アスパラガスの形態形成に関する研究 (第1報)

組織培養法による若茎柔組織からのカルス形成

八鍬利郎・原田 隆・嵯峨紘一*・志賀義彦**

(北海道大学農学部)

Studies on the morphogenesis of asparagus

I. Callus formation originating in the pith tissue of asparagus spears in tissue culture

Toshiro YAKUWA, Takashi HARADA, Koichi SAGA* and Yoshihiko SHIGA**

Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo

Summary

Small explants derived from pith tissue of asparagus spears were cultured on a medium devised by either WHITE or MURASHIGE and SKOOG (MS) to which

0, 0.1, 1.0 and 10.0 mg/l 6-benzyladenine(BA), 0, 0.001, 0.01, 0.1, 1.0 and 10.0 mg/l auxin (2, 4-D or NAA), and 0, 10, 20, 30, 50 and 80 g/l sucrose

were added. The cultures were kept in a dark growth room maintained at 25°C. The experimental results are summarized as follows:

1. The most prominent callus growth occurred where the sucrose concentrations were at 10 to 20

g/l. Therefore, in all subsequent trials, the sucrose concentration was maintained at 20 g/l.

2. A good yield of callus resulted in a medium containing 0.1~1.0 mg/l BA plus 0.1~1.0 mg/l 2, 4-D or 1.0~10.0 mg/l NAA.

3. In the medium without BA, auxin alone was found to be beneficial to the growth of callus at concentrations from 0.01 to 10.0 mg/l. The optimum concentration was found to be 0.1 mg/l.

4. Shoots and roots were formed in some combinations of BA and auxin on the MS medium but none was observed on WHITE's preparation.

緒 言

近年生物学のさまざまな分野の研究上の重要な実験手段として、組織培養法が広く用いられており、園芸作物についての研究も少なくない。アスパラガスの組織培養に関する研究は 1945 年、LOO⁷⁾ の茎頂培養に始まり、GALSTON⁸⁾、GORTER⁶⁾、ANDREASSEN¹⁾ らによつて成功に導かれた。また近年 TAKATORI ら^{15,16)} は栄養繁殖を目的として若茎切片の培養を行ない、カルスからの幼植物の再分化に成功し、WILMAR ら¹⁹⁾ も実生の hypocotyl を用いて植物体を得ることに成功している。しかしこれらの研究は日が浅いため、形態形成についての基礎的な資料に乏しく、いまだ解明されていない点が多い。筆者らはアスパラガスについて、主として組織培養法を用いて植物体の種々の部位の組織片または組織起源

カルスからの器官分化について、生理、形態学的に研究し、さらにその結果を栽培面に応用する目的で本研究に着手した。

本報においては、アスパラガスの若茎柔組織の培養法を確立するために、主としてカルス形成におよぼす培地組成とくに培地中の生長調節物質の影響を調べ、さらに形成されたカルスからの器官分化についても若干の検討を加えた。

材料および方法

培養組織片 北海道大学農学部附属農場菜園に栽植してある 15~16 年生のアスパラガス (品種 'メリーワシントン 500') 株から伸長した若茎を材料とした。すなわち、1968 年および 1969 年 5 月~7 月に、20 cm 程度に伸長した若茎を基部より切り取り、中性洗剤を加えた水道水で充分洗い、先端部および基部を除いて中間部約 10 cm を取った。ついでアンチホルミン液 (市販 10% アンチホルミン液 60 ml に水を加えて 1 l とし、Tween 20 を数滴添加) で表面を殺菌し (約 30 分間浸漬 2 回)、無菌室内で、滅菌水で洗ったのち、滅菌した

1971 年 6 月 19 日受理

本報告の要旨は園芸学会 1969 年春季大会において発表

* 現在、弘前大学農学部

** 現在、北海道立中央農業試験場

コルクボーラーとスライス切断器を用いて、直径5mm、厚さ1mmの円盤状の組織片を作った。また実験の一部ではカルスの移植を行なったが、この場合は培養して得られたカルスをアズキ粒程度の大きさに細分して用いた。

培地の調製 基本培地としては Table 1 に示すような2種を用い、これに sucrose、生長調節物質等を加え、1N HCl たまは 1N NaOH により pH を 5.5 に調整し、最後に粉末寒天 6.0 g/l を加えた。この培地を加熱溶解後 100 ml 容三角フラスコに 30 ml ずつ分注し、アルミフویلで覆ったのち、120°C、1 kg/cm² で 10 分間加圧殺菌した。なお調製に必要な水はすべて再蒸留水を用い、薬品類は特級試薬を用いた。

培養および調査 上記の組織片を1容器あたり2個（実験によつては3個）ずつ置床し、25°C、暗処で培養した。この条件で培養した場合、カルスの形成は置床後約1週間で始まり、8～10週間旺盛な生長を続けるが、生長が停止するのはさらに数週間後になる場合が多い。したがって、生体重量および風乾物重量（以下乾物重量）の測定は、実験に応じて生長がほとんど停止したとみられる10～13週後に行なつた。なお、器官分化について観察するため引続き培養を行なつたものについては、カルスの大きさを1から3までの指数で表わした。この場合、1はアズキ粒大、2はダイズ粒大、3はソラマメ粒大とした。

各区は8容器、16個体（実験によつては24個体）である。

実験結果

カルスの形成および生長

Sucrose 濃度 カルスの形成および生長におよぼす

○—○ Fresh weight ●—● Dry weight
Fig. 1. Effect of sucrose concentrations on callus growth (WHITE's medium, BA : 0.1 mg/l, 2,4-D : 0.1 mg/l). Fresh and dry weights were determined at the end of 8th week.

Fig. 2. Effect of 2,4-D concentrations on callus growth (WHITE's medium, BA : 0.1 mg/l). Fresh and dry weights were determined at the end of 10th week.

sucrose 濃度の影響を調べるため 2,4-dichlorophenoxy-acetic acid (2,4-D) 0.1 mg/l, 6-benzyladenine (BA)

Table 1. Components of the basic nutrient medium.

(1) Modified WHITE's medium				(2) MURASHIGE and SKOOG's (MS) medium			
Salts	mg/l		mg/l	Salts	mg/l		mg/l
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	756.0	KI	0.75	NH ₄ NO ₃	1,650.0	CuSO ₄ ·5 H ₂ O	0.025
Ca(NO ₃) ₂ ·4 H ₂ O	288.7	Na ₂ MoO ₄ ·2 H ₂ O	0.029	KNO ₃	1,900.0	ZnSO ₄ ·7 H ₂ O	8.6
Na ₂ SO ₄ ·10 H ₂ O	453.0	CoCl ₂ ·6 H ₂ O	0.045	H ₃ BO ₃	6.2	Na ₂ -EDTA	37.35
KCl	65.0	Supplements		KH ₂ PO ₄	170.0	FeSO ₄ ·7 H ₂ O	27.85
KNO ₃	80.0	Nicotinic acid	5.0	KI	0.83	Supplements	
NaH ₂ PO ₄	21.4	Pyridoxine-HCl	1.0	Na ₂ MoO ₄ ·2 H ₂ O	0.25	Thiamine-HCl	0.1
MnSO ₄ ·4~6 H ₂ O	6.54	Thiamine-HCl	1.0	CoCl ₂ ·6 H ₂ O	0.025	Nicotinic acid	0.5
ZnSO ₄ ·7 H ₂ O	3.70	Ca-Pantothenate	0.1	CaCl ₂ ·2 H ₂ O	440.0	Pyridoxine-HCl	0.5
H ₃ BO ₃	1.50	myo-Inositol	100.0	MgSO ₄ ·7 H ₂ O	370.0	Glycine	2.0
Fe-EDTA	5 ml/l*	Casein Hydrolysate**	2,000.0	MnSO ₄ ·4 H ₂ O	22.3	myo-Inositol	100.0

* Fe-EDTA : 5 ml/l of a stock solution containing 5.57 g FeSO₄·7 H₂O and 7.45 g Na₂-EDTA per liter of H₂O.

** Casein Hydrolysate : Difco "Bacto casamino acids (technical)."

0.1mg/l を加えた WHITE 培地を用い, sucrose 濃度を 0, 10, 20, 30, 50 および 80g/l の 6 段階として 25°C 暗処で 10 週間培養した。その結果は sucrose 無添加の区ではほとんどカルスが形成されなかったが, sucrose を加えた区ではすべての個体にカルスが形成された。

Fig. 3. Effect of 2,4-D concentrations on callus growth (MS medium). Fresh and dry weights were determined at the end of 10th week.

Fig. 4. Effect of 2,4-D concentrations on the growth of callus in subculture.

Slices (tissue disks) were cultured on the MS medium with 0.3mg/l BA and 0.1 mg/l 2,4-D for six weeks. Callus grown from the slices were cut to a size of a red azuki bean and transferred to the MS medium with BA at 0.1 or 1.0mg/l and various concentrations of 2,4-D. Fresh and dry weights were determined at the end of 12th week after transplantation.

Fig. 1 に示すようにカルスの生体重量は sucrose 10 および 20g/l の区で最も大きく、それより濃度が大きくなるにつれて生長量が小さくなった。したがって、以下の実験では sucrose 濃度は 20g/l (2%) とした。

Auxin 濃度 2,4-D : WHITE 培地を用い, BA を 0.1mg/l とした場合の 2,4-D 濃度の影響を調べた結果は Fig. 2 のとおりで, 2,4-D 0.1 および 1.0mg/l の区において著しいカルスの生長がみられた。また MURASHIGE and SKOOG (MS) 培地を用いて, BA を 1.0mg/l 添加した場合には Fig. 3 に示すように, 2,4-D 0.1 および 0.3mg/l のところでカルスの最大生長量がみられた。さらに, カルスを移植して行なつた BA 0.1 および 1.0mg/l 添加 MS 培地での実験では, 生体重量は 2,4-D 1.0mg/l において最も大きく, 乾物重量は 0.1 および 1.0mg/l で大きかつた (Fig. 4)。以上の結果から, BA が 0.1~1.0mg/l 添加された培地でのカルスの生長に適当な 2,4-D の濃度は 0.1~1.0mg/l の範囲内にあるものと考えられる。

α -naphthaleneacetic acid (NAA) : カルス形成におよぼす BA と NAA 濃度の影響について MS 培地を用いて調査した結果は Fig. 5 のとおりである。この図で明らかなように, BA は無添加でも NAA 0.01~10.0

Fig. 5. Effect of various concentrations of NAA and BA on callus growth (MS medium).

Index of callus growth was determined at the end of 13th week.

Fig. 6. Effect of NAA concentrations on the growth of callus in subculture (WHITE's medium).

Calluses grown on the WHITE's medium with 0.3mg/l BA and 0.1mg/l 2, 4-D were used for transplantation. Fresh and dry weights were determined at the end of 8th week after transplantation.

mg/l の添加によりカルスの形成が認められた。この場合 NAA 0.1mg/l でカルスの生長量は最も大きく、それより高濃度ではカルスの生長はかえって抑制された。しかし、BA 添加区では 1.0~10.0mg/l の NAA 濃度でのカルスの生長が良好となり、特に BA 1.0mg/l, NAA 1.0~10.0mg/l においてカルスはよく生長した。

また WHITE 培地を用いて行なつた移植カルスについての実験結果は Fig. 6 のとおりで、BA を 0.1 および 1.0mg/l 添加した場合は、生体重量、乾物重量ともに NAA 1.0mg/l においてカルスの生長が最も良かった。このようにカルス形成におよぼす NAA 濃度の影響は培地中の BA の存否によつて左右され、BA 無添加の場合は NAA 0.1mg/l が適当であるが、BA を 0.1~1.0mg/l 添加した場合は NAA 1.0~10.0mg/l でカルスの生長が良いことが認められた。

6-benzyladenine (BA) 濃度 2,4-D 0.1mg/l 添加 WHITE 培地を用いて、BA 濃度とカルス形成との関係を調査した結果は Fig. 7 に示すとおりで、BA 0.1~10.0mg/l の範囲でかなりの生長を示し、0.3~3.0mg/l

Fig. 7. Effect of 6-benzyladenine (BA) concentrations on callus growth (WHITE's medium). Fresh and dry weights were determined at the end of 9th week.

Fig. 8. Effect of BA concentrations on callus growth in subculture (MS medium). Calluses grown on the WHITE's medium with 0.3mg/l BA and 0.1mg/l 2, 4-D were used for transplantation. Fresh and dry weights were determined at the end of 8th week after transplantation.

で著しい生長がみられた。また 2,4-D 1.0mg/l を加えた MS 培地を用いて BA 濃度と移植カルスの生長との関係を調査した結果は Fig. 8 のとおりで、この場合も BA 0.1~10.0mg/l でカルスの生長が良好であつた。以上の結果から、カルスの生長に好適な BA の濃度範囲はかなり広く、0.1~10.0mg/l と考えられるが、その最適濃度は 1.0mg/l の付近にあるものと思われる。このことは Fig. 4, Fig. 5 および Fig. 6 において、いずれも auxin (2,4-D または NAA) の濃度と関係なく BA 0.1mg/l より BA 1.0mg/l においてカルスの生長が良好であつたことから裏付けられているといえよう。

器官の分化

根 基本培地に WHITE 培地を用いた実験では、根の

Fig. 9. Callus formation originating in the pith tissue of asparagus spears.

A: BA 0mg/l, 2,4-D 0mg/l, B: BA 0mg/l, 2,4-D 1.0mg/l,
C: BA 10.0mg/l, 2,4-D 1.0mg/l.

分化が認められなかったが、MS 培地を用いた場合は区によつてかなりの発根が認められた (Fig. 10)。根の分化を誘起した培地の生長調節物質の種類および濃度は BA 0~1.0mg/l, 2,4-D 0.1~1.0mg/l, NAA 0.01~10.0mg/l でいずれもかなり広い範囲にわたっているが、発根率は単に基本培地の種類だけではなく、BA および auxin の濃度ならびにその量的平衡と密接な関

係があることが認められた。分化した根の中には直径 2mm 以上の太いものもあり、また分岐の多い細い根もみられたが、区間の違いは明らかでなかった。

茎 MS 培地を用いた実験では、区によつてカルスから茎が分化した (Fig. 11)。それらの区の生長調節物質の濃度は BA 0~1.0 mg/l, 2,4-D 0.1~1.0mg/l, NAA 0.1~10.0mg/l で、かなり広い範囲にわたっている。茎の分化率も根の場合と同様、BA と auxin の濃度および量的平衡と密接な関係があるように見受けられた。一つのカルス塊か

ら分化する茎は数本以上のこともあり、1本だけのこともあつた。また茎の形状も直径 1mm 程度の細いものから 5mm 以上もある太いものや、奇形な発育を示すものなどが含まれていた。

考 察

多くの植物の組織培養において、カルスの形成と器官分化に関しては auxin と cytokinin の相互作用が知ら

Fig. 10. Root formation from callus cultured on the MS medium containing BA 0.1mg/l and NAA 1.0mg/l.

Fig. 11. Shoot formation from callus cultured on the MS medium containing BA 0.3mg/l and NAA 1.0mg/l.

れている。したがって、培養法を確立するためには、まずその組織がカルスを形成し得る基本培地を選定し、これに添加する auxin および cytokinin の濃度範囲を見極め、さらにカルスの生長ならびに器官分化のための濃度の最適組合せを検討しなければならない。TAKATORI ら^{15,16)}はアスパラガスの若茎を輪切りにして作った厚さ 3~5 mm の切片を MS 培地で培養した結果、カルス誘導には auxin (NAA 0.5 ppm) は必須であり、これに coconut milk を 15% の濃度で加えるとカルスの生長は著しく促進されたと報告している。また WILMAR ら¹⁹⁾はアスパラガス実生の hypocotyl の切片を LINSMAIER and SKOOG の培地で培養し、2,4-D 1.0 mg/l と kinetin 0.315 mg/l を加えた場合にカルスの生長が最も促進されたと述べている。しかしこれらの報告には実験方法と結果に関する詳細な記述がないため、精細な比較を行なうことはできない。

本実験においては auxin として 2,4-D および NAA を用いたが、両者ともカルスの形成を誘起する作用が認められ、カルスの生長がとくに良好であったのは培地に 2,4-D 0.1~1.0 mg/l または NAA 1.0~10.0 mg/l が、BA 0.1~1.0 mg/l と共存した場合であった。前述の WILMAR らのいう最適濃度もこの範囲に含まれている。

植物の組織培養に関する最近の報告をみると、植物のほとんどの部分についてカルス誘導に成功しているが、これらの研究ではわずかの例外^{4,12,14)}を除き auxin は必須成分として加えられている^{2,8~14,17,18)}。しかし生長調節物質の一つである cytokinin を含んでいない培地でもカルスが形成されており、多くの場合 cytokinin はカルス誘導に必須なものではないと考えられている^{5,9,20)}。本試験の BA 無添加の区で、auxin が適量添加されればカルスの形成がみられたことから、アスパラガスにおいても auxin のみでカルスを誘導しうることが立証された。しかしカルスの生長をさらに促進するためには、培地に auxin と BA の両方を適量添加することが望ましいことは前述のとおりである。なお、BA 無添加の培地では NAA 0.1 mg/l でカルスの生長量が最大となつたが、0.1~1.0 mg/l の BA を添加した場合はカルスの生長のピークが NAA 1.0~10.0 mg/l にみられたことは、カルスの生長に対して auxin と BA が全く独立的に作用するのではなく、何らかの相互作用をもつことを示すものと考えられる。

カルスからの器官分化についての詳細な報告は次報にゆずるが、現在までの観察結果から MS 培地は WHITE 培地に比べて器官分化を誘起しやすいことが認められ

た。すなわち、同じ生長調節物質を添加しても WHITE 培地では全く分化が認められなかつたが、MS 培地では区によってかなりの根および茎の分化が認められた。生長調節物質については、BA は無添加でも auxin 濃度が適当であれば根も茎も分化した。しかし BA の添加は茎の分化率を高めるのに有効であつた。また auxin として用いた 2,4-D および NAA はともに根および茎の分化を誘起するのに有効であつたが、両者の作用の相違については今後さらに検討する予定である。

摘 要

アスパラガスの若茎柔組織からとつた切片を auxin (2,4-D または NAA) と 6-benzyladenine (BA) を含む WHITE および MURASHIGE and SKOOG の培地で培養し、主としてカルスの形成におよぼす培地組成の影響を調べた。培養は 25°C の暗処で行なつた。観察結果を要約するとつぎのとおりである。

1. 生長調節物質を含む培地を用い、sucrose 濃度を 0~80 g/l の範囲で比較したところ、10~20 g/l の濃度でカルスの生長量が最も大きかつた。したがって、以下の実験では sucrose 濃度は 20 g/l とした。
2. 基本培地に BA 0.1~1.0 mg/l と 2,4-D 0.1~1.0 mg/l または NAA 1.0~10.0 mg/l が共存した場合、カルスの生長がとくに良好であつた。
3. BA 無添加の培地で auxin (NAA) 単用でもカルスの形成が認められた。この場合は NAA 0.1 mg/l においてカルスの生長が最も良かつた。
4. MS 培地では区により茎および根の分化がかなり認められた。

謝辞 本研究を行なうにあたり御指導と御校閲を賜わつた北海道大学農学部果樹・そ菜園芸学講座田村 勉教授ならびに同作物生理学講座岡沢養三助教授に深く感謝する。また実験遂行にあたり御協力いただいた杉原純子、嘉見史恵両嬢に深甚なる謝意を表する。

引用文献

1. ANDREASSEN, D. C., and J. H. ELLISON. 1967. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 90: 158—162.
2. CAREW, D. P., and A. E. SCHWARTING. 1958. Bot. Gaz. 119: 237—239.
3. GALSTON, A. W. 1948. Amer. J. Bot. 35: 281—287.
4. GAUTHERET, R. J. 1963. Compt. Rend. Acad. Sci. 256: 2071—2075.
5. ———. 1966. Factors affecting differentiation of plant tissues grown *in vitro*. In "Cell differentiation and morphogenesis." North-Holland Pub. Co. Amsterdam 55—95.
6. GORTER, C. J. 1965. J. Hort. Sci. 40: 177—179.
7. LOO, S. W. 1945. Amer. J. Bot. 32: 13—17.

8. NORSTOG, K. J. 1956. Bot. Gaz. 117 : 253—259.
 9. OKAZAWA, Y., N. KATSURA and T. TAGAWA. 1967. Phvsiol. Planta. 20 : 862—869.
 10. STEINHART, C. E. 1962. Science 137 : 545—546.
 11. STEWARD, F. C., M. O. MAPES and K. MEARS. 1958. Amer. J. Bot. 45 : 693—703.
 12. STRAUS, J., and C. D. LARUE. 1954. Amer. J. Bot. 41 : 687—694.
 13. ———. 1960. Amer. J. Bot. 47 : 641—647.
 14. TABATA, T., and F. MOTOYOSHI. 1965. Jap. J. Genetics 40 : 343—355.
 15. TAKATORI, F. H., T. MURASHIGE and J. I. STILLMAN. 1967. California Agriculture 21 (8) : 8—9.
 16. ———, ——— and ———. 1968. Hort-Science 3 (1) : 20—22.
 17. TULECKE, W. 1960. Plant Physiol. 35 : 19—24.
 18. WEST, F. R., and E. S. MIKA. 1957. Bot. Gaz. 119 : 50—54.
 19. WILMAR, C., and M. HELLENDORRN. 1968. Nature 217 : 369—370.
 20. 山田康之. 1967. 植物の化学調節. 2(1) : 7—14.
-