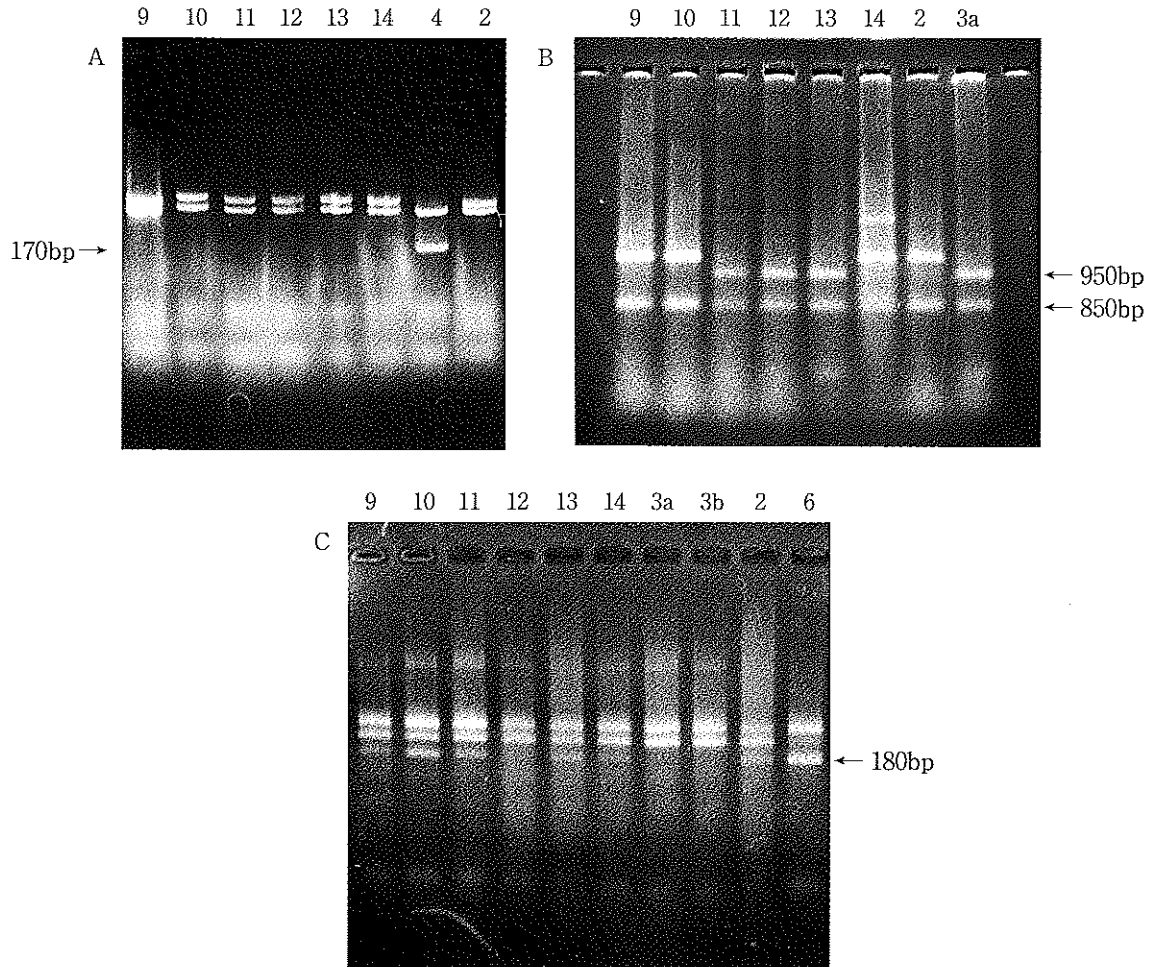


図33 市販交雑品種のPCR-RFLP分析例

A : matK-AF+matK-MRを用いたPCR産物の Mbo II による消化

B : SH019+SH022を用いたPCR産物の Vsp I による消化

C : SH013+SH015を用いたPCR産物の Sau 96 I による消化

9 : 'スターゲザ' 10 : 'ル・レーブ' 11 : 'カサブランカ'

12 : 'サマードレス' 13 : 'ピンクパール' 14 : 'マルコポーロ'

4 : タモトユリ 2 : ササユリ 6 : ヒメサユリ

3a : カノコユリ '内田かこの' 3b : カノコユリ '紅かこの'.

Palmerら (1988) は葉緑体の遺伝子の塩基配列は高等植物の間で保存性が高く、葉緑体遺伝子の一つである *rbcL* 遺伝子の塩基配列が属レベルの系統関係の比較に利用されていることを述べている。また、核の *rRNA* 遺伝子クラスターの ITS (Internal Transcribed Spacer) の塩基配列も高等植物の間で保存性が高いことから、そのわずかな違いを比較して *Paconia* で進化関係が調べられている (Sangら, 1995)。本実験でも、葉緑体遺伝子と核の *rRNA* 遺伝子内の PCR-RFLP マーカーが、種間では異なるのに対して、同じ種内の個体間では差がみられなかった。

また、PCR-RFLP マーカーの遺伝性を確認するための供試材料とした交雑個体は、花が白色

のシンテツポウユリを母親とし、花が赤色のカノコユリを花粉親として得られたものである。これらの交雑個体は、花に赤色素が発現すること、花粉形成量がわずかなこと、さらに種子ができないことから、シンテツポウユリとカノコユリの交雑個体であることが確認された。そして、これらの交雑個体とその両親を用いた PCR-RFLP 分析の結果、核のマーカーは両方の親から交雑個体に伝えられ、葉緑体のマーカーは母親からのみ伝えられることが明らかとなった。このように、遺伝子の PCR-RFLP マーカーが核あるいは核外遺伝子に関する遺伝理論に従って遺伝することが明らかとなり、PCR-RFLP 分析を種間交雑種の親あるいは来歴を推定するた

めに利用できる可能性が認められた。したがって、母親は葉緑体の遺伝子を、花粉親は核遺伝子をPCR-RFLPを用いて分析することによって推定することが可能であるものと考えられる。

本実験に用いた市販されているユリの交雑品種の中で、‘サマードレス’のみその来歴が明らかにされており、その母親はカノコユリで、その花粉親は‘阿州’（カノコユリとヤマユリの自然交雑種）に‘紅筋’（ヤマユリの変異個体）を交雑したものであるとされている（清水, 1987b）。実際、この実験では‘サマードレス’はカノコユリの葉緑体に特異的なマーカーをもっていることが明らかとなり、清水の記述と矛盾しなかった。一方、核のrRNA遺伝子におけるPCR-RFLPパターンは“-, +, +”でありカノコユリと同じであった。PCR-RFLPパターンが“+, +, +”ではなく“-, +, +”であったことから、ヤマユリを示すマーカーは、‘サマードレス’の親（‘阿州’と‘紅筋’の交雑個体）がカノコユリに交雑されたときに分離したことが推定され、このように考えれば、この実験結果は清水の記述と矛盾しない。

‘カサブランカ’の母親は‘ジャンボリー’（カノコユリ×ヤマユリにカノコユリを交配したもの）といわれているが、花粉親は知られていない（清水, 1987b）。葉緑体のPCR-RFLPパターンから‘カサブランカ’の細胞質はカノコユリが起源であることが示され、この結果は清水の記述に一致する。‘カサブランカ’の核のrRNA遺伝子を用いたPCR-RFLPパターンは“+, +, +”であり、カノコユリのそれは“-, +, +”であった。したがって、‘カサブランカ’の花粉親あるいは父方の先祖は“+, -, -”のPCR-RFLPパターンを持つサクユリ、ササユリ、ヤマユリ、ヒメサユリのいずれかであると考えられる。‘ピンクパール’は葉緑体及び核のrRNA遺伝子が両方とも‘カサブランカ’と同様なパターンを示した。したがって、細胞質はカノコユリ起源であり、花粉親あるいは父方の先祖はサクユリ、ササユリ、ヤマユリ、ヒメサユリのいずれかであるものと考えられる。

‘スターゲザー’と‘ル・レーブ’は、日本国内で広く栽培されているにもかかわらず、そ

の両親は明らかになっていない（岡崎, 1993）。これらの品種の葉緑体遺伝子のPCR-RFLP分析の結果から、細胞質はサクユリあるいはササユリから伝えられたものと考えられる。また、核のrRNA遺伝子のPCR-RFLPパターンは“+, +, +”であった。母親と推定されたサクユリまたはササユリのパターンは“+, -, -”であり、その子供が“+, +, +”のパターンをとるためには“-, +, +”のパターンを持つ‘カノコユリ’あるいは‘タモトユリ’が父親になる必要がある。清水は‘スターゲザー’はカノコユリとタモトユリの交雑種ではないかとしている（清水, 1987b）が、この実験からは細胞質の由来はサクユリあるいはササユリで、花粉親あるいはその先祖がカノコユリあるいはタモトユリである可能性が推定された。

‘マルコポーロ’は‘スターゲザー’及び‘ル・レーブ’と同じ葉緑体のPCR-RFLPパターンを示した。また、核のrRNA遺伝子のPCR-RFLPパターンはサクユリ、ササユリ、ヤマユリ及びヒメサユリと同一であった。したがって、‘マルコポーロ’の細胞質は‘サクユリ’あるいはササユリであり、花粉親はサクユリ、ササユリ、ヤマユリあるいはヒメサユリであるものと考えられる。

この実験に供試した *Archelirion* に含まれるユリは、他の節に含まれるユリの中ではリーガルユリ (*L. regale* Wilson), キカノコユリ (*L. henryi* Baker), テッポウユリ (*L. longiflorum* Thunb.), タカサゴユリ (*L. formosanum* Wallace) と交配できることが示されている (Asano, 1987)。しかし、供試した交雑品種は第1節で示した *Archelirion* に特異的にみられるPCR-RFLPマーカーをもっており、*Archelirion* の節内での種間交雑種であることが推定される。しかし、*Archelirion* に含まれるウケユリ (*L. alexandrae* hort. Wallace) はこの実験に加えておらず、このユリが親に使われている可能性を否定することはできない。今後さらに検討する必要がある。

以上のように、葉緑体遺伝子を用いたPCR-RFLP分析は種間交雑種の母親あるいは母方の先祖を推定するのに有益であることが明らかとなった。一方、核のrRNA遺伝子を用いたPCR-RFLP分析によって、花粉親あるいは父方の先祖

に関する情報も得ることができた。しかし、‘サマードレス’の親の推定において明らかとなったように、交配親が交雑種である場合には交配時に遺伝子の分離が発生する可能性があるため、親を特定することは困難であった。したがって、種間雑種の花粉親を明らかにするためには、塩基配列が種内では保存されているが種間では差のあるような遺伝子をさらに多く検索して、分析する必要がある。

第3節 鳥根県内及び他県の自生ササユリのRAPD分析

ササユリの自生個体には地域によって変異がみられる。太平洋側、とくに紀伊半島から東海地方にかけて分布しているササユリは葉が細いものに対して、北陸から山陰にかけての日本海側に分布するササユリは葉の幅が広いことが知られている(清水, 1987)。大川・水口(1993)はササユリのD染色体の短腕の二次狭窄の有無によって太平洋型と日本海型を区別し、さらに能登半島産のササユリが日本海型であることを明らかにしている。また、西村・渥美(1997)は花や葉などの形態的特徴に基づいてササユリ4変種の比較を行っている。

ササユリの自生個体を育種素材として利用する場合、採取地の異なる個体間の遺伝的差異を明らかにすることが重要である。近年、DNA多型を利用した類縁関係の解析が行われるようになり、ユリにおいても種や品種の分類がRAPD分析(Yamagishi, 1995; 小泉ら, 1997; 西川ら, 1997)によって行われるようになってきた。そこで、本実験では、鳥根県内に自生するササユリを基にして品種改良を行う場合の育種素材を選定するための基礎データを得ることを目的として、鳥根県内各地及び他県で採取したササユリのRAPD分析を行い、これらの遺伝的変異を解析した。

材料及び方法

供試材料の採取地、花色及び上位から5番目の葉の葉身長と葉身幅の比を表23に示した。また、鳥根県内での採取地を図34に示した。鳥根県を隠岐島、鳥根県東部の宍道湖周辺の平野部、鳥根県東部の中山間地域及び鳥根県西部の4区域に分け、それぞれの地域から自生個体を採取し、供試材料とした。また、鳥根県外からは、奈良県、和歌山県、愛媛県及び静岡県

表23 材料として用いたササユリ及び野生種

採取地	花色	葉長/葉幅	採取地	花色	葉長/葉幅
(隠岐島)			20 横田町	淡桃	5.2
1 五箇村	淡桃	2.7	21 大田市	桃	3.7
2 五箇村	淡桃	3.9	22 大田市	桃	4.8
3 五箇村	桃	5.4	(鳥根県西部)		
4 五箇村	淡桃	2.9	23 三隅町	淡桃	3.1
5 五箇村	淡桃	4.3	24 益田市	淡桃	2.9
(鳥根県東部平野部)			25 益田市	濃桃	3.8
6 松江市	白	5.0	26 日原町	淡桃	5.0
7 松江市	白	5.3	(他県)		
8 松江市	淡桃	5.4	27 奈良県	淡桃	8.2
9 松江市	淡桃	4.9	28 奈良県	淡桃	7.3
10 出雲市	白	2.9	29 奈良県	白	6.5
(鳥根県東部中山間地域)			30 和歌山県	淡桃	8.6
11 大東町	桃	3.6	31 和歌山県	淡桃	6.3
12 大東町	桃	2.5	32 愛媛県	淡桃	4.2
13 大東町	白	5.1	33 愛媛県	淡桃	5.5
14 大東町	濃桃	4.6	34 静岡県	淡桃	6.5
15 木次町	淡桃	4.2	35 静岡県	淡桃	7.5
16 吉田村	桃	4.4	(他の野生種)		
17 吉田村	白	4.2	36 オトメユリ		
18 赤来町	白	4.1	37 ヤマユリ		
19 赤来町	白	4.8	38 サクユリ		

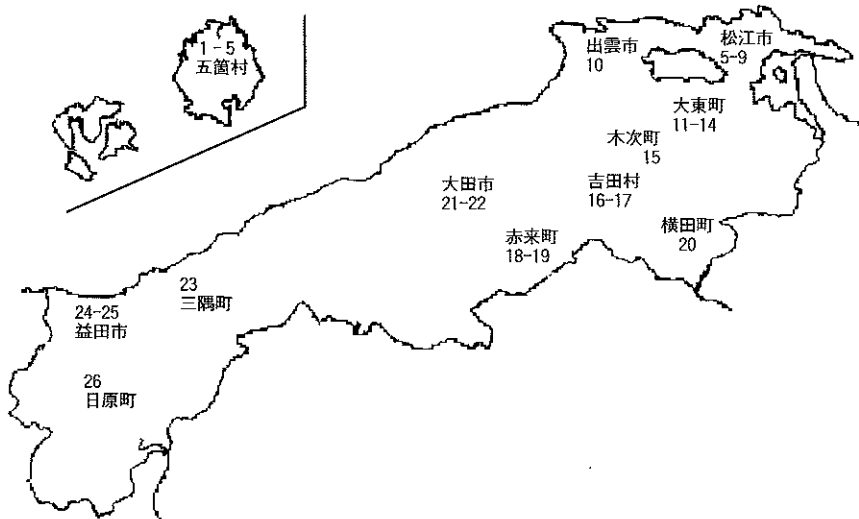


図34 ササユリ採取地

りの自生個体を供試した。さらに、ヒメサユリ、ヤマユリ及びサクユリを同時に供試した。

供試個体の葉切片約 0.05 g からDNA抽出用キット ISOPLANT(ニッポンジーン)を用いて全DNAを抽出し、これをTEバッファー (10mM Tris-HCl pH8.0, 1mM EDTA) に溶解して約 $40\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ になるように調整してテンプレートDNA溶液とした。PCR用反応液は、 $0.5 \mu\text{l}$ テンプレートDNA, $2.5 \mu\text{l}$ $10 \times$ PCRバッファー, 1 unit Amplitaq Gold (PE Applied Biosystems), 4mM MgCl_2 , $200 \mu\text{M}$ 各dNTP 及び $1 \mu\text{M}$ プライマーを添加して、最終容量を $25 \mu\text{l}$ とした。利用するプライマーは、表24に示した。

PCRはホットスタート法を用いて行い、第一段階として酵素を活性化するために 95°C 9分間の高温処理 (Amplitaq Gold 取り扱い説明書) を行った後、変性 94°C 45秒, アニール 43°C 1分, 伸長反応 72°C 1分を47サイクルで行った。PCR産物については、1.5% Nusieve GTG アーガロース (FMC BioProducts) と1% Agarose S (ニッポンジーン) を混合して作成したアーガロースゲルを用いて、 $0.5\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ のエチジウムブロマイドを添加したTAEバッファー中で電気泳動を行い、UVライトを照射して電気泳動パターンを観察した。PCRは3反復以上行い、200bpから700bpのサイズの再現性のあるDNA断片のバンドをもとにして、Fabbriら (1995) が用いた方法で各個体間の類似度係数を求め、UPGMA (Unweighted Pair-group Method Using Arithmetic Averages) によるクラスター分析 (Romesburg,

1992) を行った。クラスター分析にはマッキントッシュ用SYSTATプログラムを用いた。

結果

供試材料の花色及び葉身長に対する葉身幅の比を表23に示した。花色は、淡い桃色のものが最も多かったが、白色あるいは濃桃色のものもみられた。葉身長に対する葉身幅の比の値については、鳥根県及び愛媛県で採取されたものでは2.5~5.5の範囲に入ったのに対して、奈良県、和歌山県、静岡県で採取されたものでは6.3以上であった。

図35にプライマーY29及びプライマー#132を用いて得られた増幅DNA断片の電気泳動像の例を示した。PCRで増幅されたDNA断片のバンドは、100bpから2000bpのサイズのものが多かった。しかし、200bp以下のバンドは不明瞭なも

表24 実験に用いたプライマー

プライマー	塩基配列
Y 29 [*]	5'-TTC GGG CCG T-3'
#009	5'-TTC CGG TTG C-3'
#122	5'-ATG TCG ACG C-3'
#127	5'-GTT GCC ATT G-3'
#132	5'-GTT TTC CCA G-3'
#138	5'-TCG TTC CGC A-3'
#141	5'-TGA GCC TCA C-3'
#143	5'-ACT CCT GCG A-3'
#144	5'-GTC CCG TGG T-3'
#145	5'-CCA CAC TAC C-3'
#163	5'-AGG CCA GAC C-3'
#167	5'-GCG GAT TGA G-3'

^{*} Yamagishi (1995) を参照。

のが多く、検出が難しかった。また、700bp前後以上のバンドでは、バンド間の距離が短く、識別が困難であった。そこで、本実験では識別が容易であった200bpから700bpのサイズのバンドを用いて以下の解析を行った。

表25に200bpから700bpのサイズのバンド総数と、個体間で共通して認められたバンド及び多型が認められたバンドの数を示した。ササユリ35個体間においては12種類のプライマーで合計104本のバンドが検出され、そのうち多型性のバンドが103本、共通のバンドが3本であった。また、ササユリにヒメサユリ、ヤマユリ及びサクユリを加えた供試全38個体では、128本のバンドが検出され、そのうち多型性バンドが126本及び共通のバンドが2本であった。

これらのバンドをもとにして類似度係数を計算し、クラスター分析を行った結果を図36に示した。各個体間の類似度係数とそれらを用いて得られた樹形図の一致程度を示すコーフェン相関係数 (Romesburg, 1992) は0.899であり、完全一致を示す1に近いことから、この樹形図は個体間の類似構造をよく表しているものと考えられる。

鳥根県内で採取したササユリは、採取地域間で明瞭な差は検出できず、類似度係数0.588のレベルで同一のクラスターにまとめることができた。他県産のササユリの中では愛媛県産のササユリ (No.32及び33) が、鳥根県内で採取したササユリのクラスターに含まれた。これに対し

て、奈良県 (No.27, 28, 29)、和歌山県 (No.30, 31) 及び静岡県 (No.34, 35) 産のササユリはそれぞれ独自のクラスターを作り互いに区別された。

対照として加えたヤマユリ及びサクユリとササユリとの間の類似度係数は0.366という低い値

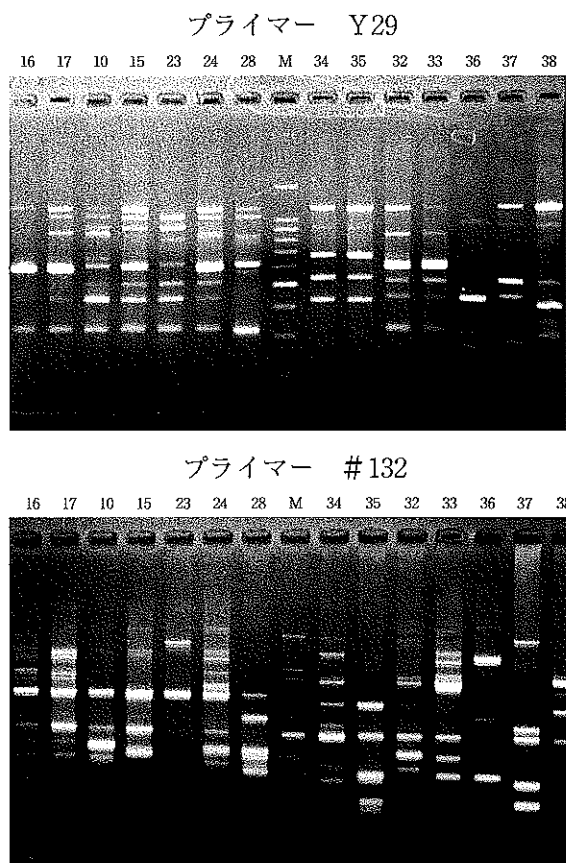


図35 RAPD分析例

写真の上の番号は表23参照。

上：プライマーY29 下：プライマー#132

M：100bpラダーマーカー、明るいバンドは500bp。

表25 アーガロースゲル電気泳動において観察されたバンド数

プライマー	ササユリのみ			ササユリ及び他の野生種		
	非多型バンド	多型バンド	合計	非多型バンド	多型バンド	合計
Y29	0	9	9	0	14	14
#009	1	6	7	0	10	10
#122	0	10	10	0	10	10
#127	0	9	9	0	11	11
#132	0	11	11	0	12	12
#138	0	7	7	0	7	7
#141	0	7	7	0	7	7
#143	0	12	12	0	15	15
#144	0	11	11	0	16	16
#154	0	8	8	0	8	8
#163	2	2	4	2	2	4
#167	0	9	9	0	14	14
合計	3	101	104	2	126	128

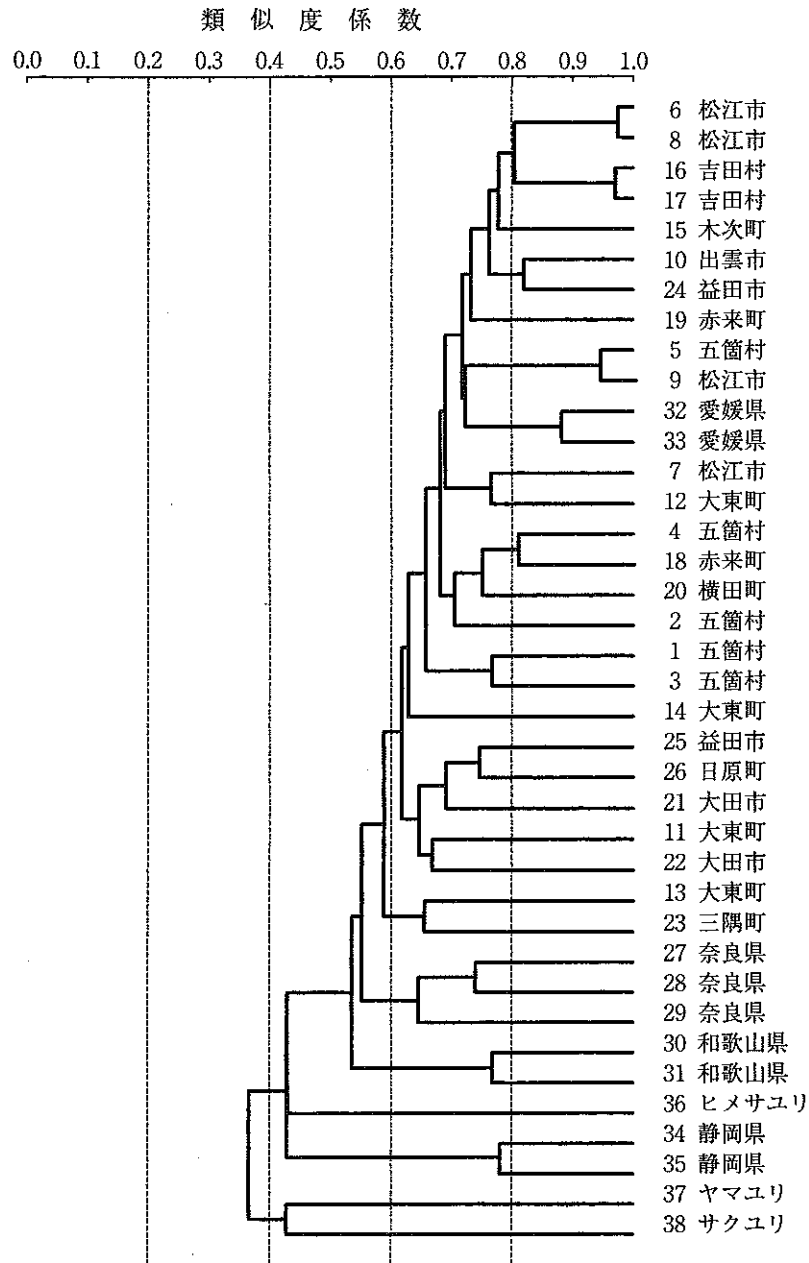


図36 島根県内及び他県のササユリのRAPD分析に基づいた樹形図

を示し、種の違いが明確に反映される結果となった。また、島根・愛媛・奈良・和歌山県産のササユリと静岡県産のササユリとの類似度係数は0.428であり、前者4県産のササユリとヒメサユリの間の類似度係数0.429とほぼ同じ値となった。

考 察

RAPD分析による品種識別及び品種間の遺伝的距離の比較に関する研究は、レモン (Dengら, 1995), ウメ (Shimadaら, 1994; Ozakiら, 1995), シャクヤク (Hosokiら, 1997a) あるいはボタン (Hosokiら, 1997b, 1997c) などの榮

養繁殖性作物で多く行われている。レモンでは、16品種について22種類のプライマーを用いた分析で294本のバンドが検出され、そのうち43本 (15%) が多型性であった (Dengら, 1995)。コウメでは、16品種について36種類のプライマーを用いた分析で969本のバンドが検出され、そのうち60本 (6%) のバンドが多型性であった (Shimadaら, 1994)。また、シャクヤク21品種について11種類のプライマーを用いた分析で129本のバンドが検出され、そのうち99本 (77%) が多型を示した (Hosokiら, 1997a)。さらに、ボタン及びボタンとシャクヤクの交雑種では、21品種について11種類のプライマーを用いた分

析により131本のバンドが検出され、そのうち108本(82%)が多型性のバンドであった(Hosokira, 1997b)。中国ボタン19品種については、11種類のプライマーを用いた分析で検出された130本のバンドのうち92本(71%)で多型がみられている(Hosokira, 1997c)。また、ユリにおいては、スカシユリ16品種について4種類のプライマーを用いた分析で、非多型性のバンドが多数みられることが示されている(小泉ら, 1997)。

これに対して本実験では、ササユリのみ35個体を対象にした場合に、12種類のプライマーを用いた分析で104本のバンドが観察され、そのうち101本(97%)が多型を示した。PCR条件、供試個体数などが異なることを考慮しても、多型性バンドの出現頻度がレモンなど先にあげた作物に比べて明らかに高かったことから、供試したササユリは遺伝的変異が大きいことが示唆された。Yamagishi (1995)は野生種及び交雑品種を用いた研究の中で自生地から採取したササユリ7個体を検討し、ランダムプライマーで容易に多型がみられることを、西川ら(1997)はヤマユリの自生個体の遺伝的多様性が高いことをそれぞれ示しており、本実験と同様の結果を得ている。レモンなど先にあげた研究は、いずれも栽培品種を用いたものであるのに対して、本実験に用いたササユリは自生地から採取したものである。さらに、ササユリの自生地では自生個体の分球は少なく株の周囲に実生の芽生えが観察されることから、ササユリは自生地ではおもに実生繁殖していることが推定される。したがって、本実験に用いたササユリが人為的選抜の加わっていない実生個体であることが、遺伝的多様性の大きいことの原因の一つとして考えられる。また、ユリは植物の中でゲノムサイズがきわめて大きいもののひとつであり(Albertsら, 1995)、ユリのDNA中にはRNAの合成に関与していない非コード領域が他の植物に比べて多く存在していると考えられる。非コード領域に起こる変異は生存に対して影響を及ぼさないため、その後代においても保存される中立的なものである可能性が高いので、RAPD分析で多くの多型が検出されたものと考えられる。

なお、DNA多型を利用した系統間の比較のための有効な方法としてRAPD分析のほかに第1

節に示したPCR-RFLP分析がある。しかし、本実験と同時に、核のrRNA遺伝子クラスターにおける18SrRNA及び5.8SrRNA遺伝子内にプライマーを設計し、PCR-RFLP分析を行ったところ、個体間に差はみられなかった。したがって、同一種内の個体間の比較には、rRNA遺伝子などの特定の領域を対象とするPCR-RFLP分析よりも、本実験で用いたゲノム全体を対象とするRAPD分析の方が有効であると考えられる。

島根県に自生しているササユリを基にして栽培容易な品種を育成するためには、その交配親選定の基礎資料として島根県内各地のササユリの遺伝的な差異を明らかにし、さらに他県のササユリとも比較する必要がある。そこで、島根県内外から収集した35個体のササユリに、ササユリと遺伝的に近いことが第1節で明らかになったヒメサユリ、ヤマユリ及びサクユリを対照として加えて行ったRAPD分析の結果をクラスター分析によって解析した。

隠岐島を含めた島根県内各地から採取したササユリは、採取地域による明確なグループ分けはできなかった。さらに、愛媛県産のササユリは島根県産のササユリのクラスターの中に完全に含まれた。これらのことから、島根県及び愛媛県のササユリは、地理的に隔たりが大きいにもかかわらず、互いに極めて近縁であると考えられる。また、これらのササユリはいずれも葉身長と葉身幅の比が2.5から5.5の範囲にあり、奈良県、和歌山県、静岡県のものに比べて葉の幅が広く、形態的にも類似していた。したがって、島根県と愛媛県のササユリは共通の起源を持っている可能性があるものと考えられる。

本実験で対照として加えたヤマユリ及びサクユリは、類似度係数0.366のレベルでササユリとは異なるクラスターに分類された。さらに、静岡県産のササユリは島根、愛媛、奈良及び和歌山県産のササユリと類似度係数0.428で異なるクラスターに分類された。一方、対照のヒメサユリと静岡県産ササユリの類似度は0.428であり、ヒメサユリと島根・愛媛・奈良・和歌山産ササユリとの類似度は0.429とほぼ同程度の値となった。このことから、ササユリは地域による変異が大きく、その中にヒメサユリが含まれる可能性が示唆される。

大川・水口 (1993) は能登半島に自生しているササユリの核型分析を行い、Stewart (1947) の示したササユリの標準核型及び伊豆半島のササユリを用いた荻原 (1966) の報告と比較し、太平洋型のササユリはD染色体の短腕の二次狭窄があるのに対して、日本海型はこの二次狭窄がないことから両者が遠縁であることを示している。本実験でも同様に、RAPD分析の結果から、島根・愛媛県産、奈良県産、和歌山県産のササユリと静岡県産のササユリは、同じ種であるにもかかわらず、種間の遺伝的差異とはほぼ同程度の大きな遺伝的差異のあることが示された。

清水 (1987) は葉の形態に着目し、日本海沿岸に自生する葉の広いササユリを変種としてヒロハササユリ (*L. japonicum* var. *platyfolium*) とする説を唱えている。RAPD分析によって同一のクラスターに含まれた島根・愛媛県産のササユリは、和歌山・奈良・静岡産のササユリに比べて葉身長に対する葉身幅の比 (葉身長/葉身幅) が小さく葉の幅が広いことから、日本海型ササユリ (大川・水口, 1993) あるいはヒロハササユリ (清水, 1987) に対応するものと考えられる。また、西村・渥美 (1997) は石川県、大阪府、和歌山県、徳島県の4地域から採取したササユリについて39形質をもとにしたクラスター分析を行い、和歌山県産と徳島県産のササユリがそれぞれ独自のクラスターに分けられることを示している。本実験で用いた和歌山県産ササユリは、RAPD分析によってササユリの中で独自のクラスターをつくっていることから、西村・渥美の示した和歌山県産のササユリに対応する可能性が認められる。今後、詳細な検討が必要である。

ササユリは、安定的な生産が要望されているにもかかわらず、栽培が難しいために、和歌山県などのごく一部の地域で切り花生産が始められているにすぎない。生産量を拡大するためには生育が早く、栽培容易な品種の育成が必要である。RAPD分析の結果、島根県及び愛媛県のササユリ分布地域西部のササユリと、静岡県あるいは和歌山県など分布地域東部のササユリは、互いに遺伝的に遠縁であることが明らかとなった。筆者はササユリの自殖個体には草勢が弱く球根肥大の悪いものが多く発生することを経験

しており、遺伝的に遠縁なササユリ同士の交雑個体は雑種強勢を示す可能性がある。今後、島根県に自生するササユリに、遺伝的に遠縁な静岡県あるいは和歌山県のササユリを交配することにより、生育旺盛で栽培容易なササユリ品種が育成できる可能性があるものと考えられる。

第IV章 ササユリを片親にした異種間交雑による新品種の育成

第1節 ササユリと他の野生種及び品種の交雑

西日本に分布しているササユリは、かすかな風にも揺れる繊細で楚々とした風情をもち、日本では万葉の昔から親しまれてきた。一方、欧米を中心にして *Archelirion* 節に含まれるユリから育成されたオリエンタルハイブリッド系品種には、'カサブランカ' や 'スターゲザー' など花が豪華で、色彩の鮮やかな人目を引くものが多く、ササユリの持つ繊細で清楚な風情は育種目標として取り上げられてこなかった。そこで、本節では、ササユリのもつ特徴をできるだけ多く受け継ぎ、栽培容易な品種の育成を目標として、他の野生種や市販の交雑品種との交配を試みた。

ササユリの品種改良において上記の育種目標を実現するためには、交雑個体にササユリの性質をできるだけ多く受け継がせる必要がある。そこで、交配親を選定するにあたり、ササユリと遺伝的に近縁な野生種あるいは交雑品種を利用することとした。これによって、異種間交雑によって雑種強勢や他種あるいは交雑品種から耐病性などが獲得できる可能性がある。

前章で、ササユリはサクユリと遺伝的に近縁であることを明らかにした。特に、葉緑体にある *rbcL* 遺伝子のPCR-RFLP分析で差がなかったことから、両者の細胞質は近縁であることが示唆された。また、市販品種である 'スターゲザー' も細胞質がササユリあるいはサクユリ起源である可能性が明らかとなった。そこで、本節では、サクユリ及び 'スターゲザー' を母親とし、ササユリを花粉親として交配を行って得られた交雑個体についてその特徴を検討した。

材料及び方法

サクユリ及び‘スターゲザー’を交配用の母親、ササユリを花粉親として1992年に交配を行った。交配50~60日後のさやから取り出した種子から各200の胚を摘出し、ホルモン無添加のMS培地を用いて25℃、 $40\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (3,000lx) 12時間照明条件下で培養した。培養開始約3か月後に形成された小球を同種の培地に移植し、1年間培養を続けた。1993年11月に球根の直径が1~2cm程度になったものを選抜し、パーミキュライトに定植した。翌春発芽したものを、MS培地の無機成分の10倍希釈液を半月毎に与えながら養成した後、1994年11月に、川砂とパーミキュライトを等量混合した床土を入れた直径30cmの素焼き鉢に移植し開花まで栽培した。施肥は、液肥（原液成分 N-10%、 P_2O_5 -4%、 K_2O -8%）の300倍液を用いて発芽から開花までの間半月毎に行った。

結果及び考察

サクユリ×ササユリ（この組み合わせを‘SKSS’と記述する）及び‘スターゲザー’×ササユリ（この組み合わせを‘SGSS’と記述する）の組み合わせの交配ではいずれも胚が容易に形成され、交配50~60日後には摘出可能な大きさに生育した。培地に置床した胚は、ほぼ全て発芽したが、発芽後生育がほとんど停止するものや奇形葉を発生するものがみられたため、培養開始3か月後に形が正常で肥大良好な小球を選抜し、新しい培地を入れた植物培養用プラスチックに移植した。選抜できた個体数は、サクユリ×ササユリでは15個体、‘スターゲザー’×ササユリでは70個体であった。その後、1~2か月間隔で培地を更新したところ、植物培養用プラスチックへ移植してから10か月後には一部の球根は直径約2cmまで生育した。また、分球して増殖した個体もみられた。

ササユリやサクユリは地下遅発芽型の発芽習性を持っており、実生栽培した場合には小球形成に10か月、本葉の発生までに17~18か月が必要であるといわれている（鎌田, 1987）。古谷

(1997) は、ササユリの未熟種子から胚を摘出して培養することにより、100日後に3~5mmの小球を得ている。本実験でも同様に、胚培養によって3か月で小球が形成され、合計13か月間の培養で球径1~2cmの球根形成が可能となった。このことから、胚培養法を用いることにより、実生法に比べて1年以上の期間短縮が可能であることが明らかとなった。

本実験では、培養期間中に球根肥大の良好な個体を選抜し、最終的にサクユリ×ササユリの組み合わせで8系統、‘スターゲザー’×ササユリの組み合わせで15系統のクローンを選抜して定植した。サクユリ×ササユリの組み合わせの系統は、‘スターゲザー’×ササユリの組み合わせのものに比べて、培養中の生育が遅く、分球も少ない傾向が見られた。

定植後2年間球根養成した定植後3年目の1996年に、サクユリ×ササユリの組み合わせで4系統、‘スターゲザー’×ササユリの組み合わせで6系統が開花した。さらに、翌年1997年には‘スターゲザー’×ササユリの組み合わせで3系統が新たに開花した。また、栽培は午前中日があたり午後から建物の陰になる場所で行ったが、同じ場所で栽培したササユリには一部葉焼け症状がみられたのに対して、ほとんど葉焼け症状は発生しなかった。1996年及び1997年に開花した系統の特性を表26に示した。

サクユリとササユリの組み合わせで得られた個体は定植後の生育が遅く、また、栽培中に球根の腐るものが多かった。この組み合わせでは定植した8系統のうち4系統（‘SKSS-4’ ‘SKSS-6’ ‘SKSS-9’ ‘SKSS-11’）のみが1996年まで生存し、開花した。1997年には‘SKSS-9’は球根が腐敗したために発芽しなかったが、他の3系統は開花した。これらの系統はいずれも花卉の中央に黄色の筋があり、これはサクユリから遺伝したものと考えられる。また、花卉が淡桃色を帯びるものがみられたが、これはササユリから受け継いだ形質と考えられる。また、カノコユリに見られる鹿子模様やヤマユリに見られるような斑点は見られなかった。サクユリ×ササユリの組み合わせで得られた‘SKSS-11’を図37に示した。花は、花長約13cm、花径約19cmの大輪で、やや下向きに咲き、ササ

表26 交雑個体の生育特性² (1996年, 1997年調査)

系統名	開花年 (年)	開花日 月・日	草丈 (cm)	葉数	葉長 (mm)	葉幅 (mm)	花長 (mm)	花径 (mm)	花の特徴
SKSS-4	1996	6.22	40	13	103	28	90	180	白・花卉に黄筋
	1997	6.19	43	19	130	30	150	160	白・花卉に黄筋
SKSS-6	1996	6.22	38	16	142	30	130	130	淡桃・花卉に黄筋
	1997	6.18	52	23	175	33	150	120	淡桃・黄筋・花ねじれ
SKSS-9	1996	6.17	40	12	115	40	90	180	白・花卉に淡黄筋
	1997	—	—	—	—	—	—	—	—
SKSS-11	1996	6.18	65	13	165	43	130	190	淡桃・花卉に淡黄筋
	1997	6.17	66	28	155	33	125	190	淡桃・花卉に淡黄筋
SGSS-2	1997	6.20	45	14	130	24	100	170	淡桃・鹿子斑点
SGSS-4	1997	6.20	38	15	110	34	95	175	淡赤・白覆輪・鹿子斑点
SGSS-10	1997	6.20	45	16	150	35	80	200	淡赤・桃覆輪・鹿子斑点
SGSS-14	1996	6.17	45	12	135	35	80	180	桃・鹿子斑点
SGSS-16	1996	6.19	47	17	160	33	130	230	淡赤・白覆輪・鹿子斑点
	1997	6.21	35	10	145	28	95	180	赤・鹿子斑点
SGSS-40	1996	6.21	35	10	145	28	95	180	赤・鹿子斑点
	1997	6.20	46	17	145	38	83	170	赤・鹿子斑点
SGSS-47	1996	6.28	58	17	145	30	100	150	桃・白覆輪・鹿子斑点
	1997	6.20	57	15	110	26	105	162	桃・白覆輪・鹿子斑点少
SGSS-53	1996	6.24	65	16	136	45	100	180	桃・鹿子斑点
	1997	6.29	63	22	150	46	130	120	濃桃・鹿子斑点
SGSS-70	1996	6.28	60	18	135	28	125	165	赤・白覆輪・鹿子斑点
	1997	6.20	57	15	110	26	105	162	濃赤桃・白覆輪・斑点

² 各系統とも開花した1～5個体の平均値。



図37 SKSS-11の開花個体
1997年6月17日撮影。



図38 SGSS-47の開花個体
1997年6月23日撮影。



図39 SGSS-70の開花個体
1997年6月23日撮影。

ユリに似た花形となった。花卉はやや波うち、淡い桃色で、花卉の中央にある黄筋はこの組み合わせで得られた系統の中で最もうすく、めだたなかった。また、開花盛期にはきわめて強い芳香があった。葉は、葉長16cm、幅4cm程度で島根県内に自生するササユリのうちで大型のものと草姿がよく似た形になった。前章でPCR-RFLP分析の結果から、サクユリとササユリは遺伝的

に近いことが明らかとなったが、両者の交雑種の草姿がササユリとよく似たものになったことはその結果を裏付けているものと考えられる。草丈は65cm程度で3輪開花した。開花時期は6月中旬ではほぼササユリと同時期となった。花色が濃く花卉に斑点のある品種が多いオリエンタルハイブリッド系品種に比べて、この個体は花色が淡い桃色で、花の中央に斑点がないために

見た目に対して柔らかな印象を与える。この点はササユリの良い点を受け継いでいるものといえ、新品種として有望であると考えられる。また、草丈がやや低いことから、切り花よりもむしろ鉢植えとして利用価値が高いものと考えられる。

サクユリ×ササユリの組み合わせでは、このほかに花がねじれる系統（‘SKSS-6’）がみられた。花の大きさは‘SKSS-11’とほぼ同じであったが、やや波うった花弁が重なったままねじれているために十分に開花せず、半開きのままの状態になった。サクユリもササユリも花弁のねじれはみられないことから、この形質の由来は明らかではない。また、サクユリとササユリの組み合わせでは白色と淡桃色（あるいは桃色）の個体があらわれた。サクユリは白色、ササユリは淡桃色であり、交雑個体にみられた淡桃色はササユリから受け継いだものであると考えられる。今後、淡桃色の系統の自殖種子から得られたF₂個体を用いてRAPD分析など詳細な調査をすることにより淡桃色のRAPDマーカーを検索できる可能性があると思われる。

‘スターゲザー’とササユリの組み合わせで得られた交雑個体は、サクユリとササユリの組み合わせで得られたものに比べて、培養中の球根肥大が速い傾向がみられた。その結果、15系統の球根肥大の良好な個体を得られた。‘スターゲザー’×ササユリの交雑個体で、定植した15系統のうち6系統が1996年に、3系統が1997年に初めて開花した。開花時期はサクユリ×ササユリよりもやや遅く、6月下旬となった。この組み合わせで得られた系統は、濃赤、赤、桃色などの赤色を持ち、すべて‘スターゲザー’から受け継いだ鹿子模様となる濃赤色の斑点を持っていた。

図38と図39にそれぞれ‘SGSS-47’と‘SGSS-70’の開花状況を示した。‘SGSS-47’はわずかに波うつ花弁でヤマユリ型の花径約15cmの花を6月下旬に咲かせた。強い芳香があったが、‘SKSS-11’よりやや弱かった。花色は、花弁の中央が桃色で花弁の外側は白く縁どりされていた。花弁の基部に濃赤の斑点が少しみられたが、‘スターゲザー’ほど多くはなく、比較的目立たなかった。草丈は60cm程度で3～4輪の花がついた。花全

体が淡い色彩となり、‘SKSS-11’と同様に柔らかな印象を与える花であった。やや派手さは残るものの、ササユリの風情に近づいた雰囲気を得られたと思われる。

‘SGSS-70’はササユリと同様な形で濃赤桃色の花径約16cmの大輪の花を付けた。花弁の周囲は白く、基部に近づくほど色が濃くなった。花の基部に濃赤色の斑点がみられたが、花弁基部の色が濃いために目立たなかった。花弁の裏にも赤い色素が発現しており、十分に開ききらない花も赤桃色に見えた。草丈は‘SGSS-47’とほぼ同じ60cm程度であった。花が大きいのに対して茎がやや細いため開花最盛期には花の重さで茎が垂れ下がる傾向があった。したがって、切り花や鉢植えなどの実用品種として使うことは困難であると考えられるが、花弁の裏側にも色素が発現し、花弁が開ききる前にも花色がよくわかる特徴があるので、今後の品種改良のための親として利用できる可能性が認められた。

本研究では育種目標として「栽培容易でササユリのような繊細で清楚な風情」を取り上げたが、今回開花した交雑種はいずれも母親であるサクユリや‘スターゲザー’の形質を受け継ぎ、大輪でやや派手な花を持つ系統が多かった。しかし、中には‘SKSS-11’や‘SGSS-47’のように柔らかな印象を与える花もあり、実用品種として利用できる可能性も認められた。また、半日日光のあたる場所で栽培した結果では、ササユリに比べて葉焼け症状が少なく、生育も良好であった。詳細には今後の栽培試験の結果を待たなければならないが、ササユリよりも栽培は容易であると考えられる。当初の育種目標を実現するためには、ササユリをさらに戻し交配することにより、形質をササユリに近づけていく必要があるものと考えられる。

第2節 育成した新系統への液体振とう培養の応用

ササユリなどの野生種を親としたオリエンタルハイブリッド系の品種は、実生から開花するまでに長期間を要する。そこで、品種改良を短期間で進めるためには開花までの期間を短縮する必要がある。しかし、ササユリ及びサクユリの種子は地下遅発芽性であり、休眠打破のため

には一定期間の低温と高温を経る必要があり、本葉が地上に現れるまでに17~18か月を必要とする(鎌田, 1987)。本研究では、前節の種間交雑種を育成する過程で、未熟種子から摘出した胚を培養することによって直ちに発芽させ、3~6か月で小球を形成させその後本葉も発生させることができた。これによって、従来の実生法に比べて1年以上開花までの期間を短縮することが可能となった。

また、育成された新品種は、普及に移すためには多数の球根を養成し、実証圃などで栽培試験を行う必要がある。しかし、りん片繁殖を行った場合、開花球を得るためには長期間の球根養成期間が必要であり、新たに開発された新品種も生産現場に普及するまでに長い年月が必要となる。

そこで、第II章で検討したササユリの球根肥大促進に顕著な効果のあった液体振とう培養を、‘スターゲザー’とササユリの交雑個体に対して適用し、その効果を検討した。

材料及び方法

供試材料として、前節で示した‘SGSS-47’、‘SGSS-53’、‘SGSS-70’及び対照としてササユリ‘T2-11B’を用いた。これらの系統のりん片切片をホルモンフリーMS培地で培養して得られた小球を用いて、明条件(3,000lx, 12時間照明)で液体振とう培養(100rpm)を行った。培地は第II章第5節で示した球根肥大用培地を用い、150mlの培地を入れた300ml容三角フラスコに各10個の小球を入れて実験を行った。フラスコは各系統それぞれ3個ずつ用いた。培養期

間は合計90日とし、30日毎に培地の更新と球根重量の測定を行った。培養開始時の球根重量が系統ごとに異なったため、重量変化の比較は、培養開始時の重量を1として測定時の重量から算出した指数を用いて行った。

結果及び考察

重量指数の経時変化を表27に示した。ササユリ‘T2-11B’は1か月で約2倍ずつ重量が増加し、3か月後には培養開始時の約11倍になった。これに対して、本研究で育成した系統では、‘SGSS-53’がササユリ‘T2-11B’とほぼ同じ経過をたどり3か月後には約11倍の重量になった。‘SGSS-70’はササユリ‘T2-11B’より重量増加速度が大きく、約2倍の速度で増加して3か月後には培養開始時の約23倍の球根重量になった。これに対して、‘SGSS-47’ではササユリ‘T2-11B’より重量増加率が小さく、3か月後で約6倍の重量になった。これらの育成系統はいずれも‘スターゲザー’とササユリの交雑実生個体であるにもかかわらず、球根重量の増加率に大きな差がみられた。

また、ササユリ‘T2-11B’では培養中の葉と根の発生はほとんど観察されなかったが、‘SGSS-47’では培養開始1か月頃から葉と根の発生がみられ、培養終了時の3か月後にはフラスコ内いっぱいに充満するほどになった。‘SGSS-53’と‘SGSS-70’では‘SGSS-47’よりやや遅れて、培養開始2か月後頃から葉と根の発生がみられたが、その発生量は‘SGSS-47’よりも少なかった。このことから、供試した‘スターゲザー’とササユリの交雑個体は、液

表27 交雑個体の液体振とう培養による球根肥大

系統 ^a	培養開始時 球根重量(g)	球根重量の指数 ^b		
		30日後	60日後	90日後
(交雑個体)				
SGSS-47	0.95	2.10±0.21 [*]	3.99±0.20	6.52±0.45
SGSS-53	0.59	2.79±0.31	6.25±1.24	11.42±2.48
SGSS-70	0.26	3.51±0.18	11.87±1.09	22.84±1.95
(ササユリ)				
T2-11B	0.22	2.65±0.25	5.58±0.85	11.17±1.84

^a SGSS-47, SGSS-53, SGSS-70: ‘スターゲザー’×ササユリ。

^b 培養開始時の球根重量を1として算出。

^{*} 標準誤差。

体振とう培養においてササユリよりも根が発生しやすいものと考えられる。第Ⅱ章第4節でササユリの根の発生が培地中の NH_4^+ 濃度によって影響され、球根肥大用培地では根の発生はみられないことを示したが、本実験から、根の伸長を阻害する NH_4^+ に対する感受性が系統により大きく異なることが示唆された。また、本実験は明条件で行ったが、発生した葉は濃い緑色になり、細胞内の葉緑体が発達したことが推定される。その結果、第Ⅱ章第5節で述べたように窒素吸収量が増加して培地から NH_4^+ が消失し、根の発生が促進されたために根の伸長が促された可能性も考えられる。根の発生を抑え、球根肥大をさらに促進するためには、培地の更新期間の短縮あるいは培地成分の改変を検討する必要がある。

以上のように本実験から、ササユリを片親にした交雑個体でも、生育状況に差がみられるものの、液体振とう培養によって球根が急速に肥大することが明らかとなった。他のオリエンタルハイブリッド系品種に対しても利用可能と考えられるので、今後検討する必要がある。

第Ⅴ章 総合考察

ササユリ (*Lilium japonicum* Thunb.) は、本州中部地方以西、四国地方及び九州の一部に分布している日本固有種である。日本絶滅危機植物図鑑 (岩槻, 1994) には、*Lilium* 属に含まれる種または変種の中で、絶滅危惧種としてタモトユリ (*L. nobilissimum* Makino), 危急種としてウケユリ (*L. alexandrae* hort. Wallace), ヒメユリ (*L. concolor* Salisb.), ジンリョウユリ (*L. japonicum* var. *abeanum*), ミヤマスカシユリ (*L. maculatum* var. *bukoanense* (Honda) Hara), ヤマスカシユリ (*L. maculatum* var. *monticola* Hara) が掲載されている。本研究で取り上げたササユリはこれらの中には含まれておらず、現段階では絶滅にひんしているような危機的状態であるとはいえない。実際、島根県内を調査したところ、山間部では現在でも各地で自生地が確認された。しかし、ササユリが多く自生している「里山」と呼ばれる人家と山林の中間の領域 (第Ⅰ章図2参照) では、人の手が入らなく

なるとともに次第に丈の高い樹木が生い茂るようになり、ササユリの生育に適した環境が少なくなりつつある。また、人口の多いところや人や車の通行量の多いところでは、美しく香りの高いササユリは開花するとすぐに採取されることが多い。今後も中山間地での人口の減少や開発による環境変化が続く限りササユリ自生地も確実に減少していくものと考えられる。

切り花として人気の高いオリエンタルハイブリッド系のユリは、日本原産のササユリ、ヤマユリ、カノコユリなどがもとになって育成されている。しかし、その品種改良は、原産地である日本よりもむしろアメリカ、ヨーロッパあるいはオーストラリアで盛んに行われており (岡崎, 1993), ‘カサブランカ’ ‘スターゲザー’ ‘ル・レーブ’ など多くの品種が育成されている (国重, 1993)。また、近年球根の隔離検疫制度の廃止によってオランダからのユリ球根の輸入が増加しており、今後さらに海外で育成された多様なユリの新品種が輸入される可能性がある (国重, 1993)。このように、日本原産のユリをもとにした品種改良が、日本よりもむしろ外国で盛んに行われていることは残念なことである。とくに、近畿及び中国地方はササユリ自生地の中心に位置しており、第Ⅲ章3節で明らかにしたように自生個体の遺伝的多様性が維持されている。そこで、遺伝資源として重要なササユリの自生地である島根県の中山間地域でも、その立地条件を生かして花き園芸の振興にササユリを利用すれば地域の活性化がはかれるものと期待される。減少しつつあるとはいえ、自生個体数の多い今のうちに、ササユリを園芸資源として活用する方法を確立しておく必要がある。

ササユリの利用方法としてはまず第一に切り花あるいは鉢物としての利用が考えられる。‘カサブランカ’ などの豪華なオリエンタルハイブリッド系の品種とは対照的な繊細で清楚な美しさを持ったササユリは、茶花や和室用の生け花に利用されている。良質な製品を生産するためには、花や葉の形、色などについて良い形質を持ったものを選抜し、増殖することが必要である。ササユリの優良系統を大量に生産する際に必要な大量増殖技術については、りん片切片の培養 (浅尾ら, 1992; 市川, 1993), カルスを利用

用した増殖法 (Fukui, 1989; 水口ら, 1994a, 1995, 1996; 水口・大川, 1994b, 1994c, 1995), 苗条原基による方法 (Tanaka, 1991) など多くの報告があり, ほぼ実用段階に達していると考えられる。しかし, 増殖した小球根が開花するまでに長い年限を要するという問題点がある。

本研究では, 液体振とう培養を用い, りん片切片の培養によって得られた小球根を半年間で約3gにまで生育させることに成功した。その培養方法のフローチャートを図40に, 培養液組成を表28に示した。培養材料として, りん片切片をホルモンフリーMS培地で培養して得られた0.1~0.3g程度の小球根を用いる。また, 他の実用化された大量増殖法で得られた小球根を用いても良い。これらの小球を250mlの球根肥大用培地 (BEM) を入れた500ml容三角フラスコに入れて明条件100rpmで振とう培養する (第II章図4参照)。約半年間培養した後, 培地を根伸長用培地 (REM) にかえて発根を促す。なお, 振とう培養する場合には空気の流通をよくするためにサンキャップシート (岩城硝子) などの除菌フィルター付シートでふたをすることが必須である。発根した球根は, 固形培地を入れた植物培養用フラスコに移植して, 0~5℃で約3か月間低温処理を行う。球根肥大時に照明を行って球根肥大を促進した場合には処理期間を1か月間程度延長する方がよい。低温処理終了後パーミキュライトに定植すると, ただちに発芽してくる。

以上の方法では, 500ml容三角フラスコに約20~30個の小球を入れて培養を行い, フラスコを6個同時に振とうできる小型の振とう培養機1台を用いた場合には合計約150個の球根を約半年間で養成することが可能である。そして, 生産された球根は定植2年後に開花が期待される。この方法は, 茶花あるいは季節の花として年間1,000本程度の生産を目標とする山間部の小規模産地に適した方法である。また, 最近各地で建設されている農村体験施設などの公園内に短期間でササユリを開花させて環境整備に利用する場合にも有効な方法であると考えられる。

ササユリを園芸作物として利用するためには, 栽培容易な品種の育成が必要である。そのためには, 栽培容易な系統の選抜あるいは系統間の

交配による新品種の育成が有効であると考えられる。Vavilovの「遺伝子中心説」によれば作物の原種の発生中心地には変異が多数蓄積されている (松尾, 1970) と考えられ, ササユリの自生地域である西日本各地には様々な変異を持った遺伝子が存在していることが期待される。第III章第3節に示したDANによるササユリ自生個体の比較結果によれば, ササユリ分布地域の西部 (中国, 四国地方) と東部 (近畿, 東海地方) の自生個体に遺伝的な差のある可能性が示唆された。遺伝的に離れた個体どうしを交配すると, 雑種強勢によって草勢が強く栽培容易な系統を育成できる可能性がある。そこで, 本研究で遺伝的に大きな差のあることが明らかとなった島根県産のササユリと静岡県産, 奈良県産あるいは和歌山県産のササユリを交配することにより優良個体が生まれる可能性が考えられる。今後

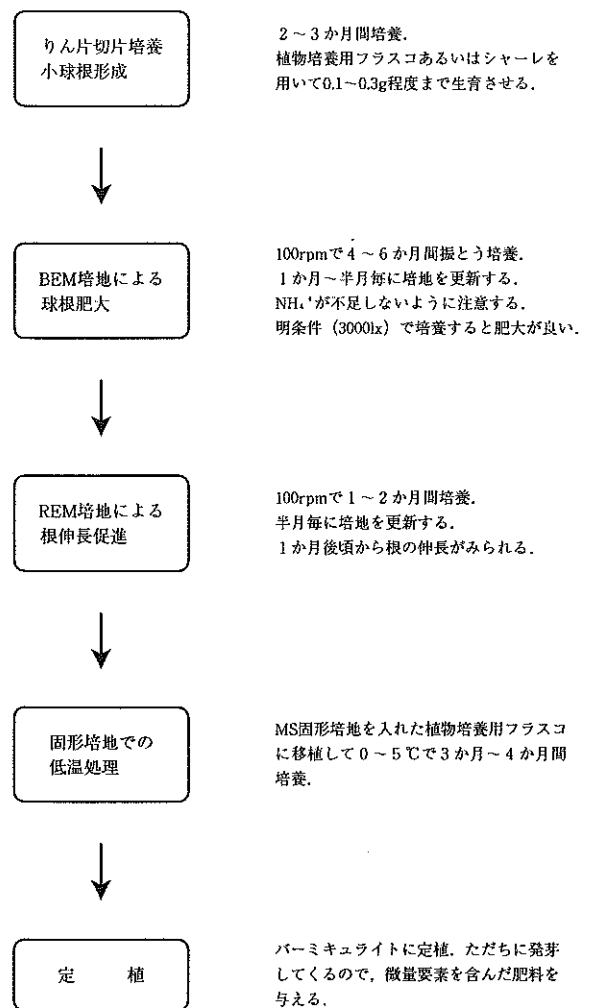


図40 ササユリ球根の液体振とう培養のフローチャート

表28 ササユリ球根の液体振とう培養における培地組成

成分	球根肥大用培地	根伸長用培地
	(BEM) ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	(REM) ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)
NH_4NO_3	1650	
KNO_3	1900	1900
NaNO_3		3400
KH_2PO_4	170	170
$\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	390	390
$\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	440
$\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	370
$\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.8	27.8
$\text{NaEDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37.3	37.3
KI	0.83	0.83
$\text{MnSO}_4\cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.3	22.3
H_3BO_4	6.2	6.2
$\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.6	8.6
$\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25	0.25
$\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025	0.025
$\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025	0.025
myo-Inositol	100	100
Nicotinic acid	0.5	0.5
Pyridoxine HCl	0.5	0.5
Thiamine HCl	0.1	0.1
Glycine	2	2
Glucose	30,000	30,000

NaOHでpH5.8に調整。

の検討が必要である。

ササユリの第二の利用法として、育種素材としての利用があげられる。オリエンタルハイブリッド系品種では、‘カサブランカ’に代表されるような豪華な花をもつ新品種が毎年多数発表されている(高木, 1995, 1996, 1997)。本研究では、香りが強く、繊細で、清楚なササユリの特長を生かした品種育成をめざして、第Ⅲ章第2節でササユリと遺伝的に近いことが明らかとなったサクユリとオリエンタルハイブリッド系品種の‘スターゲザー’を母親、ササユリを花粉親として交配し、いくつかの雑種個体を得ることができた。いずれの組み合わせでも淡桃色の花色を持った花が現れ、オリエンタルハイブリッド系の品種ではあまりみられない、淡い花色をもち見る人に柔らかな印象を与える花を育成することができた。これらの品種は、現在流通しているオリエンタルハイブリッド系品種のすき間を埋めるものとして利用できる可能性がある。今後、詳しい形質調査とともに、切り花あるいは鉢物としての適応性を検討する必要

がある。また、これらの育成系統をササユリによりいっそう近づけるために、ササユリを戻し交配することも必要と考えられる。

図41に本研究で用いた培養による品種育成法と従来から行われている実生法の比較図を示した。ササユリ種子は地下遅発芽性で秋に播種した場合には地上に本葉がでてくるのに17~18か月必要であるといわれている(鎌田, 1987; 清水, 1987a)。また、球根の肥大速度は遅く、開花までに3から4年が必要である。これに対して、本研究では「培養法1」に示したように交配後50~60日のさやから胚を摘出し、胚培養を行った。この方法では、摘出した胚は置床後ただちに発芽し、胚培養開始後3か月程度で小球が形成される。さらに、その小球を移植すると1年後には球径1~2cm程度まで生育する。この結果、小球形成までの期間を実生法に比べてほぼ1年間短縮することができた。さらに、定植後に発芽した時点で、球根の大きさが実生法による同時期の球根に比べて大きいため、開花までの年限が短縮される。実際、本研究では開

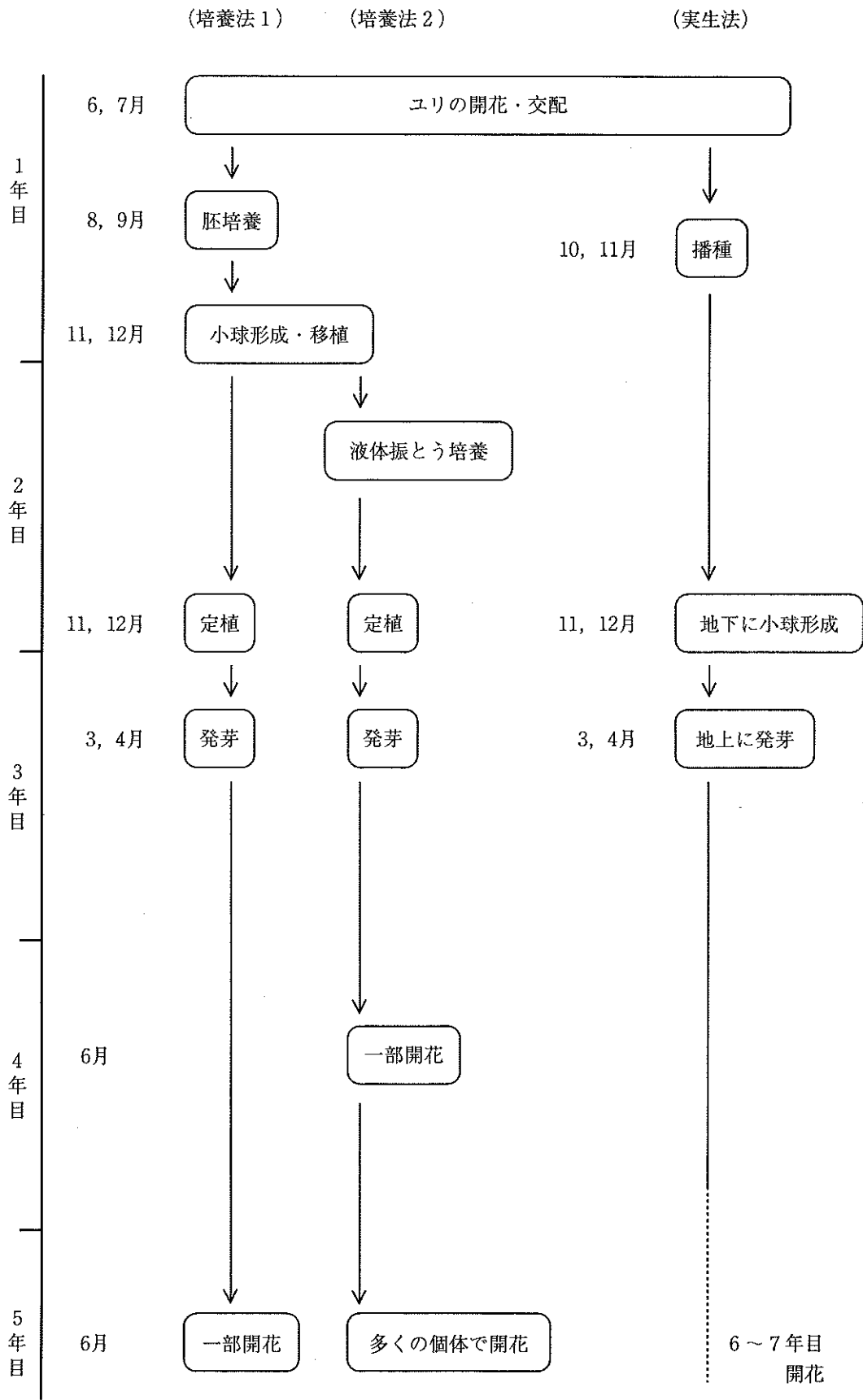


図41 培養と実生によるユリの新品種育成法の比較
 実生法は鎌田 (1987) の記述をもとにして作成.

花交配後1年3か月間の培養の後、さらに2年半後、すなわち交配から4年後の初夏に早いものでは開花個体がみられ、従来の実生法に比べて開花までの期間を1年以上短縮することができた。また、育成した品種を組織培養で増殖することを前提として、培養中に生育良好なものを選抜したことから、本研究で育成された系統は、実生個体を培養した場合に比べて短期間で開花に至るものと考えられる。

「培養法1」に第II章で示したササユリ球根の肥大促進のための液体振とう培養法を組み合わせたものを「培養法2」として示した。この方法は、第IV章第2節でササユリを片親にした交雑個体に対しても適用できることが明らかとなった。したがって、胚培養によって形成された小球根を用いた場合でも、約半年間液体振とう培養することによって球根肥大を促進させることができるものと考えられる。液体振とう培養では固形培地に比べて約2倍の球根肥大速度が得られるので、定植時点では「培養法1」よりも大きな球根を定植することが可能である。そのため、ササユリを用いた研究結果から推測すれば翌年つまり交配から3年後に一部が開花するものと考えられ、実生法に比べて大幅に開花までの期間を短縮できる可能性がある。

オリエンタルハイブリッド系のユリ、特にササユリやサクユリなどの地下遅発芽性のユリを親とした品種改良では、開花までに長い年月がかかり、新品种の開発が容易に進まないという問題点があった。しかし、今回検討した胚培養と液体振とう培養による球根肥大促進効果を組み合わせる方法により、従来よりも短期間で開花球を得ることができ、今後ユリの品種改良が促進されるものと考えられる。また、従来は育成された品種の増殖はりん片繁殖で行われていたため、優良個体が得られても産地で大量に栽培できるようになるまでに10年近くの年月が必要であった。しかし、組織培養による大量増殖法が確立した現在では短期間で普及することができる。さらに、本研究で試みたように、培養条件下で球根肥大の良好なものを選抜することにより、培養による増殖に適した品種の育成も可能になるものと考えられる。

摘 要

ササユリは、本州の中部地方以西、近畿、中国、四国地方及び九州の一部をおもな分布域としている。近年、各地でササユリを地域特産作物にするために栽培が試みられているが、他のユリに比べて栽培が難しく、また開花球養成までに要する期間が長いことから、市場へ出荷している産地はごく少ない。また、均一な球根を多数入手することが困難であるため、栽培試験もほとんど行われていない。さらに、ササユリは、オリエンタルハイブリッド系の品種育成において桃色の花を得るために利用されているが、その利用頻度はヤマユリやカノコユリに比べて少ない。したがって、ササユリを園芸植物として利用するためには、開花可能な球根の大量生産法の確立と栽培容易な品種の育成が必要である。

そこで、これらの問題点を解決するために、*in vitro*での増殖と球根肥大の促進、ササユリ近縁種の類縁関係の解明と種間交雑種の親の推定、さらにササユリをもとにした育種の可能性の検討という三方向から本研究を進めることとした。

1. ササユリ球根の増殖と液体振とう培養による球根肥大促進

1) りん片切片をMS培地で2か月間培養したところ、IAA0.1~1.0mg/l添加区で1切片当たり0.7~2.8個の小球が得られた。これらの小球を用いて固形培地による静置培養と液体培地での振とう培養を行い、両者を比較したところ、液体振とう培養の方が球根肥大が良好であった。

2) 培養温度については25℃に比べて20℃で肥大が良好であった。この原因として、25℃では吸収した糖を呼吸により消費したことが考えられる。また、20℃で培養した球根を0℃で3か月間低温処理した後定植した場合に、発芽率および抽だい率が高かった。

3) ショ糖、マルトースまたはブドウ糖をMS培地に添加したところ、ショ糖は吸収される前に培地中でブドウ糖と果糖に分解されることが示された。ショ糖6%添加区ではブドウ糖と果糖の生成量はその吸収量より多いため培地の浸

透ポテンシャルが低下し、球根の肥大を阻害する現象がみられた。マルトースはほとんど吸収されなかった。培地に用いる糖としてはブドウ糖が最も適しており、3%が適量であった。

4) ササユリの液体振とう培養における培養液の無機多量要素の濃度変化を調査したところ、 H_2PO_4^- 、 SO_4^{2-} 及び NH_4^+ の減少率が高く、特に H_2PO_4^- は培養開始後急速に減少した。これに対して、 K^+ 、 Mg^{2+} 及び Ca^{2+} の減少率はごくわずかであった。

5) NH_4^+ 濃度は、 NO_3^- 濃度が40~50mMの場合、20~10mMが適当であり、 NO_3^- のみあるいは NH_4^+ 30mM以上では球根の肥大が劣った。 NO_3^- のみの培地では根の伸長がみられた。また、 NH_4^+ にかえてグルタミン (GLN) を添加した場合にも根の伸長がみられたことから、 NH_4^+ には根の伸長を阻害する作用があるものと考えられる。さらに、発根した球根は定植後の発芽率および抽だい率が高いことが明らかとなり、 NH_4^+ を含む培地で球根を肥大をさせた後、 NO_3^- のみの培地で発根させ定植すると良い結果が得られた。

6) H_2PO_4^- は高濃度に添加しても、球根肥大には影響しなかったが、培地からの吸収量は高濃度で培養した場合に多くなった。また、定植後の発芽率も H_2PO_4^- 高濃度培地で高く、吸収された H_2PO_4^- の影響が認められた。 SO_4^{2-} を高濃度で添加した場合には球根肥大が劣った。

7) 生体重0.3~0.4gの小球根を、糖の種類と濃度を変えた3種類の培地を用いて165日間明条件及び暗黒条件で液体振とう培養した結果、照明によって著しく球根肥大が促進された。球根の肥大が最も良好であったのはブドウ糖3%添加培地を用いた照明区で、培養終了時の生体重は約5.3gであった。糖、 NH_4^+ 、 NO_3^- 、 H_2PO_4^- 及び K^+ の積算吸収量は暗黒条件に比べて明条件が有意に多かった。また、 Mg^{2+} も多い傾向が認められた。これに対し、 Ca^{2+} の積算吸収量と照明の有無には一定の傾向は認められなかった。また、明条件での球根の重量増加割合は糖の吸収量増加割合とほぼ等しかったことから、照明の球根肥大に対する促進効果は光合成のためではなく、培地からの糖の吸収促進のためであると推定された。

8) 以上の結果から、3%ブドウ糖添加培地

を用いて照明条件下で液体振とう培養することにより、5~6か月間の短期間で0.3~0.4gの小球根を約5g (球周約9cm)まで肥大させることが可能となった。

2. 数種のユリ及び自生ササユリのPCR-RFLP/RAPD分析

ユリ属 (*Lilium*) に含まれるササユリ (*L. japonicum*)、オトメユリ (*L. rubellum*)、タモトユリ (*L. nobilissimum*)、カノコユリ (*L. speciosum*)、ヤマユリ (*L. auratum*)、サクユリ (*L. auratum* var. *platyphyllum*)、キカノコユリ (*L. henryi*)、チョウセンヒメユリ (*L. concolor* var. *pulchellum*)、コオニユリ (*L. leichtlinii* var. *maximowiczii*) の9種類及び種間雑種のシンテツポウユリ (*L. × formolongi*) についてPCR-RFLP分析を行った。

1) ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase 大サブユニット (rbcL) 遺伝子と核のリボソームRNA (rRNA) 遺伝子内の特定の領域を増幅したPCR産物を20種類の制限酵素で消化したところ、いくつかの多型が観察された。

2) 供試したユリは、rbcL遺伝子とrRNA遺伝子を用いたPCR-RFLP分析の結果から6グループに分けられた。また、*Archelirion* 及び*Sinomartagon* に含まれる種はそれぞれ別のグループに分けられた。さらに、*Archelirion* の6種は3つのサブグループに分けられた。以上の結果から、ユリの分類にPCR-RFLPを利用できる可能性が認められた。

3) 6種のユリ、サクユリ、ササユリ、カノコユリ、タモトユリ、ヤマユリ及びヒメサユリを4組のプライマーと22種の制限酵素を用いて分析し、16本のPCR-RFLPマーカーを検出した。

4) シンテツポウユリ、カノコユリ及びその交雑個体において、母親の葉緑体遺伝子にみられたPCR-RFLPマーカーは全ての交雑個体にみられ、交雑個体の核のrRNA遺伝子にあるマーカーは、母親と花粉親のバンドパターンを合わせたものになった。したがって、PCR-RFLP分析は、交雑品種の親の推定に利用できるものと考えられた。

5) PCR-RFLP分析によりオリエンタルハイブリッド系品種とよばれる6品種の交配親を推定したところ、'カサブランカ'、'サマードレス'

及び‘ピンクパール’の細胞質はカノユリ由来であり、‘スターゲザー’、‘ル・レーブ’及び‘マルコポーロ’の細胞質はサクユリあるいはササユリからきているものと考えられた。一方、これらの品種の花粉親が交雑種の場合には交配時にマーカーが分離する可能性を考慮する必要があるため、花粉親の特定は困難であった。

6) 自生ササユリについて、10塩基のランダムプライマーを用いたRAPD分析とUPGMAクラスタ分析を行った結果、島根県内に自生するササユリは、採取地による明瞭な差はみられず、類似度係数0.588のレベルで同一のクラスターに含まれた。また、愛媛県に自生するササユリは島根県のササユリのクラスターに含まれた。また、これらのササユリは奈良県、和歌山県及び静岡県に自生するササユリと区別された。島根、愛媛、奈良及び和歌山県に自生するササユリと静岡県に自生するササユリの類似度係数は0.428であり、前者とヒメサユリの類似度係数は0.429であった。この結果から、ヒメサユリはササユリの変異のなかに含まれる可能性があること及びササユリには自生地によって大きな変異のあることが示唆された。以上の結果から、島根県に自生するササユリを基にした雑種強勢の利用による品種改良を行う場合には、RAPD分析によって遺伝的に遠縁であることが明らかとなった静岡県あるいは和歌山県産のササユリを交配に用いることが望ましいと考えられる。

3. ササユリを片親にした異種間交雑による新品種の育成

1) 繊細で清楚なササユリの特徴を受け継いだ品種を育成するために、ササユリと遺伝的に近いことが明らかとなったサクユリと‘スターゲザー’にササユリを交配した。サクユリとササユリの交配からは、淡桃色でササユリと似た花形の大輪の花が咲く‘SKSS-11’が選抜できた。また、‘スターゲザー’とササユリの組み合わせからは、淡桃色中輪で柔らかな印象を与える花を持つ‘SGSS-47’が選抜できた。いずれもササユリとはやや異なった形質を持つ花となったが、現在市販されているオリエンタルハイブリッド系の品種に比べて花色が淡く、柔らかな印象を与えることから、実用品種あるいは

品種改良のための交配親として利用できる可能性が認められた。

2) 液体振とう培養法により、‘SGSS-47’の球根重量は、3か月後には培養開始時の約7倍に増加した。また、‘SGSS-53’は同様にして約11倍に増加した。交雑個体によって肥大率は異なるものの、液体振とう培養法はササユリ以外の交雑種にも有効であると考えられた。

引用文献

- 秋元吉郎(1993)風土記。岩波書店, 93-256.
- Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts and J. D. Watson (1983) 細胞の分子生物学。第3版(中村桂子・藤山秋佐夫・松原謙一監訳)。教育社, 335-399.
- Anonymous (1964) A proposed horticultural classification of lilies for registration, show and catalogue purposes. RHS Lily Year Book 27, 162-164.
- 浅尾浩史・松谷幸子・田中恵子・荒井滋(1992) りん片培養によるササユリの大量増殖。奈良農試研報 23, 1-6.
- 浅尾浩史・岡田恵子・荒井 滋(1994) ササユリ培養子球の生育及び開花特性。奈良農試研報 25, 30-31.
- Asano, Y. (1986) A numerical taxonomic study of the genus *Lilium* in Japan. J. Fac. Agr. Hokkaido Univ. 62, 333-341.
- 浅野義人(1987) ユリの育種技術。日本のユリ(清水基夫編著)。誠文堂新光社, 112-125.
- Comber, H. F. (1949) A new classification of the genus *Lilium*. RHS Lily Year Book. 13, 86-105.
- Deng, Z. N., A. Zentile, E. Nicolosi, F. Domina, A. Vardi and E. Tribulato (1995) Identification of *in vivo* and *in vitro* lemon mutants by RAPD markers. J. Hort. Sci. 70, 117-125.
- 遠藤康弘(1995) 系統解析におけるmatK塩基配列の有効性。バラ科サクラ亜科の解析。種生物学研究 19, 11-17.
- Fabbri, A., J. I. Hormaza and V. S. Polito (1995) Random amplified polymorphic DNA analysis of olive (*Olea europaea* L.) cultivars. J. Amer.

- Soc. Hort. Sci. 120, 538-542.
- Fukui, H., N. Adachi, T. Hara and M. Nakamura (1989) *In vitro* growth and rapid multiplication of *Lilium japonicum* Thunb. Plant Tissue Culture Letters 6, 119-124.
- 福井博一・永瀬幸・中村三夫 (1990) *In vitro*でのササユリ (*Lilium japonicum* Thunb.) の球根肥大に関する研究. 園学雑 59 (別1), 612-613.
- 古谷 博 (1997) ササユリの種子発芽及び種子からの大量増殖について. 園学中四国支部要旨 36, 50.
- Gamborg, O. L., R. A. Miller and K. Ojima (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Experimental Cell Research 50, 151-158.
- Ghareyazie, B., N. Huang, G. Second and J. Bennett (1995) Classification of rice germplasm. 1. Analysis using ALP and PCR-based RFLP. Theor. Appl. Genet. 91, 218-227.
- 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. 園学中四国支部要旨 31, 64.
- 長谷川昭宏・春木和久・斉藤朋子・山田員人 (1995) 液体培養によるワサビ苗の効率的増殖法. 園学雑 64 (別2), 260-261.
- 林 真紀夫・古在豊樹・舘野 稔・富士原和宏・北宅善昭 (1993) 明暗周期が光混合栄養培養条件下におけるバレイシヨ小植物体の生長及び形態に及ぼす影響. 生物環境調節 31, 169-175.
- 姫野正巳 (1989a) 植物別培養一覧表 ユリ 1. バイオホルテイ 2. 誠文堂新光社, 125-128.
- 姫野正巳 (1989b) 植物別培養一覧表 ユリ 2. バイオホルテイ 3. 誠文堂新光社, 120-126.
- 平田熙 (1975) 根における無機イオンの吸収. 物質の交換と輸送 (谷雅樹・宮地重遠・玖村敦彦編著). 朝倉書店, 153-194.
- Hosoki, T., T. Nagasako, D. Kimura, K. Nishimoto, R. Hasegawa, K. Ohta, M. Sugiyama and K. Haruki (1997a) Classification of herbaceous peony cultivars by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 65, 843-849.
- Hosoki, T., D. Kimura, R. Hasegawa, T. Nagasako, K. Nishimoto, K. Ohta, M. Sugiyama and K. Haruki (1997b) Comparative study of tree peony (*Paeonia suffruticosa* Andr.) cultivars and hybrids by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 66, 393-400.
- Hosoki, T., D. Kimura, R. Hasegawa, T. Nagasako, K. Nishimoto, K. Ohta, M. Sugiyama and K. Haruki (1997c) Comparative study of Chinese tree peony cultivars by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. Scientia Hort. 70, 67-72.
- Hughes, K. W. (1981) *In vitro* ecology: Exogenous factors affecting growth and morphogenesis in plant culture systems. Environ. Exp. Bot. 21, 281-288.
- 市川健 (1993) 長期間無継代培養によるササユリ (*Lilium japonicum* Thunb.) りん茎の増殖. 静岡農試研報 37, 103-111.
- Ichihashi, S. and M. Yamashita (1977) Studies on the media for orchid seed germination. I. The effects of balances inside each cation and anion group for the germination and seedling development of *Bletilla striata* seeds. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 45, 407-413.
- Ichihashi, S. (1978) Studies on the media for orchid seed germination. II. The effects of anionic and cationic combinations relevant to seeding populations and culture periods on the growth of *Bletilla striata* seedlings. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 46, 521-529.
- Ichihashi, S. (1979a) Studies on the media for orchid seed germination. III. The effects of total ionic concentration, cation/anion ratio, $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ ratio, and minor elements on the growth. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 47, 524-536.
- Ichihashi, S. (1979b) Studies on the media for orchid seed germination. IV. Influence of the characteristics of some culture media on the growth of orchid seedlings. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 48, 345-352.
- 石破知加子・村田孝弘・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1),

- 486-487.
- 岩槻邦男 (1994) レッドデータプランツ—日本絶滅危機植物図鑑. 宝島社, 195-201.
- Johnson, L. A. and D. E. Soltis (1994) *matK* DNA sequences and phylogenetic reconstruction in Saxifragaceae s. str. Syst. Bot. 19, 143-156.
- Jones, W. R. and P. Jandik (1991) Controlled changes of selectivity in the separation of ions by capillary electrophoresis. J. Chromatogr. 546, 445-458.
- 加藤香織・石破知加子・田村文男・田辺賢二・角田真子 (1994) 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3報) 振とう培養時の糖濃度と植付量が培養小球の肥大に及ぼす影響. 園学雑 63 (別1), 524-525.
- 鎌田慶三 (1987) ユリの実生法. 日本のユリ (清水基夫編著). 誠文堂新光社, 132-136.
- 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継時変化, 子球の生長に及ぼす培養温度の影響. 園学雑 61 (別1), 446-447.
- 河原林和一郎 (1993a) ササユリ球根の *in vitro* における増殖に及ぼす液体通気培養の影響. 園学雑 62, 197-205.
- 河原林和一郎 (1993b) 組織培養によるササユリ子球生産の実用化. 園学雑 62, 611-618.
- 河原林和一郎 (1995) 簡易液体通気培養で増殖したササユリ球根の開花促進. 園学雑 64, 401-410.
- 北宅喜昭・富士原和宏・古在豊樹 (1995) 植物組織培養苗生産における物理環境調節. 生物環境調節 33, 1-6.
- 北村四郎・村田源・小山鐵夫 (1976) 原色日本植物図鑑. 草本編Ⅲ 単子葉類. 保育社, 126-131.
- Kobayashi, N., R. Takeuchi, T. Handa and K. Takayanagi (1995) Cultivar identification of evergreen azalea with RAPD method. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 64, 611-616.
- 小泉薫・金子英雄・田中雅生・鈴木徹・田部井豊・萱野暁明・下村正二 (1997) スカシユリの品種分類のためのRAPD法の条件検討. 園学雑 66 (別1), 408-409.
- Kozai, T., B. R. Jeong, C. Kubota and Y. Murai (1995) Effects of volume and initial strength of medium on the growth, photosynthesis and ion uptake of potato (*Solanum tuberosum* L.) plantlet *in vitro*. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 64, 63-71.
- 久保田保・山村清 (1982) ササユリの栽培技術体系の確立に関する研究. (第1報) ササユリの自生地の環境と生育. 園芸中四国支部要旨 21, 49.
- 国重正昭 (1993) 生産・消費の現状. 花専科* 育種と栽培. ユリ (国重正昭編著). 誠文堂新光社, 1-5.
- 桑野和民・酒巻千波・三田村敏男 (1987) HPLCによるアミノ酸の高速分析—PITCによるプレカラム誘導体化の利用—. 農芸化学会誌 61 (1), 53-55.
- Leslie, A. C. (1982) The international lily register, 3rd edit. The Royal Horticultural Society, 8-9.
- 増田芳雄 (1994) 植物生理学[改訂版]. 培風館, 43-262.
- 松尾孝嶺 (1970) 育種学 (改訂増補第3版). 養賢堂, 8-21.
- 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.
- 水口茂・大川勝徳 (1994a) ササユリの母りん片白色カルス由来の子球の発育に及ぼすナフタレン酢酸とベンジルアデニンの影響. 園学雑 63, 429-437.
- 水口茂・大川勝徳 (1994b) ササユリの母りん片培養における切断及び植物ホルモン処理の子球形成に及ぼす影響. 生物環境調節 32, 239-243.
- 水口茂・大川勝徳 (1995) ササユリのりん片培養による再生子球由来の球根の発育に関する研究. 生物環境調節 33, 23-29.
- 水口茂・山下理恵子・大川勝徳 (1995) 自生ササユリ球根の発育とりん片培養による子球形成との関係. 園学雑 64, 605-610.
- 水口茂・大城智弘・池川哲郎 (1996) ササユリ

- りん片培養による再生子球の形成に及ぼす2,4-epibrassinolide とNAA の影響. 生物環境調節 34,15-19.
- Miyajima, D. (1994) Effects of concentration of nutrient solution, plant size at harvest, and light condition before harvest on the ascorbic acid and sugar concentrations in leaves of hydroponically grown komatsuna (*Brassica campestris* L. rapifera group). J. Japan. Soc. Hort. Sci. 63, 567-574.
- 溝添素子・稲垣昇・岡野光生・金地通生・前川進 (1992) ストックの *in vitro* 器官形成に及ぼす外植体前歴ならびに培地内窒素組成の影響. 園学雑 61, 625-633.
- Mohr, H. and P. Schopfer (1995) Plant Physiology. Springer-Verlag, 181-183.
- Moon, E., T. Kao and R. Wu (1987) Sequence of the chloroplast-encoded atpB-atpE-trnM gene clusters from rice. Nucleic Acids Res. 15, 4358-4359.
- Morini, S., P. Fortuna, R. Sciutti and R. Muleo. (1990) Effect of different light-dark cycles on growth of fruit tree shoots cultured *in vitro*. Adv. Hort. Sci. 4, 163-166.
- 村上哲明 (1995) 植物分子系統額の現状と展望. rbcL遺伝子の系統解析における有効性と問題点. 種生物学研究 19, 1-10.
- Murashige, T. and F. Skoog. (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15, 473-497.
- 中村道徳・貝沼圭二 (1989) 澱粉・関連糖質実験法. 学会出版センター, 32-33.
- 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育改善. 園学雑 59, 635-640.
- Niimi, Y. (1995) *In vitro* propagation and post-in vitro establishment of bulblets of *Lilium japonicum* Thunb. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 63, 843-852.
- 西川智太郎・岡崎桂一・長嶺司 (1997) RAPD 分析による茨城県に自生するヤマユリの遺伝的多様性. 育雑 47(別1), 222.
- 西村秀洋・渥美茂明 (1997) ササユリの地理的変異. (第1報) クラスタ分析, 主成分分析による4自然集団の形態形質の解析. 園学雑 66 (別1), 406-407.
- 野田昭三 (1987) 日本列島へのユリの道. 日本のユリ(清水基夫編著). 誠文堂新光社, 98-110.
- 萩原 二 (1966) 伊豆半島におけるササユリ自然集団の核型変異. 染色体 66, 2135-2144.
- 岡崎桂一 (1993) 品種改良の歴史. 花専科*育種と栽培. ユリ(国重正昭編著). 誠文堂新光社, 17-21.
- Ooi, K., Y. Endo, J. Yokoyama and N. Murakami. (1995) Useful primer designs to amplify DNA fragments of the plastid gene matK from angiosperm plants. J. Jpn. Bot. 70, 328-331.
- 大川勝徳・水口 茂 (1993) 能登半島のササユリの核型分析について. 金沢大学理学部付属植物園年報 16, 9-11.
- Ozaki, T., T. Simada, T. Nakanishi, J. Yamamoto and M. Yoshida (1995) RAPD analysis for parentage determination in *Prunus mume* Seib. et Zucc. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 64, 235-242.
- Palmer, J. D., R. K. Jansen, H. J. Michaels, M.W. Chase and J. R. Manhart (1988) Chloroplast and variation and plant phylogeny. Ann. Missouri Bot. Gard. 75, 1180-1206.
- Romesburg, H. C. (1989) 实例クラスタ分析(西田英郎・佐藤嗣二訳). 内田老鶴圃, 11-35.
- 榊原均・鈴木石根・杉山達夫 (1992) 窒素による植物遺伝子の発現制御. 蛋白質核酸酵素 37, 1214-1221.
- Sang, T., D. J. Crawford and T. F. Stuessy (1995) Documentation of reticulate evolution in peonies (*Paeonia*) using internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA: Implications for biogeography and concerted evolution. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92, 6813-6817.
- 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.
- Shimada, T., T. Haji, M. Yamaguchi, T. Takeda, K. Nomura and M. Yoshida (1994) Classification of Mume (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.) by

- RAPD assay. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 63, 543-551.
- 清水基夫 (1987a) ユリの原種とその変種、品種。日本のユリ (清水基夫編著)。誠文堂新光社, 47-97.
- 清水基夫 (1987b) 園芸種のユリとその品種一覧。日本のユリ (清水基夫編著)。誠文堂新光社, 148-165.
- 庄野邦彦 (1972) 培地の組成と作り方。植物組織培養 (竹内正幸・石原愛也・古谷力編著)。朝倉書店, 41-85.
- Smyth, D. R., K. Kongsuwan and S. Wisudharomn. (1989) A survey of C-band patterns in chromosomes of *Lilium* (Liliaceae). Plant Syst. Evol. 163, 53-69.
- 相馬大 (1981a) 白たへの衣。ゆり。花万葉集 (杉本苑子・相馬大編)。光村推古書院, 86-87.
- 相馬大 (1981b) 光の風雨。さゆり。花源氏物語 (杉本苑子・相馬大)。光村推古書院, 70-71.
- Stewart, R. N. (1947) The morphology of somatic chromosomes in *Lilium*. Amer. J. Bot. 43, 9-26.
- 杉山万里・春木和久・山田員人 (1995) RAPD-PCRを利用したワサビクロン間の識別。島根農試研報 29, 109-123.
- 高木俊江 (1995) 種苗法による登録作物品種の紹介 (14)。育雑 45, 251-256.
- 高木俊江 (1996) 種苗法による登録作物品種の紹介 (20)。育雑 46, 397-402.
- 高木俊江 (1997) 種苗法による登録作物品種の紹介 (22)。育雑 47, 89-94.
- Tanaka, A., Y. Hoshi, K. Kondo and K. Taniguchi. (1991) Induction and rapid propagation of shoot primordia from shoot apices of *Lilium japonicum*. Plant Tissue Culture Letters 8, 206-208.
- Takayama, S. and M. Misawa (1979) Differentiation in *Lilium* bulb scales grown *in vitro*. Effect of various cultural conditions. Physiol. Plant. 46, 184-190.
- 高山眞策 (1984) 液体振とう培養による種苗生産の効率化。植物組織培養 1, 8-13.
- 武内俊介・内山 寛・米田和夫・鈴木省三 (1995a) DNA マーカーを用いたバラ野生種及び園芸種の識別と系統。(第2報) PCR増幅した葉緑体DNA断片の制限サイトの多型。園学雑 64(別1), 46-47.
- 武内俊介・鈴木啓以子・内山 寛・米田和夫・鈴木省三 (1995b) DNAマーカーを用いたバラ野生種及び園芸種の識別と系統。(第3報) 葉緑体DNAの母性遺伝といくつかの雑種における母系の推定。園学雑 64(別1), 400-401.
- Tsuji, K., M. Nagaoka and H. Ito (1993) Growth promotion of carrot plantlets *in vitro* by adding supplements of phosphate to MS medium. Environ. Control in Biol. 31, 155-160.
- Tsumura, Y., K. Yoshimura, N. Tomaru and K. Ohba (1995) Molecular phylogeny of conifers using RFLP analysis of PCR-amplified specific chloroplast genes. Theor. Appl. Genet. 91, 1222-1236.
- 渡辺 栄 (1987) 自然交雑種イズユリについて。日本のユリ (清水基夫編著)。誠文堂新光社, 166-168.
- 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.
- Yamagishi, M. (1995) Effects of cold treatment, BA and GA 3 on enlargement and leaf emergence of *in vitro* cultured bulblets of *Lilium japonicum* Thunb. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 64, 367-373.
- Yamagishi, M. (1995) Detection of section-specific random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in *Lilium*. Theor. Appl. Genet. 91:830-835.
- 山村清・久保田保 (1985) ササユリの栽培技術体系の確立に関する研究。(第1報) ササユリの生育試験及び市場性について。園芸中四国支部要旨 24, 48.
- 山崎肯哉 (1982) 養液栽培全編。博友社, 64-81.
- 吉田文武 (1972) 栄養生理研究への利用。植物組織培養 (竹内正幸・石原愛也・古谷力編著)。朝倉書店, 298-316.
- Yonemori, K., D. E. Parfitt, S. Kanzaki, A. Sugiura, N. Utsunomiya and S. Subhadrabandhu (1996) RFLP analysis of an amplified region of cpDNA for phylogeny of the genus *Diospyros*. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 64, 771-777.

Summary

Lilium japonicum Thunb. was mainly native to the region from the Chubu area to the West areas (Kinki, Chugoku, Shikoku area and a part of Kyushu) in Japan. Nowadays cultivation of *L. japonicum* is attempted for one of the original and unique crops in various towns or villages. However, the production areas in which *L. japonicum* is shipped to the market are very few because the cultivation is difficult compared to other lilies, and the period required to flower is very long. Few studies on the cultivation of *L. japonicum* were made because it is difficult to obtain many clonal bulbs in which the characters are uniform. Moreover, although *L. japonicum* is used as a parent to obtain a pink flower for Oriental hybrid cultivars, *L. speciosum* and *L. auratum* are more used. Therefore, for using *L. japonicum* as horticultural crop, it is important to establish the bulb production method and also to breed new cultivars which are easy to culture.

The objectives of this study are divided into three sections. First section is bulb propagation and promotion of bulb enlargement *in vitro*. Second section is clarification of genetic relationships among *Lilium* species or individuals of *L. japonicum*, and tracing parentage of some Oriental hybrids. Third section is study on the possibility of hybridization between *L. japonicum* and other related species.

1. Bulb propagation and promotion of bulb enlargement *in vitro* in *L. japonicum*.

When explants from bulb scales of *L. japonicum* were cultured on Murashige Skoog's (MS) medium containing 0.1-1.0 mg/l IAA for two months, 0.7-2.8 miniature bulbs per explant were formed. These miniature bulbs were cultured on solid medium or in liquid shaking medium. The bulb enlargement in liquid shaking medium is better than on solid medium. Therefore, optimum conditions in liquid shaking culture were investigated in this section.

Bulb growth, as measured by fresh weight increase, in the liquid shaking medium kept at 20°C was better than that kept at 25°C. However, cumulative absorption by the bulbs of NH_4^+ , NO_3^- and glucose from the medium at 25°C was almost equal to that at 20°C. This result suggested that the consumption of sugar at 25°C was greater than that at 20°C.

More bulbs obtained at 20°C sprouted and bolted better compared to those obtained at 25°C when cultured in the MS medium with glucose, chilled at 0°C, potted, and planted in the greenhouse. The chilling period of bulbs for maximum sprouting and bolting was three months.

Sucrose, maltose or glucose was added to the liquid Murashige Skoog's (MS) medium, and their absorption by the bulbs was monitored. A 3% glucose medium was optimum for bulb growth. Sucrose was hydrolyzed into glucose and fructose, which resulted in an increase in osmotic pressure and subsequent suppression of bulb growth. Maltose was little absorbed by the bulbs, and therefore it was ineffective for bulb growth.

For liquid-shaking culture of bulbs of *L. japonicum*, I analyzed the concentration changes in macro-inorganic ions in the culture media to clarify the relationships with bulb growth. Inorganic ions, SO_4^{2-} , NH_4^+ , and especially H_2PO_4^- were consumed in large quantities by the bulbs during culture, whereas K^+ , Mg^{2+} , and Ca^{2+} were consumed in small quantities.

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

Root elongation was promoted by application of NO_3^- as the sole nitrogen source. Root growth was poor in the medium containing a high ratio of $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$. Application of glutamine instead of NH_4^+ promoted root growth. The *in vitro* rooted bulbs sprouted and bolted abundantly after planting in the soil. Based on the above results, bulbs should be cultured first in a medium containing NH_4^+ for bulb enlargement and then transferred to a NH_4^+ free medium for root development. These treatments improved shoot growth after transplanting.

Although the absorption rate of H_2PO_4^- from the medium with the high concentration of NaH_2PO_4 was higher than that from the medium with the low concentration, bulb enlargement was not promoted. High concentration of SO_4^{2-} in the medium inhibited bulb growth.

The effects of illuminating the liquid-shaking culture on the absorption of nutrients by enlarging miniature bulbs of *L. japonicum* were investigated. When bulbs (0.3 to 0.4g FW) were cultured for 165 days under the light or dark condition in the three kinds of liquid media containing different types and concentrations of sugars, light promoted bulb enlargement. A medium with 3% glucose under light was optimum for bulb enlargement; fresh bulb weight reached about 5.3g by the end of the experiment.

Cumulative absorption of sugars, NH_4^+ , NO_3^- , H_2PO_4^- and K^+ by bulbs exposed to light was significantly higher than those grown in the dark; light had no effect on Ca^{2+} and Mg^{2+} absorption.

The gain in fresh bulb weight in the light almost equalled that of sugar absorption by the bulb, which suggests that bulb enlargement was not related to photosynthesis but to promotion of sugar absorption from the medium. Thus, light illuminating the liquid-shaking culture enabled to produce 5g bulbs (about 9cm in circumference) in 5-6 months.

2. PCR-RFLP/RAPD analysis of some lily species or individuals of *L. japonicum*.

PCR-RFLP analysis was applied to classify nine *Lilium* species, *L. japonicum*, *L. rubellum*, *L. nobilissimum*, *L. speciosum*, *L. auratum*, *L. auratum* var. *platyphyllum*, *L. henryi*, *L. concolor* var. *pulchellum* and *L. leichlinii* var. *maximowiczii*, and one interspecific hybrid, *L. × formolongi*. When PCR products amplified in specific regions of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase large subunit (rbcL) gene in chloroplast and nuclear ribosomal RNA (rRNA) gene were digested by 20 restriction enzymes, some polymorphisms were observed.

The examined plants were classified into six groups based on the combined results in rbcL and rRNA gene. The tested species in *Archelirion* and *Sinomartagon* were classified into different groups. Furthermore six species in *Archelirion* were classified into three groups. Thus my study suggested that PCR-RFLP analysis could be used for classification of lilies.

PCR-RFLP analysis was applied to some interspecific hybrid cultivars of lily to verify their probable parentage. Six *Lilium* species, *L. auratum* var. *platyphyllum*, *L. japonicum*, *L. speciosum*, *L. nobilissimum*, *L. auratum* and *L. rubellum*, were analyzed with four pairs of primers and 22 restriction enzymes; among them PCR-RFLP markers, characteristic to each species, were detected.

L. × formolongi, *L. speciosum* and their artificial hybrids derived by embryo culture confirmed that the PCR-RFLP markers in a chloroplast gene of the female parent were inherited by all hybrids, whereas the markers in a nuclear rRNA gene of the hybrids possessed a combined band pattern of the female and pollen parents. Hence, I utilized PCR-RFLP analysis for tracing the parents of interspecific hybrid cultivars.

PCR-RFLP gel patterns were analyzed to trace parents of six lily hybrid cultivars called

Oriental hybrids, 'Star Gazer' 'Le reve' 'Casa Blanca' 'Summer Dress' 'Pink Pearl' and 'Marco Polo'. The data indicate that the cytoplasm of 'Casa Blanca' 'Summer Dress' and 'Pink Pearl' was transmitted from *L. speciosum*, whereas that of 'Star Gazer' 'Le reve' and 'Marco Polo' was inherited from *L. auratum* var. *platyphyllum* or *L. japonicum*. The pollen parents of these hybrids were not completely identified because genetic segregation may have occurred at gametogenesis if pollen parents were interspecific hybrids.

Genetic relationships were estimated by RAPD analysis by using 10-mer random primers in individuals of *Lilium japonicum* Thunb., native to Shimane and other Prefectures.

UPGMA clustering analysis indicated that individuals of *L. japonicum* from various collection sites in Shimane and Ehime Prefectures had no distinct differences from each other and that they belonged to the same cluster at 0.588 level of similarity coefficient. However, they were distinguishable from those native to Nara, Wakayama and Shizuoka Prefs.

Similarity coefficient between *L. japonicum* native to Shimane, Ehime, Nara, Wakayama Prefs., and that native to Shizuoka Pref. was 0.428, and that between *L. japonicum* native to the first four prefectures and *L. rubellum* Baker was 0.429 which suggests that *L. rubellum* was included in the variation of *L. japonicum*. Thus, this species displays a large variation depending on its native habitats.

These results suggest that when creating new cultivars of *L. japonicum* in Shimane Pref., the native parents should be cross with *L. japonicum* from Shizuoka or Wakayama Pref. to instill possible hybrid vigor in the hybrids between genetically remote *L. japonicum* individuals determined by RAPD analysis.

3. Breeding with *L. japonicum* and other species closely related to *L. japonicum*.

For breeding cultivars with delicate and pretty flowers which were inherited from *L. japonicum*, this species crossed to *L. auratum* var. *platyphyllum* or 'Star Gazer' because they were closely related to *L. japonicum*.

'SKSS-11' of which flowers were large, pale pink and shaped like *L. japonicum* was selected from the hybrids between *L. auratum* var. *platyphyllum* and *L. japonicum*. 'SGSS-47' of which flowers were middle-sized, light pink inner dark pink, and with gentle impression, was selected from the hybrids between 'Star Gazer' and *L. japonicum*. 'SKSS-11' and 'SGSS-47' had slightly different characters from *L. japonicum*. Namely, these new hybrids had pale or light pink flowers and gave more gentle impression compared with commercial Oriental hybrid cultivars. Thus it was thought that these new hybrids were original and marketable.

In addition, new system of liquid-shaking culture for promotion of bulb enlargement was attempted to miniature bulbs derived from the scales of new hybrids. The bulb weight of 'SGSS-47' increased to about seven times as much as the weight at beginning of culture after three month culture, and that of 'SGSS-53' increased to 11 times. Although enlargement rate was different by hybrid, this liquid-shaking culture system was very effective for bulb enlargement of new hybrids as well as *L. japonicum*.