

アスパラガスの不定胚利用による大量増殖

浅尾浩史・荒井 滋・小島博文

Micropropagation of *Asparagus officinalis* L. through Somatic Embryos

Hiroshi ASAO, Shigeru ARAI and Hirofumi KOBATAKE

Summary

1. Embryogenic calli were induced from parts of nod and root of mericlones from a second-year-plant of *Asparagus officinalis* L cv. welcome.
2. On inducing embryogenic calli, 2,4-D, 2ip and zeatin were effective. ABA was effective for inducing active growth embryogenic calli.
3. On induction of somatic embryos from embryogenic calli, a low sucrose concentration (0.025M) was suitable. If cell size was less than 1mm, it could be easy to induce somatic embryos.
4. Sucrose in excess of 0.01M and mineral salt were necessary for regeneration plants from somatic embryos and the NH_4NO_3 inhibited plant regeneration some degree.
5. The rate of acclimation for plants from somatic embryos without the MS medium was 100%.

Key words: asparagus, embryogenic callus, somatic embryo

緒 言

本県のアスパラガスは作付面積約14haで、平坦部を中心に栽培されている。一度植え付けると5~6年収穫が続けられることや、栽培管理労力が少なくすむことから、今後とも作付面積の増加が見込まれる。しかし、アスパラガスは種子繁殖であり、開花株にならないと雌雄の判別ができず、収量性の高い雄株だけを栽培することができないこと、雄株の中でも生育差があることなどから生産現場から優良株の苗供給が望まれている。

アスパラガスの大量増殖法については、CHINら¹⁾、MATUBARAら⁵⁾およびYANGら^{7,8)}によって側芽培養法が報告されている。この培養法は、茎の増殖効率は良いが増殖に労力がかかり、安定して正常な根を発生させる条件が確立していないといった問題点がある。一方、甲村ら^{3,4)}と斉藤ら⁶⁾は実生由来植物からの不定胚形成に成功しているが、これでは優良種苗の増殖において実用的ではない。また、平田ら²⁾は圃場から採取した材料からの不定胚形成に成功しているが、効率が悪かつ

た。そこで著者らは、現場から主要品種であるウェルカムの優良株を採取し、不定胚誘導法による大量増殖を試みた。本研究では不定胚誘導条件や不定胚からの植物体再生条件を検討し、不定胚を誘導して効率的に大量増殖させることができたので、その結果を報告する。

材料および方法

供試したアスパラガスは、1989年6月15日に農家の圃場から採取したウェルカム(サカタのタネ)の優良株(2年生)で、その若茎を70%エチルアルコールに数秒間浸漬した後、1%次亜塩素酸ナトリウムで10分間殺菌処理を施した。さらに、滅菌水で3回洗浄した後、茎頂を摘出して1/2 MS培地に置床し、25°C、16時間照明下で3~4週間培養して育成した幼植物体を実験に供試した。

1. Embryogenic カルスの誘導

1) 培地のホルモン濃度の検討

無菌的に育成した茎頂由来の植物体の節間部を約5mm

の切片にし、第1表に示したオーキシン、サイトカイニンおよびジベレリン (GA) を含むMS培地 (3% サッカロース、0.2%ゲルライト、pH 5.8) に置床した。

置床後6週間目に、各培地におけるカルスの形状を調査し、embryogenic カルス誘導培地のホルモン組成を検討した。

第1表 Embryogenic カルス誘導培地

Table 1 The medium to induce embryogenic callus

添加物 (mg/l)	培 地									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
2,4-D	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
NAA										2
2 ip		0.2	0.2	1	1					
Zeatin						0.2	0.2			
B A								0.2		0.2
K I N									0.2	
G A			1		1		1			

2) 供試部位の検討

無菌的に育成した幼植物体の頂部、節間部および根部を各々約5mmの切片にし、2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D) 2mg/l、2-イソペンチルアデニン (2 ip) 0.2mg/l、GA 1mg/lを含むMS培地 (3% サッカロース、0.2%ゲルライト、pH 5.8) およびこの培地にABA 0.1mg/l添加したものに置床した。

置床後10週間目に、供試部位の違いによるカルスの形状とABA添加の効果を検査した。

2. Embryogenic カルスからの不定胚形成

1) 糖の種類を検討

根部由来のembryogenicカルスを2,4-D 1mg/l含むMS液体培地で1週間毎に継代しながら、振盪培養 (100 rpm) した。その懸濁液を500 rpmで遠心して細胞量を測り、MS液体培地で50倍希釈したものを各種の糖の添加された不定胚誘導培地 (MS培地、0.8%ゲルライト) に0.5mlずつ分注して培養し、4週間後に各区における細胞の状態、棒状胚数および発芽胚数を調査した。なお、培養容器には20mlの培地の入った50ml三角フラスコを用い、ミリラップで栓をした。

2) サッカロース濃度および浸透圧の検討

3種類のステンレスのふるい (250μm、500μm、1,000μm) で、細胞塊の大きさを4段階に分け、各々の細胞塊を含んだ0.5mlの懸濁液をサッカロースとマニトールを添加した50mlのMS培地 (0.8%ゲルライト) に分注して培養し、4週間後に棒状胚数と発芽胚数を調査した。なお、培養容器には、蓋に1つ通気孔をあけミリシールを張ったプラントボックスを用いた。

3. 不定胚からの植物体再生と馴化

1) サッカロース濃度の検討

サッカロース濃度は、0から0.1Mまでの5区とし、無機塩は、1/2MS (寒天0.8%) 培地と無機塩を全く含まない培地の2区とし、前実験で形成された不定胚を1プラントボックスあたり10個置床し、4週間培養後に植物体再生数と発根状態を調査した。

2) 無機塩濃度の検討

無機塩濃度の試験は、MS培地、アンモニア態窒素だけを1/2にしたMS (1/2 N) 培地、1/4にしたMS (1/4 N) 培地、成分全体を1/2にした1/2MS培地、1/4にした1/4MS培地の5区とし、全ての培地に0.1Mサッカロースと0.2%ゲルライトを添加した。また、通気孔の影響を調べるため、プラントボックスの蓋に通気孔を1つないし2つ開けミリシールを張り、密閉状態と比較した。

不定胚置床後4週間目に植物体再生数および地上部と根の生長について調査した。

上記の実験区で再生した植物体を1990年7月24日に馴化し、4週間後に活着率や生育状況について調査した。馴化は、バーミキュライトの入った育苗パットに再生植物体を植え付け、活着をよくするために1週間同じ育苗パットを上からかぶせ、さらに寒冷紗で覆った。

結果および考察

1. Embryogenic カルスの誘導

供試した幼植物体の節間部切片から直接不定胚が形成されたり、embryogenicカルスが形成された培地は、2,4-D 2mg/l + 2ip 1mg/l、2,4-D 2mg/l + 2ip 1mg/l + GA 1mg/l および 2,4-D 2mg/l + Zeatin 0.2mg/lであったが、2,4-D 2mg/lのみではカルスが形成率・生育とも悪く、表面がベタベタしたカルスが形成された。また、6-ベンジルアミノプリン (BA) を含んだ

培地では、生育は旺盛だが濃緑色で硬いカルスが形成された(第2表)。このことから節間部切片における embryogenic カルスの誘導には、オーキシンとして 2,4-D が、サイトカイニンとしては 2ip および Zeatin が有効であると考えられる。しかし、GA の効果についてははっきりとした結果はせず、さらに検討する必要がある。

供試部位によっても誘導されるカルスの形状は異なり、本実験では根部においてのみ 7.5% の頻度で embryoge-

nic カルスが形成された。また、ABA の添加 (0.1 mg/l) は embryogenic カルスの形成には効果的ではなかったが、カルスの形成率を高め、形成された embryogenic カルスの生育を旺盛にした(第3表)。このことから ABA の濃度の検討を要するが、embryogenic カルスの作出には、ABA 添加培地で根の切片を培養する方法が最適と考えられる。

第2表 植物ホルモンの embryogenic カルス誘導に及ぼす影響

Table 2 Effect of plant hormone on induction of embryogenic callus

培地No. ^{a)}	置床数	カ ル ス			embryogenic カルス		不定胚を形成したカルス数
		形成数	形成率 (%)	径 (mm)	形成数	形成率 (%)	
1	70	20	28.6	2.9	0	—	0
2	70	54	77.1	4.8	0	—	0
3	60	45	75.0	5.3	0	—	0
4	50	41	82.0	5.4	4	8.0	1
5	60	44	73.0	5.1	1	1.7	1
6	70	56	80.0	5.9	0	—	0
7	40	35	87.5	5.7	3	7.5	3
8	70	61	87.1	7.3	0	—	0
9	70	49	70.3	4.6	0	—	0
10	70	70	100.0	8.2	0	—	0

a) : 第1表

第3表 供試部位と ABA の embryogenic カルス誘導に及ぼす影響

Table 3 Effect of the part of plantlet and ABA on induction of embryogenic callus

供試部位	ABA (0.1 mg/l)	置床数	カ ル ス			embryogenic カルス		不定胚を形成したカルス数
			形成数	形成率 (%)	径 (mm)	形成数	形成率 (%)	
頂 部	—	40	38	95.0	9.9	0	—	0
	+	50	49	98.0	10.6	0	—	0
節 間 部	—	90	31	34.4	8.3	0	—	4
	+	80	36	45.0	8.2	0	—	2
根 部	—	40	23	57.5	3.8	3	7.5	0
	+	40	35	87.5	4.1	3	7.5	1

2. Embryogenic カルスからの不定胚形成

Embryogenic カルスは2.4-D 1mg/l 添加した液体培地で旺盛に増殖した。また、ほとんどの cell line は embryogenic カルスをホルモンフリーのMS 固形培地で培養しないと不定胚が形成されないが、一部の cell line は embryogenic カルスをホルモンフリーのMS 液体培地で培養すると、多数の不定胚が形成されるものが認められた。このフローチャートが確立すれば非常に有効であるので、両者の cell line の違いを今後検討する必要がある。

増殖した embryogenic カルスから効率よく不定胚を形成する培地のゲルライト濃度を検討したところ、0.2% では全く不定胚形成が見られず、0.5% 以上で多数の不定胚が形成され、斉藤らの報告⁶⁾と同様であった。しかし、1.0% 以上では細胞が非常に小さくなるのでゲルライト濃度は0.8%が適当であると思われる。

つぎに、より効率的に不定胚を形成させるため、糖の種類と濃度、マニトール添加による浸透圧及び細胞塊の大きさについて検討した。不定胚の形成には供試した糖の中でサッカロースを含んだ培地が最も良く、濃度が0.1 Mの方が0.2 Mより不定胚の発芽が良好であった。

また、サッカロースを含んだ培地では細胞の生育が旺盛であったがやや褐変した。一方、グルコースを含んだ培地ではサッカロースを含んだ培地に比較して、不定胚形成が劣るものの細胞はきれいな白色であった。しかし、グリセロール、ガラクトース、ラクトースを含んだ培地ではほとんど不定胚の形成は認められなかった(第4表)。

そこで、不定胚形成に適しているサッカロースの濃度について検討したところ、0.1 M、0.2 Mで細胞の褐変がみられたが、0.05 M、0.025 Mではつやのある白色の細胞であり不定胚形成率が高く、低濃度のサッカロースが不定胚形成に適しているようである(第5表)。

マニトール添加による棒状胚形成は、サッカロース濃度が0.025 M区と0.05 M区で若干促進されたが、0.1 M区では抑制された。また、発芽胚については、どの区においてもマニトールは抑制的に働いた(第5表)。また、不定胚の形成には細胞塊の大きさによって差異があり、1,000 μ m以下の細胞塊の大きさが細胞の増殖と不定胚形成に適しており、継代や培養の時に先端が1mmのピペットを用いれば作業が効率的である。

第4表 糖の種類が不定胚形成に及ぼす影響

Table 4 Effect of saccharide on induction of somatic embryos

糖の種類と濃度	棒状胚数	発芽胚数	細胞の生育	色 ^{a)}
サッカロース0.1M	287	16	+++	B
サッカロース0.2M	290	5	+++	B
グルコース0.1M	157	8	+++	W
グルコース0.2M	195	8	+++	W
サッカロース0.1M+ グルコース0.1M	179	4	+++	W-B
グリセロール0.2M	0	0	+	Y
ガラクトース0.2M	6	0	++	Y
ラクトース0.2M	2	0	+	Y

a) : Bは褐色、Wは白色、Yは黄色

第5表 サッカロース濃度、マニトール及び細胞塊の大きさが不定胚形成に及ぼす影響

Table 5 Effect of sucrose concentration and mannitol and cell size on induction of somatic embryos

サッカロース (M)	マニトール (M)	棒 状 胚 数 (発芽胚数)				合 計
		細胞塊の大きさ (μ m)				
		250以下	250~500	500~1,000	1,000以上	
0.025	0	218 (11)	180 (7)	83 (4)	10 (0)	491 (22)
	0.075	232 (7)	133 (6)	130 (3)	15 (1)	510 (17)
0.05	0	167 (7)	164 (7)	125 (7)	19 (0)	475 (21)
	0.05	231 (2)	148 (3)	112 (0)	22 (0)	513 (5)
0.1	0	211 (2)	150 (4)	82 (1)	19 (2)	466 (9)
	0.1	165 (1)	173 (4)	86 (0)	23 (0)	447 (5)
0.2	0	159 (1)	168 (0)	96 (0)	11 (0)	434 (1)

3. 不定胚から植物体の再生および馴化

不定胚からの植物体再生における無機塩とサッカロース濃度を検討したところ、無機塩を含まない培地では、サッカロースが十分あっても植物体再生率は低く、しかも全て異常個体で発根しかない不定胚が多数観察された。しかし、1/2 MS 培地では、サッカロース濃度が0.01 M以上であれば植物体再生率は高く、根の生育もサッカロース濃度を上げるほど顕著に良くなった(第6表)。以上の結果より、不定胚からの植物体再生には1/2 MSの無機塩と0.01 M以上のサッカロースとが必要であると思われる。また、サッカロースというエネルギー源が無ければ不定胚はほとんど元のままであり、寒天のみの固形培地に不定胚を置床しておくことで容易に保存でき、現在8カ月間保存の不定胚からの植物体再生を認めている。このことから、不定胚からの植物体の再生を計画的に行うことが可能であり、さらに安定した保存技術を検討したい。

つぎに、無機塩濃度と通気孔が不定胚からの植物体再生および馴化に及ぼす影響を検討した。再生率は1/4 MS 培地を除いて60%~70%であり、その中でもMS(1/4 N) 培地とMS(1/2 N) 培地が高い値を示した。

地上部の生長は、MS 培地が最も良く1/4 MS 培地が劣った。根の生長は、1/2 MS 培地と1/4 MS 培地で良好でMS(1/4 N) 培地が劣った(第7表)。以上の結果より、不定胚からの植物体再生においてアンモニア態窒素は抑制的に働き、他のいずれかの無機塩が促進的に働いていると考えられる。また、植物体の再生において通気孔の有無と数はさほど影響なかったことから、培養容器内の湿度などの環境要因は直接不定胚には関与していないと考えられる。

再生した植物体の活着率はMS 培地以外の培地で100%であった。茎数においては、MS 培地、MS(1/2 N) 培地、MS(1/4 N) 培地、1/2 MS 培地、1/4 MS 培地の順に多く、根の生長においては、1/4 MS 培地、1/2 MS 培地、MS(1/2 N) 培地、MS 培地、MS(1/4 N) 培地の順に良好であり(第8表)、極端な乾燥や湿りに注意すれば馴化は容易である。

本研究において不定胚から効率良く植物体を再生させることができたことから(図版)、アスパラガスの不定胚を利用した大量増殖法は、実用性が高いものと考えられ、再生個体の変異性の有無を確認した上で、アスパラガスの無病苗供給技術として実用化したい。

第6表 無機塩とサッカロース濃度が不定胚からの植物体再生に及ぼす影響

Table 6 Effect of mineral salt and sucrose concentration on plant regeneration from somatic embryos

無機塩	サッカロース濃度 (M)	置床不定胚数	植 物 体		発根のみの不定胚数	根長 (mm)
			再生数	再生率(%)		
0	0	30	0	—	3	1.0
	0.001	30	(1) ^{a)}	(3.0)	7	4.3
	0.01	30	(3)	(10.0)	12	7.2
	0.05	30	(8)	(26.7)	18	10.5
	0.1	30	(11)	(36.7)	19	13.2
1/2 MS	0	30	0	—	2	4.0
	0.001	30	6	20.0	3	4.3
	0.01	30	17	56.7	6	11.7
	0.05	30	18	60.0	6	21.0
	0.1	30	20	66.7	7	28.1

a) : 異常個体

第7表 無機塩濃度と通気孔が不定胚からの植物体再生に及ぼす影響

Table 7 Effect of mineral salt concentration and aeration on plant regeneration from somatic embryos

無機塩	通気孔の数	置床不定胚数	植物体		地上部の生長	根の生長
			再生数	再生率(%)		
MS	0	40	24	60.0	+++	++~+++
	1	40	24	60.0	+++	++
	2	40	26	65.0	+++	++
MS (1/2 N) ^{a)}	0	40	27	67.5	++	++
	1	40	25	62.5	++	+~++
	2	40	28	70.0	++	++
MS (1/4 N)	0	40	27	67.5	++	++
	1	40	28	70.0	++	+~++
	2	40	26	65.0	++	+
1/2 MS	0	40	26	65.0	++	+++
	1	40	24	60.0	++	+++
	2	40	24	60.0	++	+++
1/4 MS	0	40	19	47.5	+	+++
	1	40	22	55.0	+	+++
	2	40	20	50.0	+	+++

a) : NH₄NO₃ 濃度

第8表 無機塩濃度と通気孔が不定胚由来植物体の順化に及ぼす影響

Table 8 Effect of mineral salt concentration and aeration on acclimation of plants from somatic embryos

無機塩	通気孔の数	鉢上げ個数	活着数	活着率(%)	莖数	草丈(cm)	根数	根長(cm)
MS	0	24	20	83.3	2.6	9.5	1.8	5.0
	1	24	24	100	2.9	10.4	1.9	6.0
	2	25	22	88.0	2.7	11.2	2.0	5.8
MS (1/2 N) ^{a)}	0	25	25	100	2.8	11.0	1.8	6.5
	1	25	25	100	2.3	13.7	2.0	5.4
	2	25	25	100	2.3	12.0	2.0	6.0
MS (1/4 N)	0	25	25	100	2.5	10.2	1.8	5.4
	1	25	25	100	2.0	12.8	1.7	6.1
	2	25	25	100	2.1	11.3	1.9	5.2
1/2 MS	0	25	25	100	2.0	11.3	1.8	5.7
	1	24	24	100	2.0	12.0	2.1	6.2
	2	24	24	100	2.0	12.6	1.9	6.6
1/4 MS	0	19	19	100	1.7	13.6	2.1	6.8
	1	22	22	100	2.0	9.8	1.8	6.5
	2	22	22	100	1.4	9.5	2.2	5.4

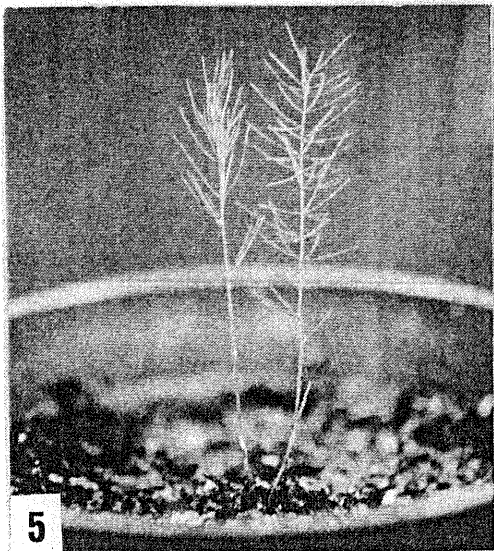
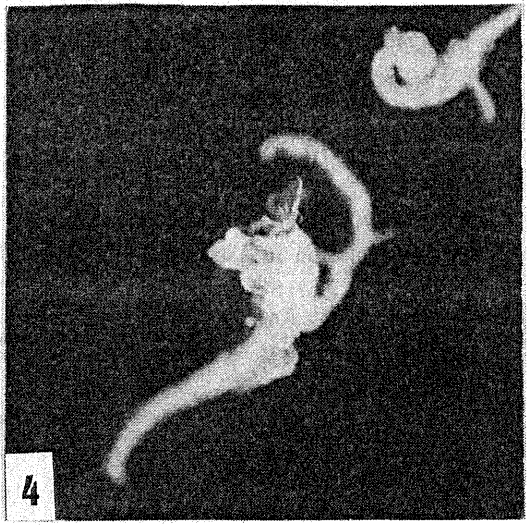
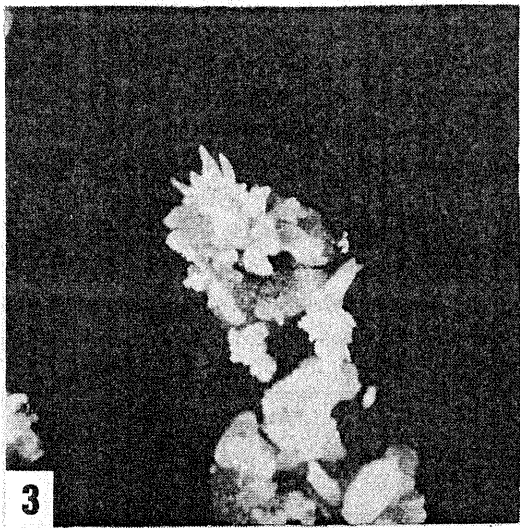
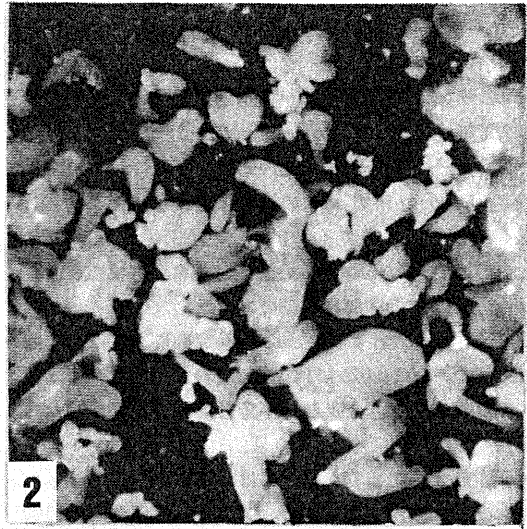
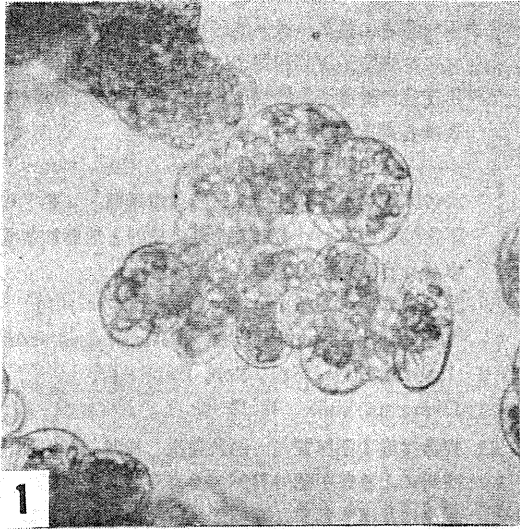
a) : NH₄NO₃ 濃度

摘 要

1. ウェルカムの2年生株から得た茎頂由来の植物体の節間部切片と根部切片から embryogenic カルスを作出した。
2. Embryogenic カルスの誘導には、オーキシンとして 2,4-D が、サイトカイニンとしては 2ip および Zeatin が有効であった。ABA の添加は生育の旺盛な embryogenic カルスの誘導に有効であった。
3. Embryogenic カルスからの不定胚形成には低濃度のサッカロース (0.025 M) が適していた。また、1 mm 以下の細胞塊の大きさであれば不定胚形成に問題はなかった。
4. 不定胚からの植物体再生には、0.01 M 以上のサッカロースと無機塩が必要であり、アンモニア態窒素は植物体再生に抑制的に働いた。
5. MS 培地以外の培地で再生した植物体の馴化は活着率が 100% と容易であった。

引 用 文 献

1. CHIN CHEE-KON 1982. Promotion of shoot and root formation in *Asparagus* in vitro by ancymidol. *HortScience* 17(4): 590-591.
2. 平田行正・荒木 肇・八坂利郎. 1988. アスパラガスの不定胚形成とその生長. 園芸学会 (春季) 講演要旨: 230-231.
3. 甲村浩之・長久 逸・池田好伸. 1987. アスパラガスの体細胞不定胚利用による大量増殖. (第1報) 不定胚の誘導法と植物体の再生. 園芸学会 (秋季) 講演要旨: 254-255.
4. ————・—————・—————. 1988. アスパラガスの体細胞不定胚利用による大量増殖. (第2報) 不定胚形成における培養条件の検討と形態観察園芸学会 (春季) 講演要旨: 232-233.
5. MATSUBARA S. and W. J. CLORE. 1974. Vegetative propagation of *Asparagus* from lateral buds. *Sci, Rep, Fac, Agr. Okayama Univ.* 43:19-26.
6. 斉藤猛雄・西村繁夫・西沢秀次. 1988. 通気性膜の使用による非密閉培養がアスパラガスの体細胞胚の発達に及ぼす効果. 育種学会 (秋季) 講演要旨: 26-27.
7. YANG HSU-JEN, and W. J. CLORE. Rapid vegetative propagation of *Asparagus* through lateral bud culture. *HortScience* 8(2): 141-143.
8. ————, ————. Development of complete plantlets of from moderately vigorous shoots of stock plants of *Asparagus* in vitro. *HortScience* 9(2): 138-140.



図版 アスパラガスの不定胚からの植物体再生

Plate Plant regeneration of *Asparagus officinalis* L. through somatic embryos

1. Embryogenic カルス
2. 液体培地で形成された不定胚
3. 外植片に直接形成された不定胚
4. 不定胚からの発芽
5. 植物体再生