



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	アスパラガスの形態形成に関する研究 : (第3報) 組織培養におけるカルス形成 および器官分化の経時的観察
Author(s)	原田, 隆; HARADA, Takashi; 八鍬, 利郎 他
Citation	北海道大学農学部邦文紀要, 8(3), 175-181
Issue Date	1972-06-30
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/11833
Type	departmental bulletin paper
File Information	8(3)_p175-181.pdf



アスパラガスの形態形成に関する研究

(第3報) 組織培養におけるカルス形成
および器官分化の経時的観察*

原田 隆・八 鍬 利 郎

(北海道大学農学部果樹・蔬菜園芸学教室)

Studies on the morphogenesis of asparagus

III. A long-term observations on callus and organ formation in tissue culture

Takashi HARADA and Toshiro YAKUWA

(Department of Horticulture, Faculty of Agriculture,
Hokkaido University, Sapporo, Japan)

Received November 2, 1971

緒 言

アスパラガスの若茎柔組織切片を、塩類、ビタミン、蔗糖のほかに auxin や cytokinin などの生長調節物質を添加した寒天固形培養基上で培養すると、カルスの形成およびカルスからの器官分化が認められることは第1報⁵⁾において述べた。また、第2報⁶⁾においては、実生の第1次茎節間部の切片を培養する場合、培地に添加する auxin (2, 4-D または NAA) および cytokinin (6-benzyladenine) の濃度を変えることにより、カルスから茎と根とをべつべつに再分化させ得ることを述べた。このようなカルスの形成や、カルスからの器官の再分化を調査する場合、形成率や分化率は培養期間の長さに応じて変化するが、筆者らの知る限りではアスパラガスの組織培養においてはこれらのことに関する詳細な調査は見当たらない²⁻⁴⁾。

いっぽう、器官の再分化などについては、一般に培養期間中の適当な時期に移植を行なうことにより器官の分化が促進されることがあるといわれている。

本報告では、カルス形成および器官分化におよぼす移植の影響を検討する前提として、長期間にわたり同一培養基上で培養した場合の経時的調査の結果について述べる。

材料および方法

1. 培養組織片の作製

アスパラガス (品種メリーワシントン500) の種子を70% エタノールに5分間浸漬したのち、次亜塩素酸ナトリウム溶液 (市販次亜塩素酸ナトリウム溶液の10倍液に Tween 20 を数滴添加) で表面殺菌 (30分間浸漬2回) を行ない、滅菌水で水洗後、100 ml 容三角フラスコ内の寒天固形培養基 (蔗糖 20 g/l, 粉末寒天 6 g/l を含む) 上に置床し、25°C 暗所で無菌的に発芽させた。置床約2週間後、第1次茎が約5 cm に伸長したとき、節間部から約1 cm の切片をとり供試した。

2. 培地および培養

MURASHIGE and SKOOG (MS) 培地¹⁾ を基本培地とし、これに蔗糖 20 g/l, 生長調節物質 (添加量は区によって異なる) を添加後、1N-HCl および 1N-NaOH により pH を 5.5 に調整し、最後に粉末寒天 6 g/l を加え、加熱溶解後 100 ml 容三角フラスコに 30 ml ずつ分注した。これをアルミフویلで覆ったのち、1 kg/cm², 120°C で15分間加圧滅菌を行なった。

生長調節物質としては auxin (NAA) および cytokinin (6-benzyladenine-以下 BA と略称) を用い、NAA の濃度は 0, 0.001, 0.01, 0.1, 1.0 および 10.0 mg/l の6段階、BA の濃度は 0, 0.1, 1.0 および 10.0 mg/l の4段階とし、これらを組み合わせた24区を設けた。

* 園芸作物の組織培養とその利用に関する研究 III

なお、培地の作製に当たっては再蒸留水を用い、添加物質は最純良品を用いた。

置床組織片数は1容器当たり3個で、1区は10容器30個体とし、25°C 明所(白色蛍光灯4,000 lux 使用陽光恒温器、明期16時間)において約1年間(52週間)にわたり同一培養基上で培養した。

3. 調 査

置床後52週間の培養期間中、9回調査を行なったが、調査事項はつぎのとおりである。

- (1) カルス形成(組織片)率: 調査組織片数に対するカルス誘導が認められた組織片数の割合。
- (2) カルスの大きさ: 指数で表示した。すなわち、1(アズキ粒大)、2(ダイズ粒大)、3(ソラマメ粒大)とし、以下同様の増大率で4, 5, 6……なる指数を定め、それぞれの指数の総和を調査組織片数で除した数値をもって当該区の指数とした。
- (3) 茎分化(組織片)率: 調査組織片数に対する茎の分化が認められた組織片数の割合。
- (4) 根分化(組織片)率: 調査組織片数に対する根の分化が認められた組織片数の割合。

結果および考察

1. カルス形成率

カルスの形成は早いものでは培養1~2週間ではじまり、好適培地では12~16週間後までに形成率がほとんど最高値に達するものが多かったが、BA高濃度の場合は40週間後まで増大し続ける区もみられた。つぎにBAの濃度別に説明する。

(1) BA無添加の場合(Fig. 1): カルスの形成は比較的早く、NAA 0.01, 0.1および1.0 mg/lの区では培養3週間、10.0 mg/lの区では6週間でカルスが認められた。しかしNAA 0.001 mg/lの区ではかなり遅れ、24週間培養後にはじめてわずかの個体に形成されたが、NAA無添加の区では最後までカルスは全く形成されなかった。カルス形成率はNAA 0.01および0.1 mg/lでは培養12週間で最高となり(93および100%)、その後は変化しなかったが、NAA 1 mg/lの区では24週間までわずかに増加した。しかし、置床後40週間以上経過すると、どの区も全く変化しなかった。

(2) BA 0.1 mg/l 添加の場合(Fig. 2): NAAが0.01 mg/lより高濃度の区では培養3週間、0.001 mg/lおよび無添加の区では6週間でカルスを形成した。この期間におけるカルス形成率はBA無添加の場合に比べるとはるかに高く、NAA 0.1 mg/lでは置床3週間後に

はすでに100%に達し、NAA 1.0 mg/lの場合はこれよりやや遅れて6週間後に100%に達した。しかしNAA 10.0 mg/lの高濃度では20週間後までカルス形成率が増大し続け、0.01 mg/lより低濃度の区も24~40週間後までわずかに増大した。最終的なカルス形成率をみると、NAA 10.0 mg/lの形成率がBA無添加の場合に比べて著しく高まったのが目立つが、NAA無添加および低濃度(0.001 mg/l)での形成率が低いため、NAAの濃度差によるカルス形成率の違いはかなり大きい。

(3) BA 1.0 mg/l 添加の場合(Fig. 3): NAA 10.0 mg/lを除くすべての濃度において3週間でカルスを形成し(10.0 mg/lのみ6週間)、NAA 0.1および1.0 mg/lでは置床3週間後に、また0.01 mg/lでは6週間後にカルス形成率が100%に達した。培養24週間でNAAのいずれの濃度においてもカルス形成率が70%以上となり、NAAの濃度差によるカルス形成率の違いは最も小さかった。すなわち、BA 1.0 mg/l 添加した場合にNAAの適濃度範囲が広がったと考えられる。

(4) BA 10.0 mg/l 添加の場合(Fig. 4): BA 1.0 mg/lに比べると、置床後3~6週間におけるカルス形成率は

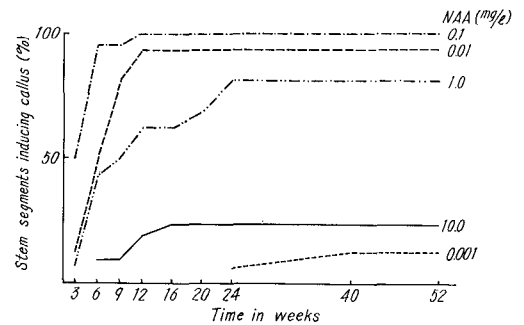


Fig. 1. Changes of callus formation (BA: 0 mg/l)

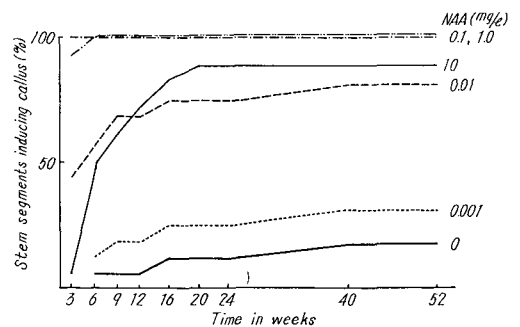


Fig. 2. Changes of callus formation (BA: 0.1 mg/l)

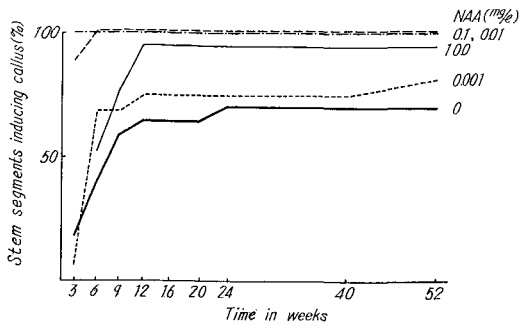


Fig. 3. Changes of callus formation
(BA: 1.0 mg/l)

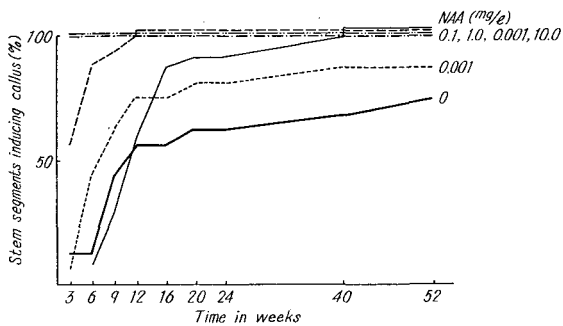


Fig. 4. Changes of callus formation
(BA: 10.0 mg/l)

NAA 0.1 および 1.0 mg/l などの適濃度区を除いた区では低く、特に無添加および高濃度 (10.0 mg/l) では初期のカルス形成率が低い。しかし、これらの区は置床 40~52 週間の長期にわたって増大し続け、NAA 10.0 mg/l では 40 週後に 100% に達した。

2. カルスの生長

カルスの生長は培養 3~16 週間の期間に著しく、その後衰える区が多かったが、かなり長期間生長を続ける区もみられた。つぎに BA の濃度別に説明する。

(1) BA 無添加の場合 (Fig. 5): カルスの生長の良かったのは NAA 0.1 mg/l と 1.0 mg/l の 2 区であったが、前者では培養 3~12 週間の生長が旺盛で、それ以後生長が衰えたのに比べ、後者の生長は最初のうち緩慢で培養後 6 週間頃から旺盛となり 24 週間頃まで続いた。また、この区では、いったん停止したカルスの生長が 40 週間経過後再び認められたが、これはこの区の中のいくつかのカルスが二次的に生長しはじめたためである。他の区ではカルスの旺盛な生長はみられず、生長速度にもそれ程大きな変化はなかったが、NAA 0.01 mg/l の区では 52 週間後まで緩慢な生長が続いた。

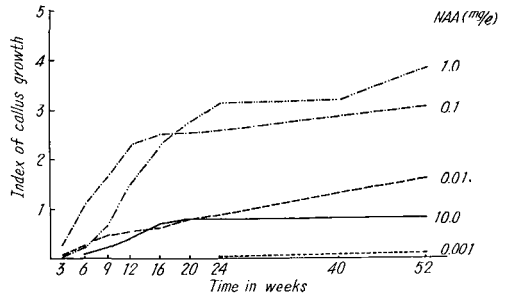


Fig. 5. Changes of callus growth
(BA: 0 mg/l)

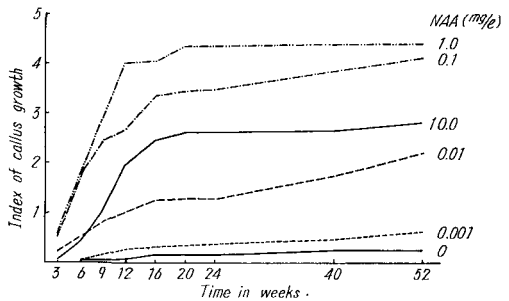


Fig. 6. Changes of callus growth
(BA: 0.1 mg/l)

(2) BA 0.1 mg/l 添加の場合 (Fig. 6): 培養 3~16 週間における生長速度は NAA のいずれの濃度においても BA 無添加の場合より大きく、20 週間経過後はどの区も生長が衰えた。しかし NAA 0.01 および 0.1 mg/l の区では 52 週間後まで緩慢ながら生長が続いた。最終的なカルスの大きさをみると、NAA 0.1 および 1.0 mg/l ではかなり大きい、NAA 無添加および 0.001 mg/l では極めて小さく、NAA の濃度差によるカルス生長量の違いは最も大きい。

(3) BA 1.0 mg/l 添加の場合 (Fig. 7): 最も生長の良好な NAA 1.0 mg/l の区では培養 1 週間後から 12 週間後まで極めて旺盛な生長を続け、その後は急激に生長が衰えた。その他の区は 12 週間経過後も生長が続き、NAA 0.001~0.1 mg/l では 52 週間後まで生長は停止しなかった。BA 無添加および 0.1 mg/l の場合と比較して異なる点は NAA 無添加および 0.001 mg/l の区のカルスの生長が著しく良好となり、長期間生長を続けたことで、カルス形成率と同様に NAA の濃度差によるカルス生長量の違いは BA 1.0 mg/l 添加した場合に最も小さかった。

(4) BA 10.0 mg/l 添加の場合 (Fig. 8): NAA 1.0 mg/l の区は BA 0.1 および 1.0 mg/l の場合と同様に

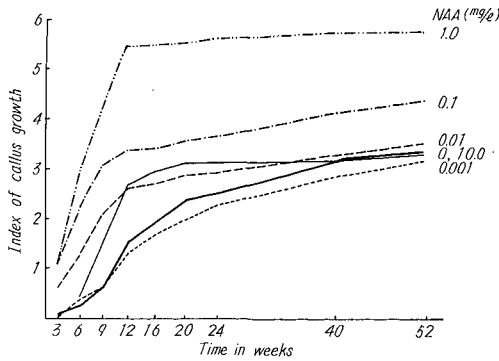


Fig. 7. Changes of callus growth (BA: 1.0 mg/l)

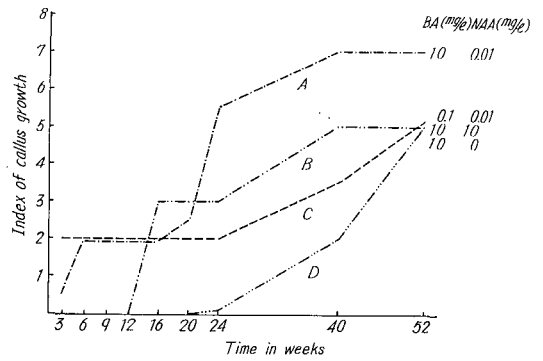


Fig. 9. Examples of unexpected growth of callus

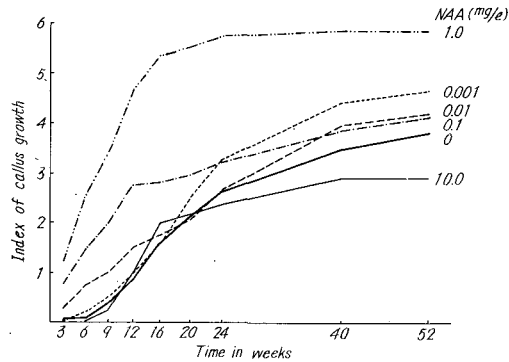


Fig. 8. Changes of callus growth (BA: 10.0 mg/l)

初期のカルスの生長が極めて良好でカルスは大きくなったが、24週間経過後は生長を停止した。しかし、その他の区では初期の生長が比較的緩慢で、長期間にわたり直線的に生長が続いた点が特異的であった。そして BA 1.0 mg/l の場合と同様 NAA の濃度差によるカルス生長量の違いも大きくなかった。

以上のように一般に BA が高濃度の場合に長期間にわたってカルスの生長が続く傾向がみられたが、BA の濃度が高くても NAA が適濃度であった場合は、カルスの生長が最初から旺盛であり、ある大きさに達すると12~20週間で生長が停止する。これは培地中に存在するカルスの生長に必要な栄養物質または生長調節物質が消費されるために起こるものと考えられるが、この場合いかなる物質が制限要素となっているかについてはいろいろな組成を有する培地に移植してみるなどの方法で明らかにされるであろう。

カルスの旺盛な生長が終わった後も、すべての個体が完全に生長を停止したわけではなく、個体別にみた場合、

52週間後まで徐々に生長を続けるものや、長期間経過後に急に著しい生長を示すカルス塊もあった。Fig. 9は後者のいくつかの例を示したものである。Aの個体は培養後3~6週間にカルスがある程度の大きさにまで生長したが、その後16週間までは生長が停止し、20~40週の間再び旺盛な生長を行なって大きなカルス塊を形成した例である。Bではカルスの形成開始期がやや遅く培養後12週間を経過してはじめてカルスが形成され、急激に生長した後一時生長を停止し、24週間後再び生長した例である。Cは培養初期(3週間後)にある程度の大きさのカルスを形成したがその後24週間後まで生長が停止し、24~40週間の期間に再び生長を開始して52週間まで生長を続けた例であり、Dは置床後24週間の長期間、置床したままの状態を経過し、24週間以後はじめてカルスが形成され、その後は52週間後まで著しい生長が続いてかなりの大きさにまで増殖した例である。以上のように長期間経過後はじめてカルスの生長がはじまるか、一時生長を停止していたカルスが二次的に生長を再開する例は BA 高濃度 (10.0 mg/l) の区に多いが、例 C のように BA 0.1 mg/l の区にもまれにみられた。なお、これらの現象がいかなる要因に起因するかについては目下のところ明らかでない。

3. 茎の分化

カルスからの茎の分化はカルスの形成よりかなり遅れ、早いもので6週間後によく認められた。また区間の差も大きく、16週間後にはじめて分化した区もある。つぎに BA の濃度別に説明する。

(1) BA 無添加および 0.1 mg/l 添加の場合 (Fig. 10): BA 無添加では NAA 0.1 および 1.0 mg/l の区に茎を分化したカルス塊があったが分化率は極めて低かった。BA 0.1 mg/l 添加した場合も NAA 0.1 および 1.0 mg/l

の2区にのみ茎が分化したが、分化(組織片)率は無添加の場合よりかなり高く、NAA 1.0 mg/l では12週間後に47%に達している。また、BA 0.1 mg/l, NAA 0.1 mg/l では20~24週間後に茎の分化が増加しているが、いずれの区も24週間経過後はほとんど茎の分化は停止している。

(2) BA 1.0 mg/l 添加の場合 (Fig. 11): BA 無添加および0.1 mg/l 添加の場合と比較するとかなり著しい差がみられる。すなわち、BA 1.0 mg/l の場合は茎を分化し得るNAAの濃度範囲が広くなり、0, 0.001, 0.01, 0.1 および1.0 mg/l の各区で茎が分化した。また各区とも9ないし12週間後から40週間後までの長期間にわたって徐々に分化率が增大している。したがって、NAA 1.0 mg/l の12週間後における分化率はBA 0.1 mg/l の方がBA 1.0 mg/l の区より高いが、40週間後における比較ではBA 1.0 mg/l の方がかなり高率となる。BA 1.0 mg/l, NAA 0.1 mg/l の区では後半の分化率の増大がさらに著しいため、最終的にはこの区において茎の分化率が最高となった。

(3) BA 10.0 mg/l 添加の場合 (Fig. 12): 茎の分化が認められたNAAの濃度範囲はBA 1.0 mg/l の場合と同じで、最終的な分化率にも大きな差はなかった。た

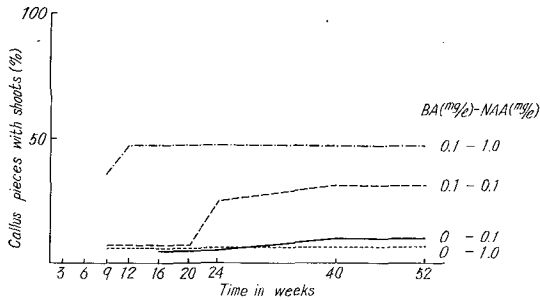


Fig. 10. Changes of shoot formation (BA: 0 or 0.1 mg/l)

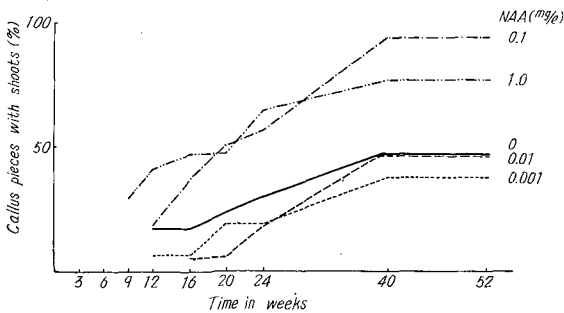


Fig. 11. Changes of shoot formation (BA: 1.0 mg/l)

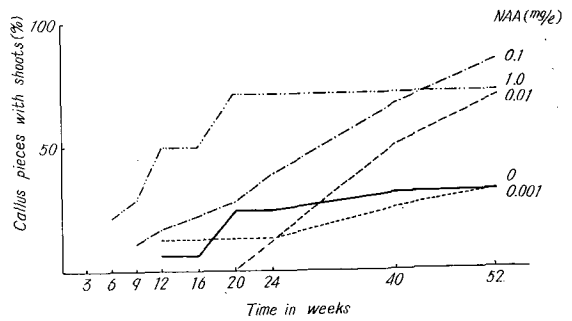


Fig. 12. Changes of shoot formation (BA: 10.0 mg/l)

だ、BA 1.0 mg/l 以下の場合には培養40週間経過後の茎の分化が全くみられなかったのに対し、BA 10.0 mg/l の場合にはNAA 0.001, 0.01 および0.1 mg/l の比較的低濃度の区で培養後40~52週間における分化率の増大がみられたのが特異的であった。特にBA 10.0 mg/l, NAA 0.1 mg/l の区では培養後9~52週間の長期間にわたりほぼ直線的に分化率が增大しているのは興味深い。BA 高濃度の区で長期間経過後に分化したと記録された茎の中には、初期に異状茎(カルス塊の表層に生じた不透明白色の茎状突起)であったが、長期間経過後に正常な茎に変化したものも含まれており、この場合には長期間の培養の過程において濃度が徐々に低下したのが正常な茎を分化するに至った一因ではないかと考えられる。

以上のようにBAが低濃度(0.1 mg/l 以下)の場合には12~24週間で茎の分化が止まるのに、BA 1.0 mg/l になると40週間後まで茎の分化が起こり、さらに10 mg/l の高濃度になると40~52週間後まで分化が続く(ただしこの場合はNAAが比較的低濃度の区に限る)ので、茎の分化率の順位は調査時期により大きく異なる。組織培養の試験においてある一定時期のみの調査で分化率を比較するような場合には、以上の点について充分留意する必要があると思われる。

4. 根の分化

カルスからの根の分化は茎の分化よりやや早く、BA 1.0 mg/l, NAA 1.0 mg/l の区を除いたすべての区で培養6週間後に認められた。その後の分化率の増加はBA 無添加, NAA 0.1 mg/l およびBA 0.1 mg/l, NAA 1.0 mg/l の2区で著しく、培養12~24週間で95~100%に達した。その他の区においても根の分化率は培養24週間後までにほとんど最高値に達しており、その後の分化はBA 0.1 mg/l, NAA 0.1 mg/l の区でわずかに認められたほかはほとんど認められなかった (Fig. 13)。

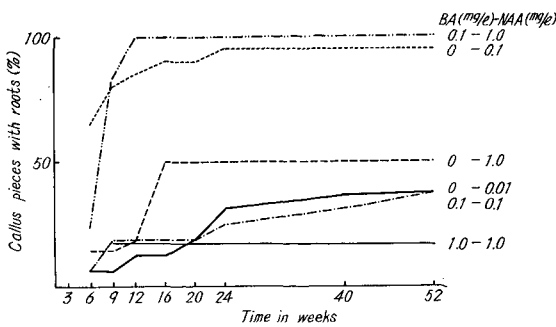


Fig. 13. Changes of root formation

以上の結果から、器官の分化を目的として培養する場合、移植を行わずに長期間培養することは茎の分化に対しては BA 高濃度の培地であればある程度可能性があるが、根の分化に対しては 16~24 週間以内に分化しない場合には、それ以後において根の分化を誘起することは困難であると考えられる。

つぎに BA の濃度別にみると、根の分化は BA 無添加の場合、NAA 0.01, 0.1 および 1.0 mg/l の 3 区で、BA 0.1 mg/l の場合は NAA 0.1 および 1.0 mg/l の 2 区で、BA 1.0 mg/l では NAA 1.0 mg/l の 1 区でのみみられた。このように根が分化し得る NAA の濃度範囲はカルスの形成や茎の分化の場合に比べて狭く、BA の濃度が高まるとその傾向が著しくなる。

摘 要

アスパラガス実生第 1 次茎の節間部から切りとった約 1 cm の長さの茎切片を寒天固形培養基上で約 1 年間培養し、カルス形成および器官分化の経時的变化について観察を行なった。培地は MURASHIGE and SKOOG の基本培地に 6-benzyladenine (BA) の濃度 4 段階 (0, 0.1, 1.0 および 10.0 mg/l) と NAA の濃度 6 段階 (0, 0.001, 0.01, 0.1, 1.0 および 10.0 mg/l) のそれぞれを組み合わせ、添加した 24 区を設け、置床後は 25°C, 1 日 16 時間照明の下で培養した。調査結果の要はつぎのとおりである。

1. カルスの形成: BA 0.1~10.0 mg/l および NAA 0.1 または 1.0 mg/l を含む培地では、培養後 1~2 週間でカルスの形成がはじまり、3~6 週間後にはすでにカルス形成率が 100% に達した。他の区でも 12~16 週間後までにカルス形成が停止するものが多かったが、BA 10.0 mg/l, NAA 無添加または 10.0 mg/l の区のように 52 週間後までカルス形成率が徐々に増大した区もあった。

2. カルスの生長: BA 0.1~10.0 mg/l, NAA 0.1~

10.0 mg/l でカルスは良く生長した。これらの区のほとんどで、カルスは培養 3~16 週間に旺盛な生長を示し、その後衰えて、やがて生長は停止した。しかし、BA 高濃度 (10.0 mg/l), NAA 低濃度 (0.001~0.1 mg/l) ではカルスの生長が 52 週間後まで続いた。また、いくつかの区で、長期間 (20~40 週間) 経過後急に著しい生長を示した例外的なカルス塊が認められた。

3. 茎の分化: 茎の分化は BA 10.0 mg/l, NAA 1.0 mg/l の区で最も早く、培養開始後 6 週間ではじまった。BA 低濃度 (0.1 mg/l) の区では培養 24 週間以後は茎の分化がみられなかったが、BA 高濃度 (1.0 または 10.0 mg/l) で NAA 低濃度 (0.001~0.1 mg/l) の区では 40~52 週間後まで茎の分化が続いた。最終的には BA 1.0 mg/l, NAA 0.1 mg/l の区で茎の分化率は最も高かった。

4. 根の分化: BA 0~1.0 mg/l, NAA 0.01~1.0 mg/l で、培養 6 週間後にカルスから根の分化が認められた。これらの区では 12~24 週間後にそれぞれの区の分化率の最高値に達し、その後はほとんど根の分化は起こらなかった。この点で茎の分化とはまったく異なった傾向が認められた。

参 考 文 献

- 1) MURASHIGE, T. and F. SKOOG 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **15**: 473-497.
- 2) TAKATORI, F. H., T. MURASHIGE and J. I. STILLMAN 1967. Tissue culture of asparagus plants. *California Agriculture* **21**, 8: 8-9.
- 3) TAKATORI, F. H., T. MURASHIGE and J. I. STILLMAN 1968. Vegetative propagation of asparagus through tissue culture. *HortScience* **3**, 1: 20-22.
- 4) WILMAR, C. and M. HELLENDORF 1968. Growth and morphogenesis of asparagus cells cultured in vitro. *Nature* **217**: 369-370.
- 5) 八鍬利郎・原田 隆・嵯峨紘一・志賀義彦 1971. 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. *園学雑* **40**: 230-236.
- 6) 八鍬利郎・原田 隆・嵯峨紘一・志賀義彦 1971. アスパラガスの形態形成に関する研究 (第 2 報) カルス形成および器官分化におよぼす auxin および 6-benzyladenine の影響. *園学雑* **40**: 347-353.

Summary

Approximately 1 cm length stem segments cut from the internodes of the first stems of asparagus seedlings were cultured aseptically on solid agar medium for about one year. Twenty-four kinds of media were prepared by respective additions of 0, 0.1, 1.0 and 10.0 mg/ℓ 6-benzyladenine (BA) and 0, 0.001, 0.01, 0.1, 1.0 and 10.0 mg/ℓ naphthaleneacetic acid (NAA) to Murashige and Skoog basal medium. The cultures were incubated under constant temperature conditions (25°C) and 16 hour illumination with a 40-watt daylight fluorescent lamp (4,000 lux) per day. The experimental results are summarized as follows:

- 1) Formation of callus: In media containing 0.1, 1.0 or 10.0 mg/ℓ BA and 0.1 or 1.0 mg/ℓ NAA, callus formation was observed as early as the first or second week, and percentage of calls formation reached 100% during the 3rd-the 6th week after the beginning of culture. In almost all other media, callus formation terminated within the 12th to 16th week, but in certain types of media such as that containing 10.0 mg/ℓ BA and 0 or 10.0 mg/ℓ NAA, the percentage of callus formation increased at very slow rate until the 52nd week.
- 2) Growth of callus: In media containing 0.1-10.0 mg/ℓ BA and 0.1-10.0 mg/ℓ NAA, good callus growth was obtained. In almost all of these media, callus grew rapidly between the 3rd and the 16th

week but after that period the growth became slower and then stopped. In media in which the concentration of BA is high (10.0 mg/ℓ) and NAA is low (0.001-0.1 mg/ℓ), callus continued to grow slowly until the 52nd week. In several media, there were a few callus clumps which grew unexpectedly after the 20th-the 50th week. But these are exceptional cases.

- 3) Formation of shoots: The first shoot formation was observed in the 6th week after the beginning of culture in a medium with 10.0 mg/ℓ BA and 1.0 mg/ℓ NAA. In media with a low concentration (0.1 mg/ℓ) of BA, shoot formation terminated within the 24 th week. In media with higher concentrations (1.0 or 10.0 mg/ℓ) of BA and low concentrations (0.001-0.1 mg/ℓ) of NAA however, shoot formation continued until the 40th to 52nd week. At the end of the culture period, the highest percentage of shoot formation was observed in medium containing 1.0 mg/ℓ BA and 0.1 mg/ℓ NAA.

- 4) Formation of roots: In media containing 0-1.0 mg/ℓ BA and 0.01-1.0 mg/ℓ NAA, root formation derived from callus was observed in the 6th week after the beginning of culture. In these media the percentage of root formation reached maximum between the 12th and the 24th week, but after the 24th week, root formation was not observed. This phenomenon is quite different from that in the case of shoot formation.