



# HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	アスパラガスの形態形成に関する研究 : 第8報 若茎各部位の組織培養における器官形成
Author(s)	佐藤, 洋; SATO, Hiroshi; 原田, 隆 他
Citation	北海道大学農学部邦文紀要, 14(1), 76-89
Issue Date	1983-12-23
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/12008">https://hdl.handle.net/2115/12008</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	14(1)_p76-89.pdf



# アスパラガスの形態形成に関する研究

第8報 若茎各部位の組織培養における器官形成

佐藤 洋・原田 隆・八 鍬利 郎

(北海道大学農学部果樹・蔬菜園芸学教室)

(昭和58年8月3日受理)

## Studies on the Morphogenesis of Asparagus

### VIII. Organ formation in the in vitro culture of various segments excised from spears

Hiroshi SATO, Takashi HARADA  
and Toshiro YAKUWA

Department of Horticulture, Faculty of Agriculture,  
Hokkaido University, Sapporo, 060, Japan

#### 緒 言

アスパラガスの無性繁殖法は、実際栽培におけるほか、育種素材や肥料試験などの実験材料を得るためにも極めて利用価値の高いものである。しかし、従来行われていた株分け法では1年間の増殖率は2~5倍にすぎず、また、さし木は現在のところ成功していない。したがって、大量の栄養繁殖を実施するためには組織培養法が最も有効な方法として期待されている。

アスパラガスの組織培養に関する報告はすでに各国でみられ、栄養繁殖を目的としたものもあるが、本研究ではより安定した増殖法を確立する目的で、若茎の小側枝、小側枝の生長点部および若茎中間部の組織片からの増殖法について検討したのでその結果を報告する。

#### 材料および方法

北海道大学農学部附属農場そ菜園に栽植してある7~8年生のアスパラガス株(品種「メリーワシントン500」)から伸長した若茎を用い、培養組織片の種類、培地組成、培養条件などについて、つぎに示すような三項目に属する七つの小実験を行った。

##### I. 若茎頭部小側枝の培養

アスパラガスの若茎の頭部(頂部)には Fig. 1 に示すように多くの小側枝が密生している。これらの小側枝の培養が栄養繁殖に利用できるかどうかを検討するため二つの実験を行った。

##### 実験1. 小側枝の培養における生長調節物質の影響

(1) 培養組織片: 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洗浄した後、頂部約5 cm を切り取り、再度十分に洗浄した。ついでアンチホルミン液(有効塩素1%, Tween 20 数滴添加)に10分間浸漬して表面殺菌を行ない、滅菌水で洗った後、5~10 mm の長さの小側枝を切り取り、培養材料とした。

(2) 培地の調製: 基本培地には MURASHIGE and SKOOG の培地を用い、それに sucrose 0.1 M と所定の生長調節物質を添加した後、pH を 5.5 に調整し、粉末寒天 6 g/l を加えて加熱溶解後、100 ml 容三角フラスコに 25 ml ずつ分注し、アルミホイルで封じた。滅菌は 120°C、1 kg/cm<sup>2</sup> で 15 分間行った。生長調節物質はオーキシンとして  $\alpha$ -naphthaleneacetic acid (NAA) 10<sup>-5</sup> M、 $\beta$ -indolebutyric acid (IBA) 10<sup>-5</sup> M、2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) 10<sup>-5</sup> M を用い、またサイトカイニンとしては N<sup>6</sup>-benzyladenine (BA) 10<sup>-6</sup> M を用いて、それらの組み合わせにより Table 2 に示す 8 区を設けた。

(3) 培養条件: 上記の組織片を 1 容器あたり 2 個ずつ置床し、25°C で培養した。光条件は 5,000 lx 照射(白色蛍光灯, 16 時間日長)と暗黒の 2 条件を設けた。各区は 20 容器 40 組織片とした。

(4) 調査方法: 培養開始 2 週後から 2 週間ごとに小側枝、1 次分枝、2 次分枝の発育、カルスの形成、根の分化などについて調査を行い、14 週後に調査を打ち切っ

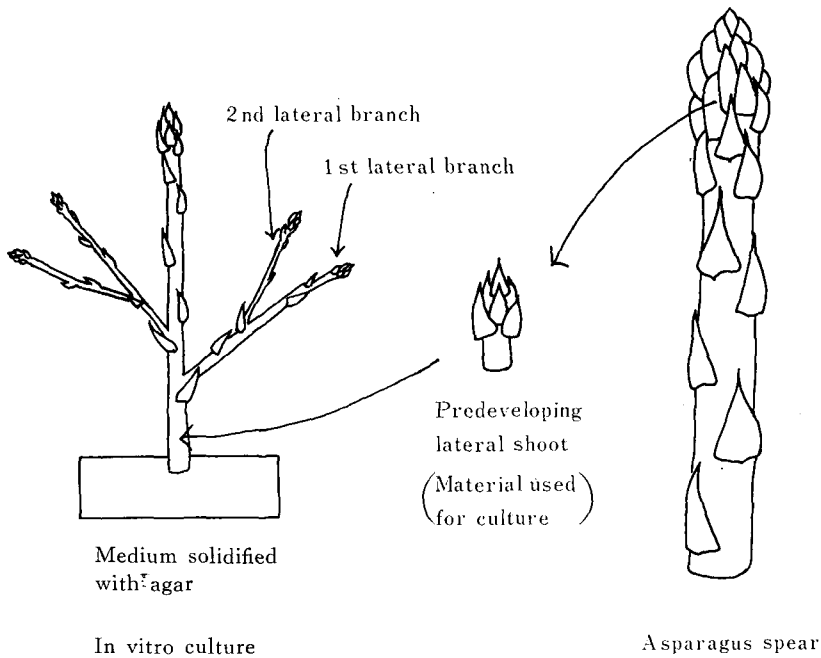


Fig. 1. Materials used for culture in Experiment 1 and 2, and designations of lateral branches developed in culturing.

た。枝の名称については Fig. 1 に示した。

**実験 2. 小側枝の培養における BA と IBA の組合せ添加の影響**

BA を 0,  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$  M の 3 段階とし、これに IBA の 0,  $5 \times 10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $5 \times 10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  M の 5 段階を組み合わせた 15 区を設けたほかは実験 1. と同様の方法で培養した。なお、培養は明所 (5,000 lx, 16 時間日長) で行った。

**II. 若茎頭部小側枝から取り出した茎頂部組織の培養**

若茎小側枝の茎頂を培養し、小側枝の培養結果と比較するためつぎの三つの実験を行った。なお、摘出する茎頂部組織の大きさについても検討した。

**実験 3. 茎頂部組織 (0.2 mm) の培養における光条件の影響**

(1) 培養組織片：若茎の頭部約 5 cm を実験 1. と同様の方法で十分に洗浄した後、りん片葉を除去して小側枝を取り出した。つぎに、それらを再び洗浄し、アンチホルミン液に 10 分間浸漬して表面殺菌を行った。ついで無菌室内で滅菌水で二度洗った後、安全カミソリと針を用い、解剖顕微鏡下で小側枝の生長点部組織を 0.2 mm 以下になるように切り取って培養した。

(2) 培地の調製：無機塩類は MURASHIGE と SKOOG の処方 (1962) に従い、このほか MURASHIGE<sup>11)</sup> の処

**Table 1. Nutrient medium composition in Experiment 3**

Ingredients	Mg/l medium
Inorganic constituents	MURASHIGE and SKOOG, 1962
Organic constituents	
NAA	0.3
Kinetin	0.1
Thiamine·HCl	1.0
Pyridoxine·HCl	5.0
Nicotinic acid	5.0
Myo-Inositol	100.0
Adenine sulfate dihydrate	40.0
Sucrose	25,000.0
Other supplements	
Difco Bacto malt extract	500.0
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	170.0
Difco Bacto agar	6,000.0

方に従い、Table 1 に示す物質を加えた。pH は 5.5 に調整し、寒天 6 g/l 添加後加熱溶解し、20 × 120 mm の試験管に 10 ml ずつ分注した。

(3) 培養条件：上記の茎頂部組織を 1 容器あたり 1

個ずつ置床し、25°Cで培養した。光の条件は、5,000, 1,000, 500 lx および暗黒の4区を設けた。各区は25組織片とした。

(4) 調査方法：茎の発育、カルスの形成、根の分化について調査を行った。

なお、特記しない部分は実験1.と同様である。

#### 実験4. 茎頂部組織 (0.5 mm) の培養における生長調節物質の種類と濃度の影響

(1) 培養組織片：実験3.と同様の方法で摘出した若茎頭部小側枝の茎頂部組織を用いた。ただし組織片の大きさは実験3.よりやや大きく、長さ0.5 mm程度とした。

(2) 培地の調製：実験3.と同様の固形培地を用いたが、添加した生長調節物質についてはBAを0,  $5 \times 10^{-8}$ ,  $10^{-7}$ ,  $5 \times 10^{-7}$  Mの4段階とし、これにオーキシンとしてIBA  $10^{-6}$  MとNAA  $10^{-6}$  Mを組み合わせた8区を設けた (Fig. 8)。

(3) 培養条件：光条件を明所 (1,000 lx, 16時間日長) とした他はすべて実験3.と同様とした。

#### 実験5. 2~3 mmの茎頂部組織の培養

(1) 培養組織片：実験3.と同じ方法で摘出したが大きさは長さ2~3 mmとした。

(2) 培地の調製：生長調節物質の組み合わせをBAが0,  $10^{-7}$ ,  $5 \times 10^{-7}$  Mの3段階、IBAが0,  $5 \times 10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $5 \times 10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  Mの5段階とし、これらを組み合わせた15区を設けたほかは実験3.と同様とした。

(3) 培養条件：光条件を2,500 lx, 16時間日長の明所としたほかは実験3.と同様とした。

### III. 若茎節部切片ならびに節間部切片の培養

若茎の中間部は頂部に比べると節間が伸長しているため節 (腋芽) は少ないが、節部と節間部の輪切り切片を培養した場合に、それぞれの程度の器官形成能を示すかを調べた。

#### 実験6. 若茎節部と節間部切片の比較

(1) 培養組織片：20 cm程度に伸長した若茎を基部から切り取り、頂部と基部を除いた中間部約10 cmを中性洗剤を加えた水道水で十分に洗い、節部のりん片葉を除去した後、4~6 cmに切り、アンチホルミン液に12分間浸漬して表面殺菌を行った。その後滅菌水で洗い、安全カミソリで厚さ5 mm程度の輪切り切片を作り培養した。この場合、組織片は節部を含むもの (節部切片) と含まないもの (節間部切片) の2通りとした。

(2) 培地の調製：生長調節物質無添加区の他、オーキシンとしてNAA, IAA, IBAの3種類を用い、濃度はそれぞれ $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$  Mの単用とした12区、

およびそれぞれの $10^{-5}$  MとBA  $10^{-6}$  Mとを組合せた3区の合計16区を設けた。その他はすべて実験1.と同様とした。

(3) 培養条件：上記の節部切片と節間部切片とを別々に1容器 (100 ml容三角フラスコ) あたり3個ずつ置床し、25°Cで培養した。光の条件は約500 lx, 16時間日長とした。各区に10容器30組織片を用いた。

(4) 調査方法：実験1.と同様に行った。

#### 実験7. 若茎節部切片の培養におけるBAとIBAの影響について

(1) 培養組織片：実験6.と同じ方法で作った節部切片を用いた。

(2) 培地の調製：BA 0,  $10^{-7}$ ,  $5 \times 10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $5 \times 10^{-6}$  Mの5段階のそれぞれにIBA  $5 \times 10^{-6}$  Mを組み合わせた5区を設けたほかは実験6.と同様とした。

(3) 培養条件：光条件を2,500 lx, 16時間日長としたほかは実験6.と同様とした。

## 実験結果

### I. 若茎頭部小側枝の培養

#### 実験1. 小側枝の培養における生長調節物質の影響

(1) 側枝の発育：植え込んだ小側枝は一般にそれほど発育せず、やがてその葉腋部から1次、2次の分枝が伸長した。すなわち、1次分枝の発生は植え込み1~2週後より始まり、BA無添加の区は4週後でほとんど止ったが、BA添加区では6~8週後まで発生が続いた。1次分枝の発生数は、明所培養区では14週後まで増加し続けたが、暗所培養区では2週以降明瞭な増加の傾向は認められなかった。

2次分枝の発育は培養4~6週後からみられ、一般に発育率は14週後まで徐々に増加する傾向が認められたが全く発生しない区もあった。

培養14週後の調査結果はTable 2, 3のとおりで、明所区ではA, C, D, E, F, H区で1次分枝、2次分枝の発生がよく、そのうちA, E, Hの3区では特に分枝数が多かった。暗所区での1次分枝の発生率は、生長調節物質無添加のa区で低かったほかは明所区とほぼ同様の傾向が認められたが、発生分枝数は全般に明所区よりかなり少なかった。また、2次分枝はh区で47%発生したほかは、b, c, e, f区でわずかに認められたにすぎず、a, d, g区では全く認められなかった。

茎の性状は、明所区におけるBA添加区でやや茎色が淡く、実生の茎と同じ性状を有するA, C区と異っていた。また、明所区では1節から多数の茎が発生して叢状

**Table 2.** Effect of growth regulators on callus and organ formation in culturing the predeveloping lateral shoots in the head of asparagus spears under light (after 14 weeks of culture in Expt. 1).

growth regulator	Predeveloping lateral shoot		1st lateral branch			2nd lateral branch	Root formation		callus formation	
	Length (cm)	Thickness*	Percentage of explants developing branches (%)	Number of branches	Percentage of explants with fascicular branches (%)	Percentage of explants developing branches (%)	Percentage of explants developing roots (%)	Percentage of explants developing white roots (%)	Percentage of explants forming callus (%)	size**
None (A)	1.8	1.0	63	8.1	61	60	0	0	16	0.1
NAA 10 <sup>-5</sup> M (B)	1.5	1.0	44	2.5	25	0	41	10	69	2.3
IBA 10 <sup>-5</sup> M (C)	2.7	1.2	64	4.9	44	33	29	7	43	0.7
2, 4-D 10 <sup>-5</sup> M (D)	2.4	1.3	63	2.9	0	5	13	3	22	2.5
NAA 10 <sup>-5</sup> M+BA 10 <sup>-6</sup> M (E)	2.9	2.6	71	7.3	39	30	4	0	93	2.9
IBA 10 <sup>-5</sup> M+BA 10 <sup>-6</sup> M (F)	2.9	2.2	75	5.3	26	33	0	0	79	2.6
2, 4-D 10 <sup>-5</sup> M+BA 10 <sup>-6</sup> M (G)	1.5	2.9	47	5.3	41	21	0	0	78	1.9
BA 10 <sup>-6</sup> M (H)	3.5	2.0	86	7.1	44	63	0	0	64	2.1

\* Thickness was indexed as follows: 0: 2-3 mm, 1: about 5 mm, 2: 5-10 mm, 3: over 10 mm.

\*\* Callus size was indexed as follows: 0.1: trace growth, 0.5: as large as a rice grain, 1.0: as large as an Azuki bean, 2.0: as large as a soybean, 3.0: as large as a broad bean.

**Table 3.** Effect of growth regulators on callus and organ formation in culturing the predeveloping lateral shoots in the head of asparagus spears under darkness (after 14 weeks of culture in Expt. 1).

growth regulator	Undeveloped lateral shoot		1st lateral branch			2nd lateral branch	Root formation		callus formation	
	Length (cm)	Thickness*	Percentage of explants developing branches (%)	Number of branches	Percentage of explants with fascicular branches (%)	Percentage of explants developing branches (%)	Percentage of explants developing roots (%)	Percentage of explants developing white roots (%)	Percentage of explants forming callus (%)	size**
None (a)	1.3	1.0	28	1.6	0	0	0	0	6	0.1
NAA 10 <sup>-5</sup> M (b)	2.8	1.1	50	2.4	0	8	50	21	80	2.6
IBA 10 <sup>-5</sup> M (c)	3.8	1.4	76	2.6	0	6	71	14	91	2.0
2, 4-D 10 <sup>-5</sup> M (d)	1.0	2.0	54	2.2	0	0	13	4	51	1.9
NAA 10 <sup>-5</sup> M+BA 10 <sup>-6</sup> M (e)	2.9	2.4	60	2.9	0	13	0	0	96	3.0
IBA 10 <sup>-5</sup> M+BA 10 <sup>-6</sup> M (f)	4.3	2.4	73	3.3	0	13	0	0	91	2.7
2, 4-D 10 <sup>-5</sup> M+BA 10 <sup>-6</sup> M (g)	2.4	2.4	38	2.1	0	0	0	0	77	2.3
BA 10 <sup>-6</sup> M (h)	3.3	2.1	85	3.6	0	47	5	0	80	2.2

\* Thickness was indexed as follows: 0: 2-3 mm, 1: about 5 mm, 2: 5-10 mm, 3: over 10 mm.

\*\* Callus size was indexed as follows: 0.1: trace growth, 0.5: as large as a rice grain, 1.0: as large as an Azuki bean, 2.0: as large as a soybean, 3.0: as large as a broad bean.

を呈するものが多かったが、暗所区の茎は白色で叢状の茎の発生は認められなかった (Fig. 2)。

(2) カルス形成: カルス形成は小側枝の切断面に主としてみられたが、基部側面、上部からも起こった。

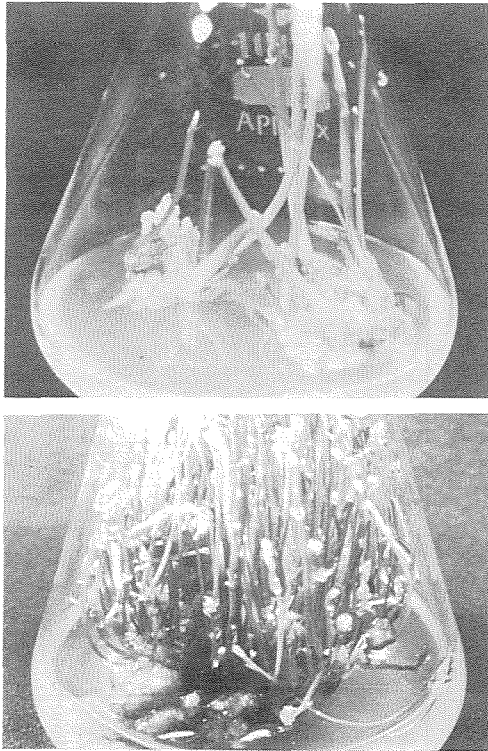


Fig. 2. Growth and multiplication of shoots in culturing the predeveloping lateral shoots: usual (above) and fascicular (below) shooting.

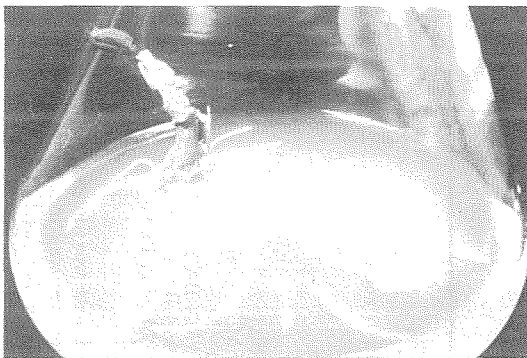


Fig. 3. Formation of white roots resembling a storage root in culturing the predeveloping lateral shoots in the head of asparagus spears.

そして個体によっては小側枝全体がカルスにおおわれることもあった。この現象はオーキシンとBAの両方を添加した区、特にG区で多く観察された。生長調節物質無添加のA, a区は最もカルスの形成率が低く、カルスの生長も劣った (Table 2, 3)。

(3) 根の分化: 主としてオーキシン単独添加区で根の分化が認められた (Table 2, 3)。オーキシンの種別にみると、NAAとIBAを用いた区で分化率が高く、また、これらの区では明所区より暗所区でやや高い傾向が認められた。分化した根は、カルスから再分化した半透明の根が多かったが、オーキシン単独添加区では明暗区を問わず、植え込んだ小側枝の基部から直接発根した白色根も観察された (Fig. 3)。しかし、一般に根の発育は旺盛ではなかった。

#### 実験2. 小側枝の培養におけるBAとIBAの組合せ添加の影響

本実験ではすべての区において1次分枝、2次分枝を発生したが、BA単独の区では培養後期になって茎が枯れてくることがあったので、オーキシンとサイトカニンを組み合わせることが側枝の発育には好ましいものと考えられる。本実験で用いたBAおよびIBAの濃度範囲においては、ともに高い区でカルスの形成率が高かった。また、BA無添加区でIBAが0または $5 \times 10^{-7}$  Mの2区ではカルス形成が全く認められなかった。

根の分化は主として小側枝の基部に起こったが、BA  $10^{-7}$  および  $10^{-6}$  M と IBA  $5 \times 10^{-6}$  および  $10^{-5}$  M を組み合わせた区で分化率が高かった (Fig. 4)。すなわち、本実験の範囲内ではBA  $10^{-7}$  M で IBA  $5 \times 10^{-6}$  あるいは  $10^{-5}$  M において根の分化率が高く、オーキシン単

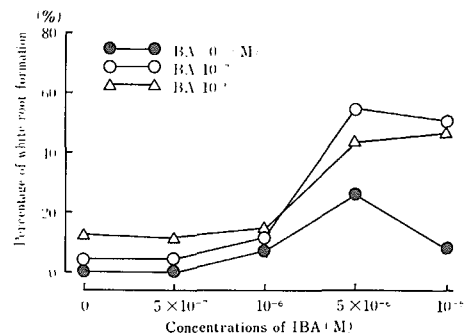


Fig. 4. Effect of growth regulators on the formation of white roots in culturing the predeveloping lateral shoots in the head of asparagus spears (after 12 weeks of culture in Expt. 2).

**Table 4.** Effect of light intensity on callus and organ formation in culturing the 0.2 mm-length apices excised from the predeveloping lateral shoots in the head of asparagus spears (after 14 weeks of culture in Expt. 3).

Light intensity (lx)	Survival rate of explants (%)	Shoot formation			
		Percentage of explants developing shoots (%)	Number of shoots	Length of shoots (cm)	Percentage of explants developing cladophylls (%)
Dark	68	18	2.3	10.8	0
500	80	55	11.5	14.3	73
1,000	68	65	10.4	11.6	64
5,000	50	42	19.4	6.7	80

Root formation				Callus formation	
Percentage of explants developing roots (%)	Percentage of explants developing white roots (%)	Number of white roots	Length of white roots (cm)	Percentage of explants forming callus (%)	size of callus*
76	29	3.0	1.1	100	3.1
100	45	3.0	1.4	100	3.6
96	39	5.4	1.4	100	3.8
100	33	11.8	3.3	100	2.7

\*: Callus size was indexed as follows: 0.1: trace growth, 0.5: as large as a rice grain, 1.0: as large as an Azuki bean, 2.0: as large as a soybean, 3.0: as large as a broad bean.

独のほうが発根のよかった実験 1. の成績とは必ずしも傾向は一致しなかった。

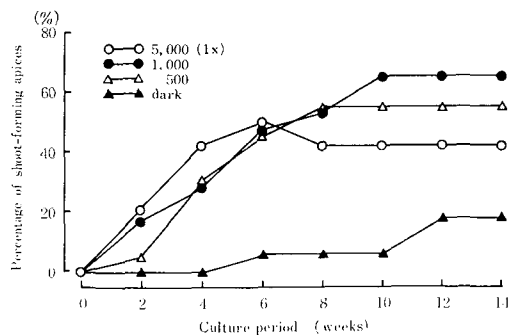
## II. 若茎頭部小側枝から取り出した茎頂部組織の培養

### 実験 3. 茎頂部組織 (0.2 mm) の培養における光条件の影響

(1) 茎の発育: 植え込んだ組織片が 0.2 mm と小さかったため、発育せずに褐変枯死するものがかなりみられた。これらを除いた生存組織片率は 500 lx 区で 80% と高く、5,000 lx 区は 50% で最も低かった (Table 4)。茎の発育は培養 2 週後にすでに認められるものもあったが、10 週後ごろまで発育率が徐々に高まった (Fig. 5)。14 週後における茎発育率は、1,000 lx, 500 lx 区で高く、暗所区は著しく低かった。また、茎の本数は暗所区が特に少なく、5,000 lx で最も多かったが長さは 5,000 lx 区でやや短かった (Table 4)。暗所区の茎は白色で節間が長く、徒長の傾向がみられた。

また、明所区では培養 6 週後より葉状茎が、発生したが、暗所区では認められなかった。しかし、葉状茎の完全な伸長はあまりみられず、5,000 lx 区でいくらかみられた程度であった。

(2) カルスの形成: カルスは生存組織片すべてに形成された。カルスの色は無色透明か淡黄色を呈するものが多かった。しかし、培養初期のころは茎の肥大のよう



**Fig. 5.** Time course changes in shoot formation in culturing the 0.2 mm-length apices excised from the predeveloping lateral shoots in the head of asparagus spears (in Expt. 3).

な感じを与えることもあった。14 週後のカルスの大きさは指数 2.7 (5,000 lx)~3.8 (1,000 lx) で試験管内いっばいに広がり旺盛な生長を示していた (Table 4)。

(3) 根の分化: 根の発生は各区とも培養 3~4 週ごろにはじまり、明所の 3 区では 10 週後に分化率がほぼ 100% に達したが、暗所 (D 区) では他の 3 区よりかなり劣り、14 週後に至っても約 80% であった (Fig. 6)。

分化した根は透明な根 (透明根) と白色の貯蔵根様の太

い根(白色根)とに分けることができたが、白色根を分化した組織片では透明根も分化した場合が多かった。白色根の分化率は500 lx区で最も高く、暗黒区で最も低かった(Table 4)。

なお、茎と白色根の両方を分化し、これらがバランス

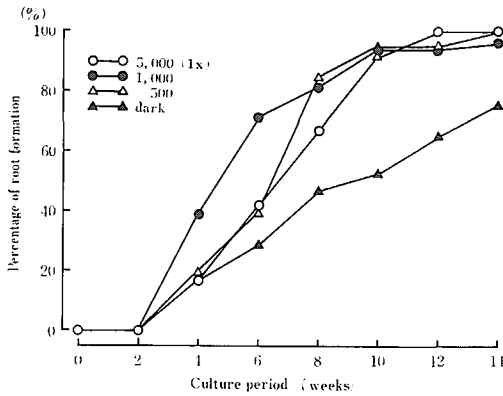


Fig. 6. Time course changes in root formation in culturing the 0.2 mm-length apices excised from the predeveloping lateral shoots in the head of asparagus spears (in Expt. 3).

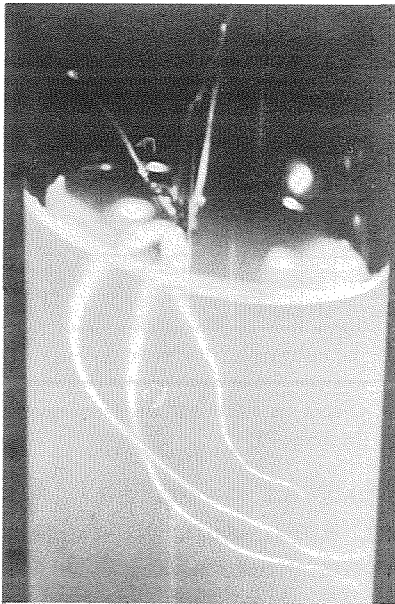


Fig. 7. Shoot and root formation from the 0.2 mm-length apices excised from the predeveloping lateral shoots in the head of asparagus spears (in Expt. 3).

を保って発育した場合は再生植物にまで発育する個体もみられた (Fig. 7)。

実験4. 茎頂部組織(0.5 mm)培養における生長調節物質の種類と濃度の影響

茎の発育は実験3の場合に比べ概して良好で、IBA  $10^{-6}$  M + BA  $5 \times 10^{-7}$  Mの区で茎発育率が劣るほかはほぼ100%の組織片が茎を形成した (Fig. 8)。カルス形成率はNAA添加区で著しく高く、IBA添加区では

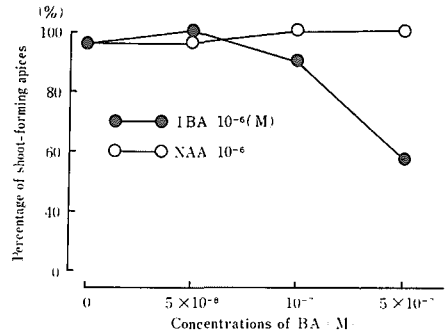


Fig. 8. Effect of growth regulators on shoot formation in culturing the 0.5 mm-length apices excised from the predeveloping lateral shoots in the head of asparagus spears (after 12 weeks of culture in Expt. 4).

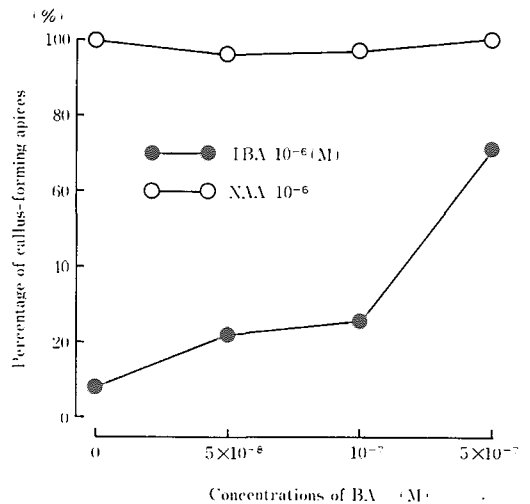
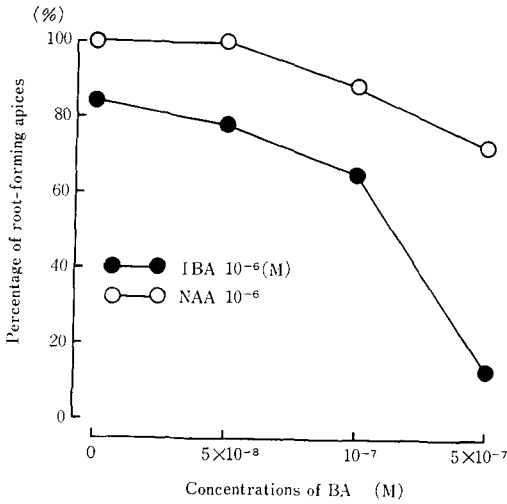
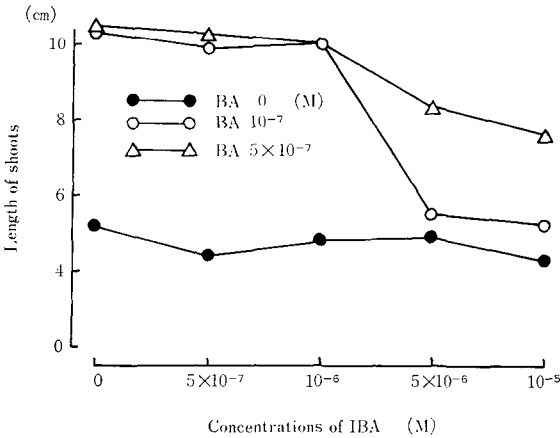


Fig. 9. Effect of growth regulators on callus formation in culturing the 0.5 mm-length apices excised from the predeveloping lateral shoots in the head of asparagus spears (after 12 weeks of culture in Expt. 4).



**Fig. 10.** Effect of growth regulators on root formation in culturing the 0.5 mm-length apices excised from the predeveloping lateral shoots in the head of asparagus spears (after 12 weeks of culture in Expt. 4).

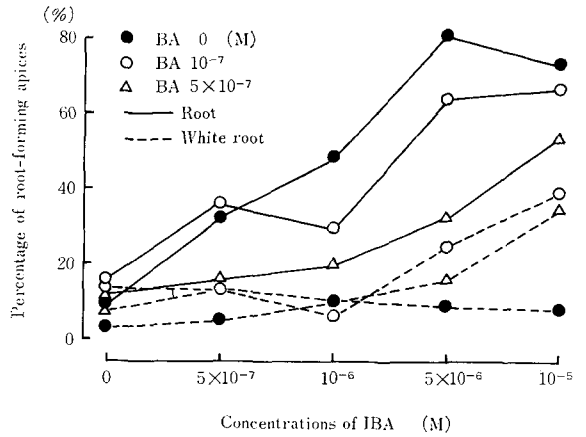


**Fig. 11.** Effect of growth regulators on shoot growth in culturing the 2-3 mm-length apices excised from the predeveloping lateral shoots in the head of asparagus spears (after 12 weeks of culture in Expt. 5).

BA が  $5 \times 10^{-7}$  M の区以外は 30% 以下の形成率であった (Fig. 9)。また、根の分化率は NAA, IBA 両区とも BA 無添加か低濃度で高く、BA が高濃度になると低下する傾向が認められた (Fig. 10)。

**実験 5. 2~3 mm の茎頂部組織の培養**

茎の発育個体率は概して高く、茎の伸長は BA 添加区で



**Fig. 12.** Effect of growth regulators on root formation in culturing the 2-3 mm-length apices excised from the predeveloping lateral shoots in the head of asparagus spears (after 12 weeks of culture in Expt. 5).

良好であった (Fig. 11)。小側枝の培養の場合と同様に BA 単独区では培養後期に枯れてくるものがあった。また、BA が  $5 \times 10^{-7}$  M の区では茎が太くなる傾向が認められた。

根の分化は BA 濃度が低く、オーキシン濃度が高い区で高まる傾向が認められた (Fig. 12)。根の中には組織片からの直接的な白色根の分化も認められたが、これらの根の分化は BA  $10^{-7} \sim 5 \times 10^{-7}$  M, IBA  $10^{-5}$  M を添加した区が良好であり、植物体の再生も若干認められた。カルの形成は根の分化と同様にオーキシンの濃度が高い区で良好であった。

**III. 若茎の節部切片ならびに節間部切片の培養**

**実験 6. 若茎の節部と節間部切片の比較**

(1) 組織片の変化と側枝の発育：オーキシン濃度が高い区では置床した組織片の側面の緑色が淡く、組織片と培地との接触面や置床場所付近の培地が褐変する現象が認められた。節間部切片では腋芽をもたないため、茎を発生するためには不定芽の分化を要し、14 週後の調査では茎は認められなかったが、節部切片では、NAA  $10^{-4}$  M 区を除くすべての区でいくつかの切片に茎の発育がみられた (Table 5, 6, Fig. 13)。茎の発育はオーキシン低濃度において一般に良好であったが、IAA では濃度による発生率の違いは明らかでなかった。すべての区を通じて茎発生率の最も高かったのは IBA  $10^{-5}$  M + BA  $10^{-6}$  M (36%) であったが、小側枝の場合に比べると発生率はかなり低い。これら節部より発育してくる茎 (腋芽)

**Table 5.** Effect of growth regulators on callus and organ formation in culturing the segments with an undeveloped lateral bud sliced from the node-around portion in intermediate part of asparagus spears (after 14 weeks of culture in Expt. 6).

Growth regulator (M)	Shoot formation					Root formation		Callus formation	
	Percentage of explants developing shoots (%)	Number of shoots	Length of shoots (cm)	Percentage of explants developing branches (%)	Number of branches	Percentage of explants developing roots (%)	Percentage of explants developing white roots (%)	Percentage of explants forming callus (%)	size of callus*
None	7	2.7	3.8	2	6.0	0	0	52	0.8
NAA 10 <sup>-7</sup>	16	1.7	4.5	8	7.6	0	0	48	1.1
NAA 10 <sup>-6</sup>	9	1.7	1.3	3	8.0	15	12	91	2.6
NAA 10 <sup>-5</sup>	7	2.0	5.5	2	3.0	28	7	100	2.2
NAA 10 <sup>-4</sup>	0	0	0	0	0	5	0	73	0.7
I AA 10 <sup>-7</sup>	20	1.3	4.1	13	7.8	0	0	40	1.0
I AA 10 <sup>-6</sup>	29	1.5	5.8	14	7.8	0	0	36	0.9
I AA 10 <sup>-5</sup>	21	2.3	4.9	9	15.7	0	0	67	1.2
I AA 10 <sup>-4</sup>	17	2.0	4.4	11	21.0	3	3	42	1.0
I BA 10 <sup>-7</sup>	27	4.6	5.3	10	7.7	0	0	37	0.7
I BA 10 <sup>-6</sup>	17	1.3	5.6	13	7.0	4	0	70	0.7
I BA 10 <sup>-5</sup>	9	2.7	9.3	9	6.3	19	16	81	1.8
I BA 10 <sup>-4</sup>	3	1.0	7.0	3	25.0	3	0	73	1.3
NAA 10 <sup>-5</sup> + BA 10 <sup>-6</sup>	6	1.0	0.3	0	0	54	11	92	3.9
I AA 10 <sup>-5</sup> + BA 10 <sup>-6</sup>	22	4.0	7.2	14	7.6	24	22	70	2.8
I BA 10 <sup>-5</sup> + BA 10 <sup>-6</sup>	36	2.4	6.3	9	5.3	39	30	94	3.7

\*: Callus size was indexed as follows: 0.1: trace growth, 0.5: as large as a rice grain, 1.0: as large as an Azuki bean, 2.0: as large as a soybean, 3.0: as large as a broad bean.

**Table 6.** Effect of growth regulators on callus and organ formation in culturing the segments without a node sliced from asparagus spears (after 14 weeks of culture in Expt. 6).

Growth regulator (M)	Shoot formation					Root formation		Callus formation	
	Percentage of explants developing shoots (%)	Number of shoots	Length of shoots (cm)	Percentage of explants developing branches (%)	Number of branches	Percentage of explants developing roots (%)	Percentage of explants developing white roots (%)	Percentage of explants forming callus (%)	size of callus*
None	0	0	—	—	—	0	0	55	1.0
NAA 10 <sup>-7</sup>	0	0	—	—	—	0	0	72	1.8
NAA 10 <sup>-6</sup>	0	0	—	—	—	14	11	89	2.7
NAA 10 <sup>-5</sup>	0	0	—	—	—	14	3	79	1.5
NAA 10 <sup>-4</sup>	0	0	—	—	—	13	0	87	1.6
I AA 10 <sup>-7</sup>	0	0	—	—	—	5	0	70	0.6
I AA 10 <sup>-6</sup>	0	0	—	—	—	0	0	63	1.0
I AA 10 <sup>-5</sup>	0	0	—	—	—	0	0	76	2.4
I AA 10 <sup>-4</sup>	0	0	—	—	—	2	2	74	1.5
I BA 10 <sup>-7</sup>	0	0	—	—	—	0	0	78	1.0
I BA 10 <sup>-6</sup>	0	0	—	—	—	0	0	80	1.6
I BA 10 <sup>-5</sup>	0	0	—	—	—	12	8	81	2.7
I BA 10 <sup>-4</sup>	0	0	—	—	—	15	11	91	1.8
NAA 10 <sup>-5</sup> + BA 10 <sup>-6</sup>	0	0	—	—	—	64	17	100	4.9
I AA 10 <sup>-5</sup> + BA 10 <sup>-6</sup>	0	0	—	—	—	8	8	85	2.2
I BA 10 <sup>-5</sup> + BA 10 <sup>-6</sup>	0	0	—	—	—	46	34	94	4.2

\*: Callus size was indexed as follows: 0.1: trace growth, 0.5: as large as a rice grain, 1.0: as large as an Azuki bean, 2.0: as large as a soybean, 3.0: as large as a broad bean.

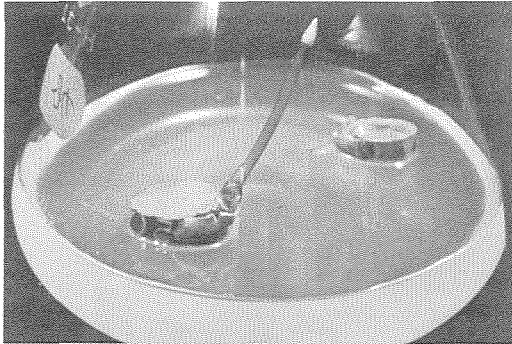


Fig. 13. Development of the lateral branch in culturing the segments (5 mm in thickness) with an undeveloped lateral bud sliced from the node-around portions in intermediate part of asparagus spears.

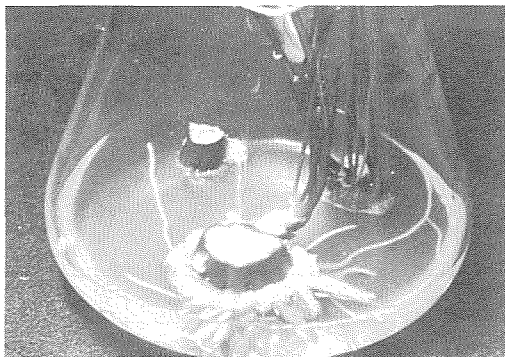


Fig. 14. Shoot and white root formation in culturing the segments with an undeveloped lateral bud sliced from the node-around portions in intermediate part of asparagus spears.

は1~3本で、その太さは2 mm程度のものが多く、実生の茎より太かった。また、オーキシン高濃度 ( $10^{-4}$  M) の区では茎の発生率は低かったが、いったん発育すると叢生状の分枝が多数出るものが多かった。

(2) カルスの形成: カルスは組織片の上部切断面(上面)と基部に形成された。カルス形成率およびカルスの生長は NAA や IBA を  $10^{-5}$  M で単独に用いた場合と、これらのオーキシンに BA  $10^{-6}$  M を加えて用いた場合に概して良好であった。

(3) 根の分化: 生長調節物質無添加区やオーキシン  $10^{-7}$  M のような低濃度区では根はほとんど分化しなかったが、オーキシンが  $10^{-6}$ ~ $10^{-4}$  M の区においては、節の有無に関係なく根の分化が認められた (Fig. 14)。根

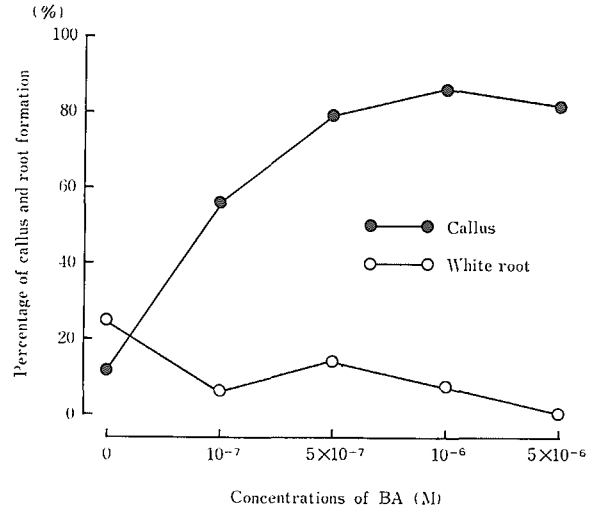


Fig. 15. Effect of growth regulators on callus and root formation in culturing the segments with an undeveloped lateral bud sliced from the node-around portions in intermediate part of asparagus spears (concentration of IBA:  $5 \times 10^{-6}$  M, after 12 weeks of culture in Expt. 7).

の分化率は IAA より NAA と IBA の区が明らかに高かった。また、これらのオーキシンに BA を加えると単独の場合より発根率が高まった (Table 5, 6)。

白色根の分化率は IBA  $10^{-5}$  M+BA  $10^{-6}$  M の区で最も高く、節部組織片で 30%、節間部組織片で 34% であった。また、カルスから再分化した透明根は NAA  $10^{-5}$ ~ $10^{-4}$  M の区と NAA  $10^{-5}$  M+BA  $10^{-6}$  M 区で多かった。

#### 実験7. 若莖節部切片の培養における BA と IBA の影響について

莖の発育率はすべての区で 80% 前後で、実験 6. における節部切片の場合に比べるとかなり高かった。BA  $10^{-6}$ ~ $5 \times 10^{-6}$  M の区では発生した莖が太くなり、生長が劣る傾向が認められた。

根の分化率は概して低かったが、BA 濃度の低いほうがやや根の分化が良い傾向を示した。また、カルス形成は、BA 濃度の高いほうが良かった (Fig. 15)。

#### 考 察

アスパラガスの組織培養は、LOO<sup>8,9)</sup> が shoot の無限生長を行なわせたのに始まり、GALSTON<sup>2)</sup>, GORTER<sup>3)</sup>, ANDREASSEN<sup>1)</sup>らと受け継がれてきた。原田ら<sup>4)</sup>, INA-

GAKIら<sup>6,7)</sup>, TAKATORIら<sup>13)</sup>, WILMARら<sup>14)</sup>, STEWARDら<sup>12)</sup>, 八鍬ら<sup>15,16,17,18)</sup>などはカルスからの幼植物再分化に成功した。しかし、カルス経由の再分化においては遺伝的変異を起こしやすいことが報じられている<sup>10)</sup>。したがって、大量栄養繁殖を実施するには、現在のところ次の二つの方法が考えられる。一つはHASEGAWAら<sup>5)</sup> MURASHIGEら<sup>11)</sup>が茎頂部組織を用いて行っているように植物体のある部位の組織片を培養し、これから直接植物体を再生させる方法であり、もう一つはYANGら<sup>19,20,21)</sup>の進めている方法で、まずある部位の組織片を培養して多量の茎(stock plants)を形成させ、その茎の切片(節部切片など)を培養して多数の植物体を再生させる方法である。

本報告では前者の方法について検討するため、若茎頂部小側枝、小側枝の茎頂部組織および若茎中間部を輪切りにした組織片(節を含むものと含まないもの)を材料として主として培地中の生長調節物質の種類、濃度と光条件を変えて培養してみた。その結果は上述のとおりで、上記3種の組織片の中で茎と根(特に白色根)の両方が発育した率は茎頂部組織において最も高かった。この点からは茎頂部組織の培養はアスパラガスの栄養繁殖の一手段として注目すべきであろう。

しかし、アスパラガスの場合にはただ単に茎と根の発育(分化)率が高いというだけで容易に完全な植物体を再生し得る訳ではなく、移植後確実に活着して発育を続け、完全な植物体となるためには、茎と根との通導組織がつながり、さらに地下茎とりん芽群を形成することが前提条件となる。この点から考えると前述の茎頂部組織の培養が大量増殖のための最良の方法であるとするためには、さらに地下茎、りん芽群の形成についても検討する必要がある。

組織の分化がかなり進んでいる小側枝あるいは若茎の輪切り組織片の培養においても植物体を再生する個体が認められ、また、個体によっては明らかに組織片から直接分化したとみられる根が発生したことは植物学的に極めて興味深く、若茎自体に不定根分化能力が内在していることが考えられ、今後 *in vitro* における研究が基礎となり、その応用として *in vivo* における発根も容易になればアスパラガスの挿木繁殖も可能になるかも知れない。

若茎頂部小側枝の発根率は低かったが、個体によっては茎が濃状に発生するものがあり、多数の茎を得ることができた。このことから、前述の後者の方式、すなわち、まず多量の茎を形成させて、その茎切片から多数の植物

体を再生させる方式によって繁殖を行う場合は、小側枝は多数の組織片を得るための第一段階の材料として利用できるものと思われる。

茎の発育や根の分化におよぼす生長調節物質の影響については、材料の部位によっても多少異なるほか、同じ部位の材料でも実験によって必ずしも一定の傾向が認められない部分があり、さらに検討を要するが、オーキシン単独使用の場合は低濃度のほうが茎の発育に効果的であった。サイトカイニンは適濃度の添加で組織片の生存率を高め、茎の発育にも効果的であるが高濃度では茎が太くなって奇形化し、伸長が停止することもあった。

根の分化については、NAAとIBAの効果は顕著で、適濃度はいずれの場合も $10^{-6}$ ~ $10^{-5}$  Mと考えられた。

根の分化におよぼすサイトカイニンの影響については、オーキシンと併用した場合には効果が認められる場合と認められない場合があった。

光の条件については、暗黒下で茎の発育が劣ったが、根の分化については、一定の傾向は得られなかった。また、光の強さについては、茎頂部組織の培養においては白色根の分化率は、弱光区(500 lx)でやや高いが、茎数や白色根数は強光区(5,000 lx)で多い傾向が認められた。

以上、若茎の三つの部位の組織片の培養結果について考察したが、いずれの部位からも植物体を再生する個体は認められたものの、その率は大量増殖に利用できるほど高いものではなく、特に地下茎、りん芽群の形成についてさらに検討を要するものと考えられる。ただし、ある特定の貴重な株を保存または増殖しようとする場合などは、これらの方法で十分に利用できるものと思われる。

いっぽう、クローンの大量増殖という観点からみれば、本実験では幼植物となったものはそれほど多くはなかったが、それぞれの培養組織片に発生した茎からさらに多くの切片を取り出して培養するなどの方法を繰り返し行うことによって、効率のよい無性繁殖が可能になるものと考えられる。

## 摘 要

組織培養によるアスパラガスの栄養繁殖法を確立するための基礎的実験として、若茎頂部小側枝、小側枝の茎頂ならびに若茎中間部の輪切り組織片(厚さ5 mm、腋芽をもつものともたないもの)の3種の異なる組織片を無菌的に培養した。

培地は、MS培地に $\gamma$ -糖0.1 M、生長調節物質(オーキシンとしてNAA, IBA, 2, 4-D, IAA)を、サイトカイニンとしてBAを、実験に応じて単独または組み合わせ

て用いた) ならびに寒天 0.7% を添加し, pH を 5.5 に調整した。培養は, 25°C で, 明所 (500~5,000 lx, 16 時間日長) または暗所において行った。

1. 材料として用いた 3 種の組織片からは茎の発育, 根の分化が認められ, 植物体を再生したのも認められたが, 輪切り組織片のうち, 腋芽をもたない節間部のみ, 茎の再分化がなく, 幼植物は得られなかった。

2. 茎が発育し, 根も分化した個体の割合は, 頭部小側枝の茎頂を培養した場合に最も高かった。しかし, この場合, とくに効率のよい無性繁殖法を確立するためには, 地下茎の形成についてさらに検討する必要があると思われる。

3. 頭部小側枝の培養においては, 組織片によって多数の茎 (分枝に相当する) が叢状に発生した。これらの茎は節をもっており, この節部切片は, さらに次の培養のための材料として用いることができる。

4. 茎の発生には, オーキシン単独使用の場合はやや低濃度のほうが適しており,  $10^{-4}$  M などの高濃度では阻害されることもあった。また適濃度 ( $10^{-7}$ ~ $10^{-6}$  M) の BA をオーキシンと組み合わせて添加すると, 培養物の生存率が高くなり, 茎の発生も良好となった。しかし, BA が高濃度 ( $10^{-5}$  M 以上) の場合には茎の伸長が抑えられて太くなり, 奇形化した。

5. 根の分化については, 用いたオーキシンのうち, IBA と NAA の効果が大きかった。また, 外観上貯蔵根に類似しているいわゆる白色根の分化については上記のオーキシンの  $10^{-6}$ ~ $10^{-5}$  M の濃度が適していた。

6. 光の条件については, 暗黒下で茎の発育が劣ったが, 根の分化については一定の傾向は得られなかった。また, 光の強さについては, 茎頂部組織の培養においては, 白色根の分化率は弱光区 (500 lx) でやや高いが, 茎数や白色根数は強光区 (5,000 lx) で多い傾向が認められた。

#### 引用文献

- ANDREASSEN, D. C. and ELLISON, J. H.: Root initiation of stem tip cuttings from mature asparagus plants, *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **90**: 158-162. 1967
- GALSTON, A. W.: On the physiology of root initiation in excised asparagus stem tips, *Amer. J. Bot.*, **35**: 281-287. 1948
- GORTER, C. J.: Vegetative propagation of *Asparagus officinalis* by cuttings, *J. Hort. Sci.*, **40**: 177-179. 1965
- 原田 隆・八鍬利郎: 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, 北大農邦文紀, **8**: 175-181. 1972
- HASEGAWA, P. M., MURASHIGE, T. and TAKATORI, F. H.: Propagation of asparagus through shoot apex culture II. Light and temperature requirements, transplantability of plants, and cytological characteristics, *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **98**: 143-148. 1973
- INAGAKI, N., HARADA, T. and YAKUWA, T.: Studies on the anther culture of horticultural crops IV. Effect of growth regulators on organ formation from anther-derived callus of *Asparagus officinalis* L., *J. Fac. Agr. Hokkaido Univ.*, **60**: 236-249. 1981
- INAGAKI, N., HARADA, T. and YAKUWA, T.: Studies on the anther culture of horticultural crops VI. Regeneration of plantlets from shoots obtained through the anther culture of *Asparagus officinalis* L., *J. Fac. Agr. Hokkaido Univ.*, **60**: 275-283. 1982
- LOO, S. W.: Cultivation of excised stem tips of asparagus in vitro, *Amer. J. Bot.*, **32**: 13-17. 1945
- LOO, S. W.: Further experiments on the culture of excised asparagus stem tips in vitro, *Amer. J. Bot.*, **33**: 156-159. 1946
- MALNASSY, P. and ELLISON, J. H.: *Asparagus tetraploids* from callus tissue, *HortScience*, **5**: 444-445. 1970
- MURASHIGE, T., SHABDE, M. N., HASEGAWA, P. M., TAKATORI, F. H. and JONES, J. B.: Propagation of asparagus through shoot apex culture I. Nutrient medium for formation of plantlets, *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **97**: 158-161. 1972
- STEWART, F. C. and MAPES, M. O.: Morphogenesis and plant propagation in aseptic cultures of asparagus, *Bot. Gaz.*, **132**: 70-79. 1971
- TAKATORI, F. H., MURASHIGE, T. and STILLMAN, J. I.: Vegetative propagation of asparagus through tissue culture, *HortScience*, **3**: 20-22. 1968
- WILMAR, C. and HELLENDORF, M.: Growth and morphogenesis of asparagus cells cultured in vitro, *Nature*, **217**: 369-370. 1968
- 八鍬利郎・原田 隆・嵯峨絃一・志賀義彦: 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. 1971
16. 八鍬利郎・原田 隆・嵯峨絏一・志賀義彦：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管分化におよぼす auxin および 6-benzyladenine の影響, 園学雑, 40: 347-353. 1971
  17. 八鍬利郎・原田 隆・稲垣昇・志賀義彦：アスパラガスのやく培養におけるカルスの誘導と器管分化, 園学雑, 41: 272-280. 1972
  18. YAKUWA, T., HARADA, T. and TSUJI, H.: Studies on the morphogenesis of asparagus IV. The effect of transplanting on callus and organ formation of stem segment cultured in vitro, *J. Fac. Agr. Hokkaido Univ.*, 61: 151-159. 1982
  19. YANG, H. J. and CLORE, W. J.: Rapid vegetative propagation of asparagus through lateral bud culture, *HortScience*, 8: 141-143. 1973
  20. YANG, H. J. and CLORE, W. J.: Development of complete plantlets from moderately vigorous shoots of stock plants of asparagus in vitro, *HortScience*, 9: 138-140. 1974
  21. YANG, H. J. and CLORE, W. J.: In vitro reproductiveness of asparagus stem segments with branch-shoots at a node, *HortScience*, 10: 411-412. 1975

### Summary

Three kinds of tissues were excised from asparagus young spears (20 cm in height): ie, small predeveloping lateral shoots in a head, the apex of the predeveloping lateral shoots and the segments 5 mm in thickness with or without an undeveloped lateral bud sliced from the middle portion of the spears. These were aseptically cultured in vitro to obtain a fundamental knowledge for establishing a vegetative propagation method of asparagus.

The media contained MS medium, 0.1 M sucrose, auxins and cytokinin, and were solidified with 0.7% agar after pH adjustment of 5.5. The growth regulators used were added separately or in combination according to the objectives of the experiments.

The cultures were maintained at 25°C under

artificial light (500-5,000 lx with white fluorescent lamps, 16-hour day length) or in the dark. The results obtained are summarized as follows:

1. Shoot development and root differentiation were recognized and some plantlets were obtained in culturing three kinds of tissues used in the present experiments. However, the sliced segments without a bud alone showed no shoot differentiation and could obtain no plantlet.

2. The percentage of the segments developing both shoots and roots was highest in culturing the apices of the predeveloping lateral shoots. However, to establish an useful method for mass propagation, further studies should be required in connection with the formation of a rhizome.

3. In culturing the predeveloping shoots, many shoots developed fasciculately on several cultures. The node of such fascicular shoots may be used as an useful material for multiplication of a clone.

4. Comparatively lower concentrations of the auxins used separately provided a better development of the shoots than higher concentrations of those. High concentrations of  $10^{-4}$  M of auxins sometimes inhibited shoot formation. Optimal concentrations of BA combined with auxins made survival rate higher and enhanced the development of the shoots, whereas higher concentrations of BA (over  $10^{-5}$  M) inhibited the growth of the shoots and made them thick and deformed.

5. As to root differentiation, IBA and NAA showed a slightly higher effectiveness among four different auxins used in the present experiments. In addition,  $10^{-6}$  to  $10^{-5}$  M of auxins was better in the differentiation of the white roots that resembled a storage root.

6. With regard to light conditions, shoot development was better under light than in the dark, while root differentiation showed no strict tendency. In culturing the apices of the predeveloping lateral shoots, percentage of a white root-differentiating segments was slightly higher under lower light intensity (500 lx), while number of both developing shoots and differentiating white roots appeared to be large under high light intensity (5,000 lx).