



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	アスパラガス (<i>Asparagus officinalis</i> L.)組織からの器官形成とその利用に関する研究
Author(s)	原田, 隆; HARADA, Takashi
Citation	北海道大学農学部邦文紀要, 16(4), 301-346
Issue Date	1989-09-05
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/12107
Type	departmental bulletin paper
File Information	16(4)_p301-346.pdf



アスパラガス (*Asparagus officinalis* L.) 組織からの 器官形成とその利用に関する研究

原 田 隆

(北海道大学農学部果樹蔬菜園芸学講座)

(平成元年4月8日受理)

Studies on Organogenesis of *Asparagus officinalis* L., Tissues and its Utilization

Takashi HARADA

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

目 次

緒 言	302	第3章 培養体に発生した茎の茎頂および 節部組織の培養	326
第1章 実生組織の生体外培養	302	第1節 培養体茎頂の培養	326
第1節 実生の茎節部組織の培養	303	I 茎頂 (0.5 mm) からの器官分化に及 ぼす IBA および NAA の影響	326
第2節 実生の茎節間部組織の培養	307	II 培養体茎頂の培養における組織片の 大きさと器官分化	327
I 生長調節物質の影響	307	第2節 培養体の茎節部組織の培養	327
II 糖の種類および濃度の影響	312	I IBA を含む液体培地による前培養と 移植の効果	327
III pH の影響	314	II NAA を含む液体培地による前培養 と移植の効果	328
IV 移植の影響	315	第3節 考 察	330
第2章 若茎組織の生体外培養	318	第4章 アスパラガスにおける組織からの 器官形成技術の利用	333
第1節 若茎頭部小側枝の培養	318	第1節 液体窒素による有用遺伝子源の 凍結保存における利用	333
I 若茎頭部小側枝の培養における オーキシシン (NAA, IBA, 2, 4-D) およびサイトカイニン (BA) の影響	318	I 液体窒素中で凍結した茎端の生存に 及ぼす凍害防御物質の影響	333
II 若茎頭部小側枝の培養における BA および IBA の組合せ添加 の影響	320	II 液体窒素中で凍結した茎端の生存に 及ぼす予備凍結温度の影響	334
第2節 茎頂部組織の培養	321	III 液体窒素中で凍結した茎端の生存に 及ぼす予備凍結冷却速度の影響	334
I 茎頂部組織 (0.5 mm) の培養における オーキシシン (NAA, IBA) および サイトカイニン (BA) の影響	321	IV 考 察	335
II 茎端 (2~3 mm) の培養における オーキシシン (IBA) および サイトカイニン (BA) の影響	322	第2節 雌性系誘育成における超雄株増殖 への利用	335
III 茎頂部組織 (0.2 mm) の培養における 光条件の影響	322	第5章 総 合 考 察	337
		第6章 摘 要	338

引用文献	340
Summary	344

緒 言

近年、わが国においても、生鮮野菜としてのアスパラガス (*Asparagus officinalis* L.) の需要は増大しており、栽培面積も拡大しつつあるが、それに伴って、栽培地域も従来の北海道、東北、中部地方高冷地のほか、近畿、中国、四国、九州などの暖地にまで急速に広がりがつつある。とくに、冷涼地である北海道においては、生鮮野菜としてのグリーンアスパラガスおよび缶詰用としてのホワイトアスパラガスのいずれにおいても良質なものが生産され、主要な特産園芸作物の一つとなっている。

一方、アスパラガスを、栽培植物あるいは研究・実験対象植物としてみた場合、次のような特色をもっている。すなわち、多年生作物であり、栽培様式にもよるが、発芽から収穫開始期まで約3年を要し、長い場合には二十数年にも亘って同一の株から若茎を収穫することができる長い生活環をもつ作物であること、また、地下茎を有するなど第1章において述べるように植物体の形状が極めて特異的であること、さらに、同一品種・系統の中においても、各種の形質についてみた場合比較的個体間差が大きいことなどである。したがって、実験対象植物としては取扱いが極めて困難なものの一つであり、各種の実用的技術の確立に関する試験は、それを実施する上で、試験の規模、精密性など各種の点において困難を伴うことが極めて多かった。

現在の実際栽培においては有性繁殖法が用いられているが、上述のような状況から栄養繁殖の効用が大きいと考えられる。しかし、現在までのところ極めて効率の低い株分け法が可能であるのみで、さし木などの実用的な大量増殖法は確立されていない。このようなことから、栄養繁殖を目的とした組織培養に関する研究が、TAKATORIら^{1,2)}を初めとして多くの研究者^{3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13)}によって行われてきたが、未だ、実用的な大量増殖法を確立するまでに至っていない。

一方、アスパラガスの生理的な現象をより精密に解明するための実験法としても生体外培養法が用いられるようになり、生長調節物質の生成¹⁴⁾、酵素^{15,16,17)}などに関する研究が報告されている。

本研究では、アスパラガスにおける優良系統の能率的な栄養繁殖技術を確立するための基礎的知見を得ること、およびアスパラガス組織の生体外培養によって各組織・器官から得られた植物体の有効な利用法を確立する

ことを目的として、アスパラガスの各種組織からの器官形成について究明した。また、その利用面として、特に茎頂培養法のアスパラガス有用遺伝子源の凍結保存技術、ならびにアスパラガス雄性系統の育成における超雌株の栄養繁殖への利用について検討した。

本研究の遂行ならびに本論文の取りまとめに当たり、終始御懇篤なる御指導と御鞭撻を賜わった北海道大学農学部 田村 勉教授に深甚なる感謝の意を表する次第です。

また、本論文を取りまとめるに当たり、御懇切なる御指導と貴重な御教示を賜わるとともに御校閲の労をとられた北海道大学農学部 岡澤養三教授ならびに同 筒井澄教授に衷心より深く感謝申し上げる次第です。さらに、本研究の遂行ならびに本論文の取りまとめの過程において、終始御指導と御激励を賜わるとともに御校閲の労をとられた北海道大学農学部 八鍼利郎助教授に衷心より厚くお礼申し上げます。

また、本研究を実施する過程において北海道大学農学部果樹蔬菜園芸学講座ならびに附属農場園芸第一部の各位より多大なる御協力と御配慮をいただいた。ここに記して厚くお礼申し上げます。

第1章 実生組織の生体外培養

アスパラガスの発芽直後の実生は、すでに地下茎の先端にある鱗芽を形成し始めており、第1次茎、第2次茎と順次分化する。

一方、根については、幼根に続いて第2次根、第3次根と分化させつつ、しだいに幼植物から成植物へと発育する。

圃場におけるアスパラガスの通常の発育過程においては、発芽後0.5~1年間の幼植物時代(いわゆる育苗期)を経過したのち圃場に定植され、発芽後3年間を経過した時点で若茎の収穫が可能な成植物体となる。

組織培養においては、培養する組織・器官の発育程度またはそれらの由来する植物体の齢がカルス形成・器官分化などに大きな影響を及ぼすことが認められている。

実生の組織は、植物組織の有する若さ(juvenility)という点においては、その性質を最も高度に保持しているとともに、生体外培養においても、成植物体のそれらに比べて感応が鋭敏であると想像される。

本実験は、上述の観点から特に実生の茎切片の培養を行い、それらがいかなる感応または形態形成を示すかという点について調査するとともに成植物体の組織を培養する場合の基礎となる知見を得るために行った。

第1節 実生の莖節部組織の培養

1. 材料および方法

(1) 培養組織片の作製

アスパラガス (*Asparagus officinalis* L. 品種メリーワシントン 500) の種子を70% エタノールに瞬時浸漬したのち、次亜塩素酸ナトリウム溶液(有効塩素1%, Tween 02 数滴添加) 中で30分間表面殺菌を行った。

その後直ちに、滅菌水で表面を数回洗浄したのち寒天固形培地(シュクロース 20 g/l および寒天 6 g/l を含む) 上で、25°C, 暗所において無菌的に発芽させた。

2週間後、長さ約5 cm 太さ約1 mm 程度に発育した第1次莖(葉緑素がなく白色で節部には擬葉が着生していない)の節部から、節を中央部にもつ約1 cm の切片を切り取って培養した。なお、組織片は、1容器(100 ml 容三角フラスコ) 当たり3個、1区当たり60個とした。

(2) 培養基および培養方法

培養基は、MURASHIGE and SKOOG の培地(以下MS 培地と称する)¹⁸⁾ を基本とし、これにシュクロース 20 g/l, 生長調節物質および寒天 7 g/l を含み、pH を5.5に調整したものである。

生長調節物質については、NAA(1-naphthaleneacetic acid) 0, 0.001, 0.01, 0.1, 1.0 および 10.0 mg/l ならびに BA (N⁶-benzyladenine) 0, 0.1, 1.0 および 10.0 mg/l を組み合わせて添加した24実験区を設けた。培地のpHは5.5に調整し、滅菌は、1 kg/cm² で15分間行った。なお、培養基の量は1容器(100 ml 容三角フラスコ) 当たり25 ml とした。

培養は25°C で明所(4,000 lx, 16時間日長, 白色蛍光灯) または暗所において行った。

2. 結果

(1) 莖形成

莖は、明所培養または暗所培養のいずれにおいても培養開始2~3日後に節部から発生し、5日後には約3 cm 程度に発育した。莖は明所では緑色となり一定期間経過後にその節部に擬葉を着けたが、暗所では白色となり擬葉は着けなかった。

形成されたカルスからの莖の再分化は第1章第2節で述べるように実生莖節間部切片の培養においてはみられたが、本実験においては観察されなかった。

培養11週間後における莖発育組織片率は Fig. 1 に示したとおりである。NAA 無添加または0.1 mg/l 以下の濃度で添加した場合には、BA との組合せ添加の有無によらず85~100% の莖発育組織片率を示した。しか

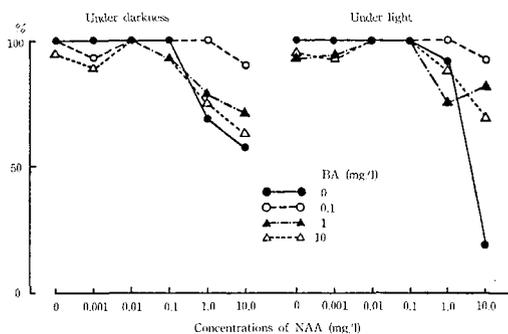


Fig. 1. Percentage of shoot-forming segments after 11 weeks of *in vitro* culture of shoot segments (with a node) excised from asparagus seedlings.

し、NAA 濃度が1.0または10.0 mg/l と高くなるに従ってその率は漸時低下した。特に、生長調節物質無添加でも莖が伸長したことは興味深い。

明所と暗所とを比較すると、NAA 10.0 mg/l 単用の場合に明所においてその率が低かったこと以外は、全体的にはほぼ同様の傾向であった。莖数については、Fig. 2 に示したとおりで、概して、暗所におけるよりも明所において多く発生した。明所においては、1~6本の範囲にあり、NAA および BA の濃度に応じて変動した。すなわち、NAA 添加の有無にかかわらず、BA 0.1 mg/l 添加の場合に最も多く、また、BA 添加および無添加のいずれの場合においても、NAA 10 mg/l 添加の場合に最も少なかった。一方、NAA 単用の場合では、0.1 mg/l のとき多かった。1組織片当り平均最大莖数は6本で、

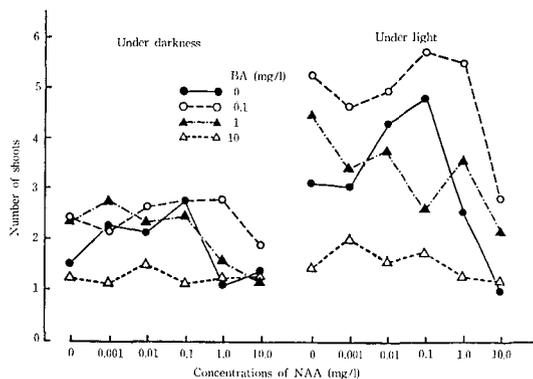


Fig. 2. Number of shoots elongating on the node of segments after 11 weeks of *in vitro* culture of shoot segments (with a node) excised from asparagus seedlings.

NAA および BA ともに 0.1 mg/l の明所培養の場合であった。一方、暗所培養の場合には、平均茎数は1~3本で、NAA および BA の有無または濃度の違いによる差はほとんど認められなかった。

培養2週間後における茎の長さは Fig. 3 に示したとおりである。明所培養では、NAA 0.001 mg/l を添加したときに、また、暗所培養では、NAA 0.01 mg/l のときに茎長は最大であった。茎長が最小となったのは、明所および暗所のいずれにおいても、NAA および BA の濃度が高い場合であった。一方、NAA 無添加または低濃度添加の場合には、茎長は、BA 無添加のとき最も長く、BA を添加すると、その濃度が高くなるに従って短くなった。

茎の太さについては、Fig. 4 に示したとおりで、BA

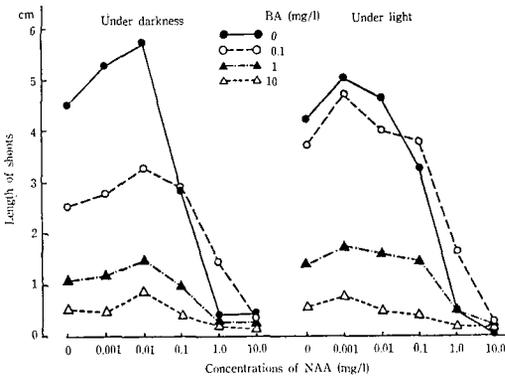


Fig. 3. Length of shoots after 2 weeks of *in vitro* culture of shoot segments (with a node) excised from asparagus seedlings.

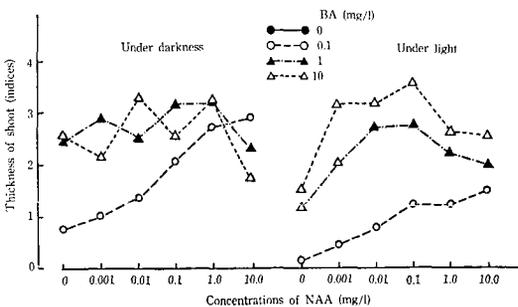


Fig. 4. Thickness of shoot after 11 weeks of *in vitro* culture of shoot segments (with a node) excised from asparagus seedlings. Indices: 0, approximately 1 mm in diameter as thick as a normal shoot of the seedling; 1, 1.5 folds of normal thickness; 2, 2 folds; 3, 2.5 folds; 4, 3 folds.

無添加の場合には、NAA 添加の有無ならびに明所および暗所の別によらず茎は正常な発育を示した。しかし、BA を添加すると、明所および暗所のいずれにおいても茎が太くなり、特に BA 高濃度の場合には非常に太くなった。さらに、BA に NAA を組み合わせて添加すると、BA 単用の場合よりもさらに太くなる傾向が認められた。

(2) 根の形成

形成された根には2種の性状があった。すなわち、一つは貯蔵根様であって分岐のある白色の根(本報告では opaque-type root と呼ぶ)で培養組織片の節部から直接伸長するものであり、他は半透明で比較的短く分岐もほとんどなく、形成されたカルスから再分化する根(本報告では semitransparent-type root と呼ぶ)である。特に前者すなわち貯蔵根様の白色根は明所培養においてのみ認められたが、後者すなわち半透明根は明所および暗所の両条件下において認められた。

つぎに、生長調節物質との関連についてみると Fig. 5 に示したとおりで、白色根は、明所培養の場合の生長調節物質無添加または NAA および BA 低濃度添加のところで形成され、NAA 0.01 mg/l 以上および BA 1.0 mg/l 以上を添加した場合には、全く形成されなかった。

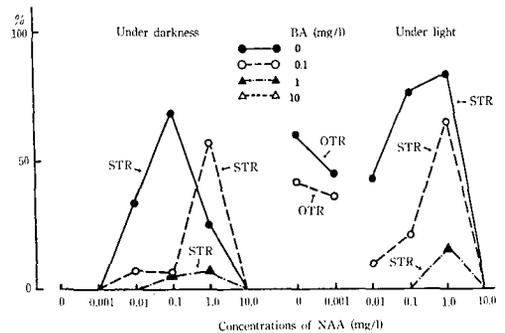


Fig. 5. Percentage of root-forming segments after 11 weeks of *in vitro* culture of shoot segments (with a node) excised from asparagus seedlings. OTR: opaquetype root, STR: semitransparent-type root.

一方、半透明根の再分化の場合は次のとおりである。すなわち、暗所培養においては、NAA 単用の場合には 0.1 mg/l が至適濃度で約 70% の再分化率を示したが、NAA に BA 0.1~1.0 mg/l を組み合わせて添加した場合には、NAA の至適濃度は 1.0 mg/l と高い方へ移行した。

次に、明所の場合についてみると、BA 組合せ添加の有無によらず NAA 1.0 mg/l に至適濃度があった。とくに NAA 1.0 mg/l 単用では 83% と最も高い再分化率を示したが、BA 添加の場合には、BA 0.1 mg/l で 67% を示し、BA 濃度が高くなるにしたがって再分化率は低下した。なお、BA 10.0 mg/l を添加した場合には、暗所および明所のいずれにおいてもカルスからの根の再分化はみられなかった。

(3) カルスの形成と生長

カルス形成は、培養 1~2 週間で認められた。培養 11 週間後のカルス形成組織片率は Fig. 6 に示したとおりで、暗所培養についてみるとつぎのとおりである。すなわち、NAA 単用の場合は、0.01 mg/l 以上の濃度においてカルス成形がみられ 0.1~10.0 mg/l では 90~100% であった。しかし、NAA 単用の場合の 0.001 mg/l では全くカルス形成はみられなかった。一方、生長調節物質無添加の場合には全くカルス形成はみられなかったが、BA のみを添加することによりカルス形成を誘起することができた。この場合、BA 1.0 mg/l でカルス形成率が最も高く約 90% となり、BA 濃度が高いかまたは低くなるにつれて形成率は低下した。

カルス形成組織片率は、概して、明所培養の場合に比べて暗所培養の場合のほうがやや高い傾向が認められた。

カルスの生長は Fig. 7 に示したとおりで、11 週間後のカルス塊の大きさは、概して NAA 単用の場合より

も NAA と BA とを組み合わせる添加した場合に大きく、特に NAA 0.1~10.0 mg/l の場合にカルスの生長は良好であった。NAA 単用の場合には 1.0~10.0 mg/l の範囲ではかなりの生長を示したが、BA 単用の場合には、カルスが誘導されやや生長したものの、その後生長は停止した。

カルスの色についてみると、明所培養においては、緑色で緻密なカルスが一つのカルス塊の大部分をしめていたが、部分的に葉緑体をもたず白色透明でやや柔かなカルスを形成した。一方、暗所培養にあっては、後者すなわち白色半透明の柔かなカルスのみが認められた。

(4) 幼植物の再生

茎および貯蔵根様白色根をもっている培養体は、培養容器から取り出し、水で充分洗浄して付着している寒天を除去してから鉢上げすることによって、完全な植物体となった。

鉢上げに先立って、培養容器中の寒天培養基（基本培地、糖および生長調節物質を含む）上で茎および根を形成し植物体としての体制を整えた培養物（幼植物）を生長調節物質および糖を除去した培地（基本培地中の無機物質のみ含む）に移植して一定期間馴化してから鉢上げしたところ、この幼植物は生長を続け新しい茎および根を発生させた。

したがって、この幼植物は独立栄養の機能を獲得しているものと思われる。

このように、本実験においては、一定期間馴化する方

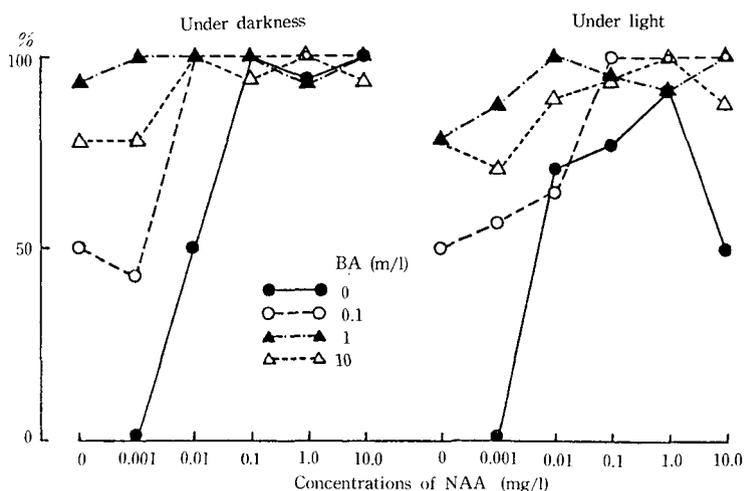


Fig. 6. Percentage of callus-forming segments after 11 weeks of *in vitro* culture of shoot segments (with a node) excised from asparagus.

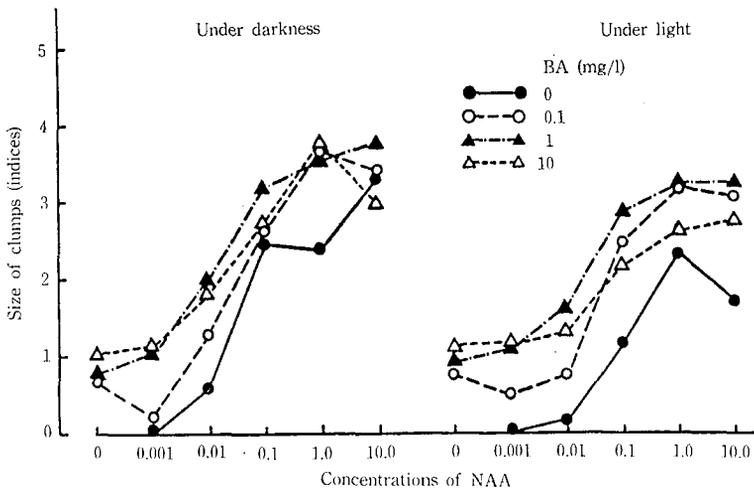


Fig. 7. Growth of callus after 11 weeks of *in vitro* culture of shoot segments (with a node) excised from asparagus seedlings. Indices: 1, a size as large as a sphere with a diameter 3 mm long; 2, 5 mm; 3, 7 mm; 4, 9 mm, respectively.

法も行ったが、特に馴化は行わず、培養容器から直接鉢上げする（培養床はパーミキュライトまたはパーミキュライトと土を1:1に混合したものを使用した）ことによって、完全な植物体を育成することができた。なお、いわゆる透明根を分化した培養物については、その後一定期間前述の馴化を行うことによって、正常な機能を有すると思われる貯蔵根様白色根を形成させることが可能であることがわかった。

3. 考察

本実験においては、培地に生長調節物質を添加しない場合においても、培養組織片の節部からの茎の発生がみられ、茎発育組織片率は100%と高く、適濃度の生長調節物質を添加した場合と同じ茎発育組織片率を示した。

一方、発生した茎の数についてみると、概して発生茎数も多く、また茎発生に及ぼす生長調節物質の影響も顕著に現われた。これは、YANG および CLORE らの、若茎側芽¹³⁾、培養体のシュート^{19,20)}を用いた実験の結果と同様であった。

また、茎の長さについてみると、低濃度の NAA を単独で用いた場合には、やや茎の伸長を促進したが、BA 単用または NAA と BA とを組み合わせて用いた場合にはむしろ茎の伸長を抑制した。

また、茎の太さは、BA の影響を受けるところが大きく、BA を添加した場合に茎が太くなったが、このことはアスパラガスの他の組織たとえば後述の若茎系組織ま

たは実生の茎節間部切片を培養したときのカルスからの茎の再分化の場合と同様である。また、エンドウ芽生えの黄化した茎の切片²¹⁾を用いた実験においてもカイネチンと同様の作用が認められている。

根の分化については、前述のように白色で正常な機能を有すると思われる貯蔵根様白色根は組織片の節の部分から直接発生し、とくに明所における生長調節物質無添加または低濃度添加のところにおいてのみ発生した。これらの根は、明所において生長調節物質高濃度添加の場合には全くみられず、暗所培養の場合には生長調節物質無添加または低濃度添加のときでも全くみられなかった。このことから、いわゆる白色根の発生は光条件と関連があるものと考えられる。

カルスから再分化した半透明な根については次のようなことが考えられる。第2節で述べるように実生節間部切片の培養においては NAA 単用の場合には、明所および暗所のいずれにおいても、根分化組織片率は NAA 0.1 mg/l の場合に最も高かった。しかし、NAA と BA とを組み合わせて添加した場合には、NAA 1.0 mg/l のとき最も高くなった。換言すれば、前者の場合の曲線の頂点が、BA と組み合わせて添加することにより10倍高い方へ移動したことになる。

しかし、本実験のような節部切片の培養においては、上述のような傾向は、暗所培養の場合においてのみ認められ、明所培養の場合には、NAA 単用または NAA お

および BA の組み合わせ添加のいずれの場合にも、NAA 1.0 mg/ℓ で根分化組織片率は最も高かった。

これについては次のように考えることができる。本実験においては節部切片を培養したため節部よりまず茎が伸長した。幸田および岡沢²²⁾は、アスパラガス芽生えの茎端部の生体外培養を明所で行ない、茎端部においてサイトカイニンが生成されることを認めている。上述の明所における結果はこのことと関連があり、茎端で生成されたサイトカイニンが何らかの形で根の分化に影響を及ぼしているものと考えられる。

一方、本実験の結果を圃場におけるアスパラガスの発育過程或は形態形成の観点からみると興味深い。アスパラガスでは、発芽して第1次茎(太さ約1mm)が発生し、長さは屋外における通常の照度のもとでは7~15cmとなる。この第1次茎の節部から針状の擬葉(長さ0.5~2.0cm)が1節につき3~10本発生する。本実験の場合のように暗所において発芽させると、第1次茎は白色となり、強光下における場合と異なって、徒長して節部からは擬葉が全く伸長しない。

本実験では、このような第1次茎の節部から組織片をとって培養したのであるが、本来擬葉が発生すべきところが茎(植物体の体制上は第1次側枝)が発生したことになる。このような発生した器官の形態上の変化は、今後の形態形成の研究上興味深いものがある。

なお、YANG と CLORE^{13,19,20)}は、培養体に発生した茎から節部切片を取り出して培養し、その節部に茎および根が形成されたと報告している。同じく YANG and CLORE²³⁾は、アスパラガスの若い株から発生した茎(直径1.5~2.2mm長さ0.9~1.3m)の基部に近い節(側枝は伸びていない)に IAA およびカイネチンをラノリンペーストの状態と与え、この部分に、aerial crown(地下茎の先端部の鱗芽群を含む部分に相当するものが地上茎の節部に形成されたためこの呼称が用いられた)を形成させている。本実験で用いた極く若い実生の茎の節部を培養した場合の節部における茎の発生、根の発生および鱗芽の形成と、これらのことを考え合わせると、節部における器官形成能の存在という観点から今後の研究に示唆を与えるものと思われる。

第2節 実生の茎節間部組織の培養

本節では、培養組織の‘若さ’(juvenility)という点に注目して、実生の茎節間部切片を培養し、カルス形成ならびに器官分化について調べた。

I 生長調節物質の影響

本項では、カルスからの器官の分化におよぼす生長調節物質の影響をより明確にするため、実生1次茎節間組織片を用いて実験を行った。その結果、培地中の BA およびオーキシンの添加量を調節することにより、SKOOG²⁴⁾ および LEE²⁵⁾ のタバコにおける実験と同様に、根の分化と茎の分化を区別して誘起できたほか、区によっては同一カルス塊から根と茎とを同時に分化させることができたので、それらの結果について述べる。

1. 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(有効塩素1%、Tween 20 数滴添加)中での約30分間の浸漬を2回繰り返して表面殺菌を行った。これを滅菌水で洗ったのち、100ml 容三角フラスコの寒天培地(シュクロース20g/ℓ、粉末寒天を6g/ℓ含んだものを1容器あたり30ml入れた)上に約30粒ずつ置床し、25°C 暗所で無菌的に発芽させた。置床約2週間後に第1次茎が約5cm程度に伸長したとき、その節間部から約1cmの組織片を切り出して培養した。1区当たりの組織片数は24個とした。

(2) 培地の調製と培養：組織片の培養に用いた培地の調製法は第1節と同様である。基本培地には MS 培地¹⁸⁾を用い、調整後100ml 容三角フラスコに30ml ずつ分注した。1容器当たりの置床組織片は3個とし、25°C 暗所および明所(4,000 lx, 16時間日長、白色蛍光灯)の条件下で培養した。

(3) 調査：カルスの大きさは、アズキ粒大を1、ダイズ粒大を2、ソラマメ大を3とし、同様の増大率で4、5、6、……なる指数を定めて表示した。根および茎については肉眼的に確認できたものの数と、そのうちの最も長いものの長さを測定した。

2. 結果

(1) NAA および BA の影響

BA を0, 0.1, 1.0 および10.0 mg/ℓ の4段階とし、そのおのおのに NAA を0, 0.001, 0.01, 0.1, 1.0 および10.0 mg/ℓ の6段階を組み合わせ合わせた合計24区を用いて培養期間中のカルスの形成、ならびに根および茎の分化と発育状況について調査した。

1) カルス形成

カルス形成は早い区では培養開始約1週間後から始まり、その後かなり長期間にわたって生長を続けたが12週間後には各区ともほぼ生長を停止した。Fig. 8はこの

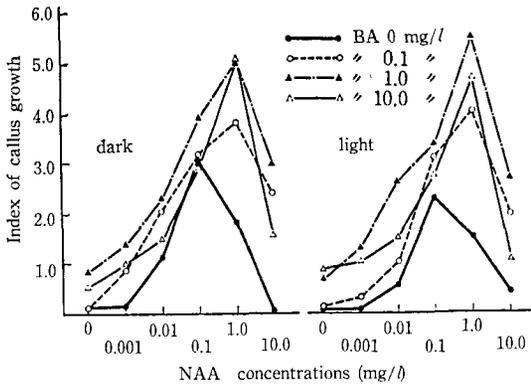


Fig. 8. Effect of BA and NAA concentrations on callus growth. The index was determined after 12 weeks of culture.

時期における生長量について示したもので、暗所と明所とは大きな差は認められず、いずれの場合にも次のような傾向がみられた。

すなわち、BA 無添加でも NAA を適量添加した場合にはカルスは形成され、NAA 0.1 mg/l で最も旺盛な生長を示した。しかし BA を 0.1~10.0 mg/l の範囲で添加すると、NAA 高濃度でのカルスの生長は BA 無添加の場合より良好となり、NAA 1.0 mg/l 添加の場合に最大であった。この場合のカルスの生長量は BA 無添加区より大きかった。なお、明所で形成されるカルスは葉緑素を形成し緑色を呈するが、その着色の程度が区によって異なり、概して BA 高濃度の区では緑色がうすい傾向が認められた。特に BA 10 mg/l、NAA 1.0 mg/l の区のカルスは葉緑素が少なく、白色に近かった。また、BA、NAA がともに低濃度でカルス形成がほとんど認められない区においても、組織片は 20 週間以上の長期にわたって緑色を保ったが、BA 無添加、NAA 10.0 mg/l の区では培養開始後 6 週間を経過したところから褐変する組織片が多かった。

2) 根の分化と発育

カルスからの根の分化は、カルス形成よりかなり遅れて培養開始 5~6 週間後から始まり、分化率は長期間にわたって徐々に増加した。培養開始 16 週間後におけるカルス塊からの根の分化率は Fig. 9 のとおりで、根の分化を誘起するのに適する BA および NAA の濃度範囲はカルス形成の場合のそれに比べてはるかに狭いことがわかった。すなわち、20% 以上の個体に発根がみられたのは、BA 無添加か 0.1 mg/l の低濃度の区で NAA が 0.1 または 1.0 mg/l の濃度の場合に限られている。また、

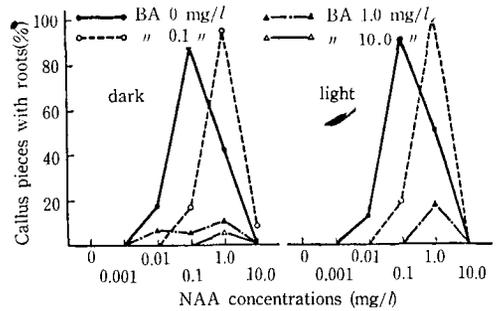


Fig. 9. Effect of BA and NAA concentrations on root formation from calluses (16 weeks).

BA 無添加の場合には明所、暗所のいずれにおいても NAA 0.1 mg/l で発根率は最大となり、BA 0.1 mg/l 添加区では、NAA がさらに高濃度の 1.0 mg/l で最大となった。根を分化した培養体についての 1 個体当たりの平均根数と平均根長（それぞれの個体中の最長根の長さの平均値）は Table 1 のとおりで、暗所、明所ともに、発根率の高い NAA 単用区 BA 0.1 mg/l+NAA 1.0 mg/l 区で根数・根長が概して大きかった。なお、カルスから分化する根にはつぎのような性状のものがみられた。

突起状短根 (Type A): カルス塊の表面 (寒天培地に接していない部分) に多数分化する半透明で突起状の細根で、正常に発育するものは少なく、長いものでも 0.5~1.0 cm で伸長を停止する。この種の根は、BA 無添加の区で多くみられ、BA 0.1 mg/l の区でもかなり形成された。

半透明状長根 (Type B): A の場合と同じくカルス塊の表面から分化する半透明の根であるが、発根数は概して少なく、Type A よりよく発育し、寒天培地中に伸長してやがて正常な根になる場合もあった。この種の根は、BA 無添加区に多く、BA 0.1 mg/l 区にも生じた。

貯蔵根様太根 (Type C): カルス塊の底部から寒天培地中に伸長する根で、貯蔵根のように太く、直径 2~3 mm 程度のものがある。この種の根は BA 0.1 mg/l の区で見られ、1~2 cm で伸長を停止する機会が多いが、よく発達することもあった。

正常根 (Type D): C と同様に培地中に伸長するが、正常な吸収根のように分岐し、よく伸長する根である。完全な植物体として独立させるにはこの種の根が最も適している。本実験では BA 0.1 mg/l 区でこの種の根が多く形成された。

以上は便宜上の分類で、実際には中間的性状を示すものもあり、また、同一カルス塊から 2 種類以上の根が分

Table 1. Effect of BA and NAA concentrations on the growth of root and shoot developed from calluses.

BA (mg/l)	NAA (mg/l)	In dark				Under light			
		Number of roots	Length of roots (cm)	Number of shoots	Length of shoots (cm)	Number of roots	Length of roots (cm)	Number of shoots	Length of shoots (cm)
0	0.01	1.3	0.9	0	—	3.0	2.0	0	—
0	0.1	7.4	2.4	0	—	8.1	2.4	1.0	5.0
0	1.0	10.0	1.0	1.0	5.0	9.1	1.9	5.0	0.5
0.1	0.1	1.5	0.6	6.0	6.8	3.3	1.3	2.0	0.5
0.1	1.0	8.0	1.6	4.0	7.4	8.6	2.3	3.0	1.3
0.1	10.0	1.0	0.5	0	—	0	—	1.0	0.8
1.0	0	0	—	9.0	3.0	0	—	5.8	4.0
1.0	0.001	0	—	1.0	1.5	0	—	16.0	6.0
1.0	0.01	1.0	1.0	2.3	1.8	0	—	2.0	1.5
1.0	0.1	5.0	1.5	5.0	4.6	0	—	2.0	1.2
1.0	1.0	3.0	1.5	3.4	6.5	3.0	0.6	5.5	5.4
10.0	0	0	—	0	—	0	—	1.5	0.8
10.0	0.001	0	—	0	—	0	—	2.5	0.2
10.0	0.01	0	—	0	—	0	—	1.0	0.5
10.0	0.1	0	—	0	—	0	—	1.8	1.6
10.0	1.0	0	—	2.0	2.0	0	—	3.4	0.8

化する場合も多い。

なお、本実験で観察された根はすべてカルスから分化したもので、置床した組織片から直接分化する根は認められなかった。

3) 茎の分化と発育

カルスがかなり生長した培養開始5~6週間後ころからカルス塊の表面の1ないし数箇所に茎の原基(白色または緑色の小突起)が認められ、ここからやがて茎が分化した。茎の分化率も根の場合と同様に長期間にわたって徐々に増加したが、培養開始16週間後における茎の分化率は Fig. 10 のとおりである。BA 無添加の区では茎はほとんど分化しないが、BA を添加した場合の NAA 濃度が 0.1 および 1.0 mg/l の区では茎の分化が良好であった。

分化率のピークは BA 濃度に関係なく NAA 1.0 mg/l でみられた。また NAA 無添加では、根の分化がまったくみられなかったが、茎の分化は 20% 以下の低率ではあったが認められた。茎を分化したカルス塊について1個体当たりの平均茎数と茎長は Table 1 のとおりで、いずれも一定の傾向は認められなかった。なお BA 10 mg/l では明所のみで BA 0.1 および 1.0 mg/l と同程度の茎の分化がみられた。

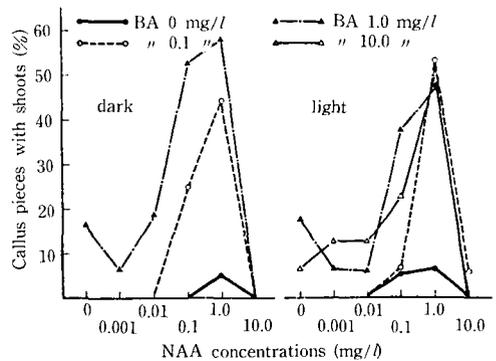


Fig. 10. Effect of BA and NAA concentrations on shoot formation from callus (16 weeks).

分化した茎は正常な茎として発育するもののほか、半透明なもの、異常に細かいものまたは太いもの、葉の分化が正常でないものなどの異常な茎が認められた。これらの異常な茎は伸長が途中で停止するが多い。また鱗片状の突起が分化したのみで茎にまで発育しないものもあった。異常に太く半透明で正常に発育しない型の茎は BA 高濃度 (10 mg/l) 区にみられ、その他の異常な茎

はごくわずかであるが各区に分散してみられた。

4) 幼植物の再生

Fig. 9 および Fig. 10 に示したように、根および茎の分化率がともに高かったのは BA 0.1 mg/l, NAA 1.0 mg/l の区で、この区には一つのカルス塊に両器官を分化したものがかなりみられた。これらのカルス塊は生長調節物質を含まない培地 (MS 培地, シェクロース 20 g/l および寒天 6 g/l を含む) に移植して 25°C 明所で発育を促進したのち糖を含まない培養液で水耕を行なうか、または培養土を入れその上にパーミキュライトを入れた鉢に移植して完全な植物体を得ることができた。

(2) 2,4-D および BA の影響

本実験では BA と 2,4-D とを種々の濃度で同時に添加した場合の影響について検討した。濃度の組み合わせは実験 1 と同じ 24 区とした。

1) カルス形成

Fig. 11 はカルスの生長がほとんど停止した時期 (13 週間後) における生長量を示したもので、BA 無添加の場合の生長量のピークは 2,4-D 0.1 mg/l でみられ、BA 0.1~10.0 mg/l を添加した区では 2,4-D 1.0 mg/l でピークがみられた。これは NAA の場合と全く同じ傾向であった。ただし、全般的に NAA の場合に比べてカルスの生長は劣り、各 BA 濃度におけるカルスの最大生長量の差も小さい。2,4-D を用いた培地で生長したカルス塊は NAA の場合に比べて外観上表面の凹凸が少なく平滑で、緻密であった。また明所で生長したカルスは NAA の場合より濃緑色になる傾向が認められた。

なお、NAA の場合と同じく、カルスの生長については明所と暗所との差はほとんど認められなかった。

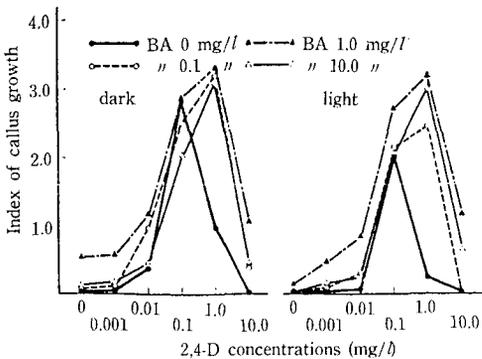


Fig. 11. Effect of BA and 2,4-D concentrations on callus growth. The index was determined after 13 weeks of culture.

2) 器官分化

根および茎の分化は培養開始 10 週間後から始まったが、オーキシンとして NAA を用いた (1) の場合に比べて概して分化率は低かった。17 週間後における根の分化率は Fig. 12 のとおりで、根の分化は BA 無添加および 0.1 mg/l で誘起され、無添加区での分化率のピークは 2,4-D 0.1 mg/l でみられ、BA 0.1 mg/l 区では、2,4-D 1.0 mg/l でピークとなった。なお、BA 無添加で分化した根は前項でのべたと同じように半透明の根が多かった。

茎の分化は Fig. 13 に示すように BA 0.1 および 1.0 mg/l でみられたが、分化率は NAA の場合に比べてかなり低かった。したがって、NAA の場合ほど明瞭ではないが、ピークは 2,4-D 1.0 mg/l にあるものと思われる。

なお、器官を分化したカルス塊についての 1 個体当たり平均分化数と長さは Table 2 のとおりで、NAA の場合と比較してとくに変わった点は認められなかった。

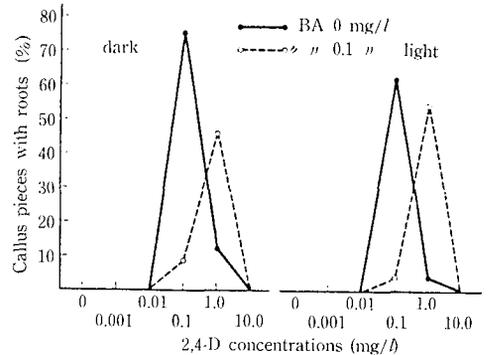


Fig. 12. Effect of BA and 2,4-D concentrations on root formation from calluses (17 weeks).

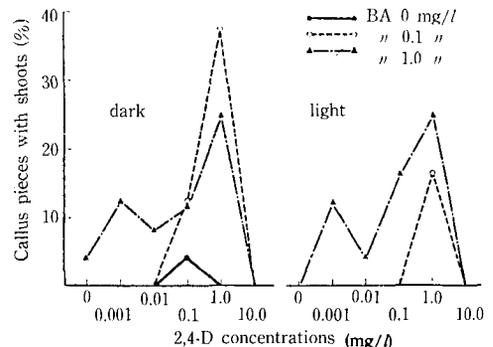


Fig. 13. Effect of BA and 2,4-D concentrations on shoot formation from calluses (17 weeks).

Table 2. Effect of BA and 2,4-D concentrations on the growth of root and shoot developed from calluses.

BA (mg/l)	2,4-D (mg/l)	In dark				Under light			
		Number of roots	Length of roots (cm)	Number of shoots	Length of shoots (cm)	Number of roots	Length of roots (cm)	Number of shoots	Length of shoots (cm)
0	0.1	5.5	0.9	0	—	7.7	1.0	0	—
0	1.0	3.0	0.2	0	—	3.0	0.5	0	—
0.1	0.1	4.5	0.4	1.5	2.0	4.2	0.5	0	—
0.1	1.0	2.2	0.8	2.5	1.8	3.9	0.4	1.5	1.0
1.0	0	0	—	1.0	1.0	0	—	0	—
1.0	0.001	0	—	3.0	0.5	0	—	0	—
1.0	0.01	0	—	0	—	0	—	0	—
1.0	0.1	0	—	0	—	0	—	1.0	0.8
1.0	1.0	0	—	1.0	0.7	0	—	1.0	1.3

3. 考 察

1958年 STEWARD ら^{26,27)} はニンジン²⁶⁾の形成層起源カルスからの幼植物の誘導に成功したが、この場合は培地に coconut milk を加えている。その後 SKOOG ら²⁴⁾ および LEE ら²⁵⁾ は天然物を使用せずに完全な合成培地を用いてタバコの柔組織からカルスを誘導し、さらにカルスからの器官形成に成功した。この研究で特に興味あることは、生長調節物質(カイネチンと IAA)の量を変えることによって葉および根をかなり明確に区別して誘導できた点である。最近の報告によると、種々の植物でカルスから器官を再分化させることに成功しているがココナットミルクなどの天然物を使用しない場合はサイトカイニンとオーキシンが用いられており、その量比が器官の発生分化に関係している場合が多いようである^{18,28,29,30,31,32,33,34)}。

本節では、サイトカイニン(BA)とオーキシン(NAA または 2,4-D)を種々の割合で添加した MS 培地を用いて培養することにより実生第1次茎の切片からカルスを誘導し、やがてカルスから器官を分化させることができた。また、BA およびオーキシンの添加量を変えることにより、SKOOG らのタバコにおける実験²⁴⁾と同様に根の分化に適する条件と茎のそれとが異なることを確認できたほか、区によっては同一カルス塊から根と茎を同時に分化させることもできた。

まず、個々の生長調節物質について器官の分化を誘起するのに好適な濃度範囲を見ると、BA は 0.1 mg/l 以下で根、0.1 mg/l 以上で茎の分化を誘起するのに有効であった。そしてこの好適濃度範囲は BA とともに添加したオーキシンの種類や、培養時の明暗条件には左右されな

かった。

オーキシンの濃度については、NAA, 2,4-D ではともに 0.1~1.0 mg/l で根および茎の分化を誘起するのに有効であった。すなわち、オーキシンでは根の分化に好適な濃度と、茎の分化に好適な濃度とが同じ範囲内にあり、この濃度はカルスの生長にも好適であった。以上は BA およびオーキシンを個々に見た場合の好適濃度範囲であるが、根の分化についてはカルス形成の場合¹⁸⁾と同様につきのような相互作用が認められた。すなわち、(1)の実験において、根の分化に対する NAA の至適濃度は BA 無添加の場合に 0.1 mg/l であったが、BA 0.1 mg/l では、これより高濃度の 1.0 mg/l であった。このように BA の濃度によって発根に対する NAA の適濃度が異なることは、根の分化についてはサイトカイニンとオーキシンが何らかの相互作用をもつものと考えられ興味深い。これに対して茎の分化の場合は BA の濃度が 0.1~10.0 mg/l の範囲内で変わっても NAA の至適濃度は常に 1.0 mg/l であった。2,4-D を用いた実験 2 においてもこれと同様のことが認められた。

アスパラガスでは通常種子による繁殖が行なわれているが、若茎の形質、収量についての個体間差が著しい。この欠点を除くため、遺伝的に同じ性質をもった株を増殖することを目的とした栄養繁殖の研究がいくつか報告されている。

TAKATORI ら^{1,2)}はこの目的で若茎を 3~5 mm の厚さに輪切りにした切片を用い、NAA 0.5 ppm およびココナットミルク 15% を含む MS 培地でカルスを誘導し、これを前記培地にさらに 50 ppm の硫酸アデニンを添加した培地へ移植して幼植物を分化させることに成功して

いる。また WILMAR ら³³⁾は無菌的に発芽させた実生の第1次茎の切片を LINSMAIER and SKOOG の培地を用いて照明下において培養し、誘導したカルスから幼植物を得ることに成功している。この場合、カイネチン 0.315 mg/l と 2,4-D 1 mg/l でカルスの生長が最も速やかで、まれに器官分化が起こった。また生長調節物質を添加しなかった場合に茎の分化が著しかったと述べている。しかし、両報告とも器官の分化率についての記載はみられない。

本実験では、オーキシシンとして NAA を用いた場合すなわち NAA 1.0 mg/l と BA 0.1 mg/l を組み合わせた区に根と茎の両方を分化したカルス塊が最も多かった。この区における根の分化率は 80~100% であったが、茎の分化率が概して低く 50% 前後であった。したがって、幼植物の分化率をさらに高めるには茎の分化率を高めることが重要な条件となる。このためには基本培地の組成、生長調節物質の種類および濃度など検討すべきことが多いが、移植も幼植物の分化率を高める有効な手段の一つと考えられる。従来カルスからの幼植物の再分化に成功している例の多くはカルス誘導後器官分化用培地に移植を行なっている。移植の効果についての実験結果は後述する。

II 糖の種類および濃度の影響

本実験では、シュクロース、グルコース、フラクトースの3種の糖を培地に添加した場合の至適濃度について検討した。

1. 材料および方法

第1章第2節Iで述べたのと同様の方法で作製したアスパラガス実生第1次茎節間部切片 (1 cm) を培養した。培地は、MURASHIGE & SKOOG の培地、NAA 1 mg/l、BA 0.1 mg/l、糖および寒天 7 g/l を含み pH を 5.5 に調整したものである。添加した糖については、シュクロース、グルコースおよびフラクトースのそれぞれ 1, 2, 4, 8 および 16% とした。また、1 容器 (100 ml 容三角フラスコ) 当たり培地 25 ml を入れ、組織片 3 個を置床した。培養は 25°C、明所 (4,000 lx、16 時間日長、白色蛍光灯) の条件下で行なった。

2. 結果および考察

(1) カルス形成: カルス形成は培養1週間で始まった。Fig. 14 に示したようにシュクロース、グルコース、フラクトースのいずれにおいても 1~4% の場合には、カルス形成組織片率は 95~100% であった。一方、濃度 8% の場合には、シュクロースでは約 90% の高い

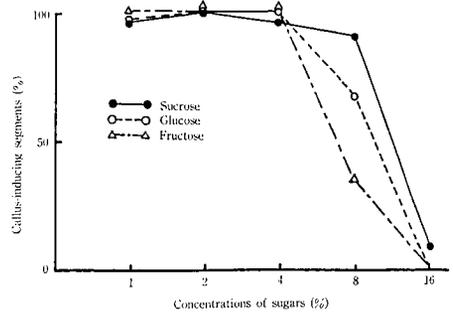


Fig. 14. Effect of sugars on callus induction in the *in vitro* culture of internode segments excised from the shoots of asparagus seedlings (after 16 weeks of culture).

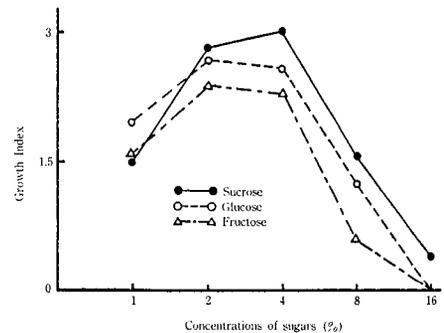


Fig. 15. Effect of sugars on callus growth in the *in vitro* culture of internode segments excised from the shoots of asparagus seedlings (after 16 weeks of culture).

Indices: 1, size as large as the volume of a sphere 3 mm in diameter; 2, 5 mm; 3, 7 mm; 4, 9 mm, respectively.

カルス形成率であったが、グルコースでは約 68%、フラクトースでは約 33% と低くなった。また、濃度 16% の場合には、カルス形成はシュクロースでわずかに認められたが、グルコースおよびフラクトースでは全く認められなかった。

カルスの生長は Fig. 15 に示したとおりで、いずれの糖においても 2~4% の場合にはカルスの生長が旺盛であった。

しかし、16% ではシュクロースの場合にわずかに生長がみられたにすぎなかった。

(2) 茎の分化: 茎の分化はすべてカルスからの再分化で、培養 8 週間で認められた。培養 16 週間における茎再分化組織片率は Fig. 16 に示したとおりで、いずれの糖においても 2% の場合に最も高かったが、3 種の糖

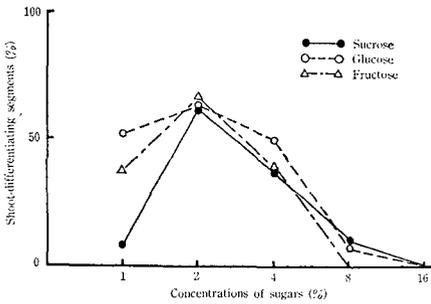


Fig. 16. Effect of sugars on shoot formation in the *in vitro* culture of internode segments excised from the shoots of asparagus seedlings (after 16 weeks of culture).

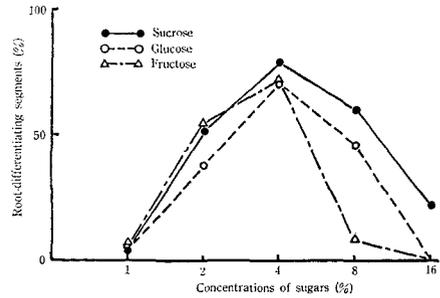


Fig. 18. Effect of sugars on root formation in the *in vitro* culture of internode segments excised from the shoots of asparagus seedlings (after 16 weeks of culture).

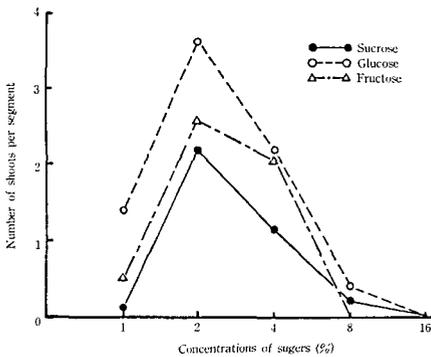


Fig. 17. Effect of sugars on the number of shoot differentiated from callus in the *in vitro* culture of internode segments excised from the shoots of asparagus seedlings (after 16 weeks of culture).

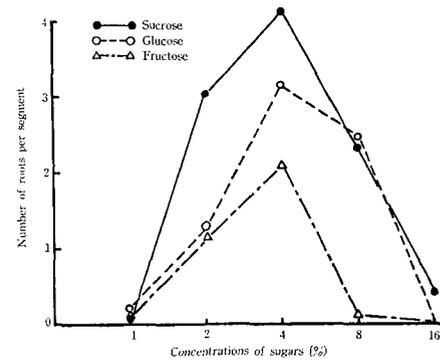


Fig. 19. Effect of sugars on number of roots in the *in vitro* culture of internode segments excised from the shoot of asparagus seedlings (after 16 weeks of culture).

の間に差はほとんど認められなかった。糖濃度が4, 8, 16%と高くなるに従ってその率は漸減したが、この場合3種の糖のいずれにおいてもほぼ同様の傾向を示した。しかし、低濃度の1%においては、グルコースで高くフラクトースでこれよりやや低かったが、シュクロースでは極めて低かったことが特徴である。

再分化した茎の組織片当たりの数は Fig. 17 のとおりで再分化組織片率と同様2%のとき最大であった。しかし、この場合は3種の糖の間に差があり、グルコースで最も多く平均3.6本で、次いでフラクトース、シュクロースと順次少なくなった。

(3) 根の分化：根の再分化は、茎の再分化よりやや早く、培養6週間でみられた。Fig. 18 に示したように、根を分化した組織片の割合は、本実験で用いた3種の糖のいずれにおいても、4%のときに最も高く、この場合

3種の糖の間にはほとんど差は認められなかった。再分化した根の数についてみると、Fig. 19 に示したとおり、いずれの糖の至適濃度も4%であったが、用いた3種の糖の中ではシュクロースで最も多く、次いでグルコース、フラクトースの順であった。このように根の再分化に対する至適濃度は茎の再分化の場合のそれよりも高いところにあった。

次に分化した根の特徴についてみると、糖が低濃度の場合の根は、第1章第2節Iにおいて述べた根の類別に従えば、短く半透明な根であったが、糖濃度が高い場合の根は白色で長く、貯蔵根様の生育旺盛な根であった。

通常の栽培におけるアスパラガスの根に貯蔵されている糖分は、春の萌芽開始期から収穫が終わり茎葉が生長を完了する8月中・下旬くらいまでの間は漸減し、それ以後地上部で作られたものが地下部に送られ徐々に根の糖分は増加する³⁵⁾。また、アスパラガスの根には各

種が多糖類が存在することが報告されている^{36,37}). いずれにしても, アスパラガスの根は糖を多く含んでおり, 糖含有率の高い時期には全糖で乾重当り70%程度含んでいる³⁸)という事実と関連があるものと考えられる。本実験の結果から, シュクロース, グルコース, フラクトースのいずれも, 培地に添加した場合には利用されることがわかったが, 糖についてはさらに広範な検討が必要であるものと思われる。

III pHの影響

カルス形成ならびに器官分化に及ぼす培地 pH の影響について調べるため, 実生の茎節間部切片を用いて実験を行った。

1. 材料および方法

第1章第2節1と同様の方法で作製した実生茎の節間部切片を用いた。培地はMS培地を基本とし, シュクロース 20 g/l, BA 0.1 mg/l, NAA 1.0 mg/l, および寒天 6 g/l を添加し, 滅菌前に NaOH または HCl を用いて, pH を 2.0, 3.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 8.0, および 9.0 に調整したものである。また, 100 ml 容三角フラスコに培地 25 ml を入れ, 組織片 3 個を置床した。1 区当たりの組織片数は 30 とした。培養は 25°C, 4,000 lx (16 時間日長, 白色蛍光灯) の条件下で行った。

なお, 上記の培地の組成から寒天のみを除いた液体培地を同時に用いて同様の条件下で静置培養を行った。

2. 結果および考察

Fig. 20 に示したように pH 2.0 および 9.0 ではカルスはほとんど形成されなかったが, 3.0~8.0 ではカルス形

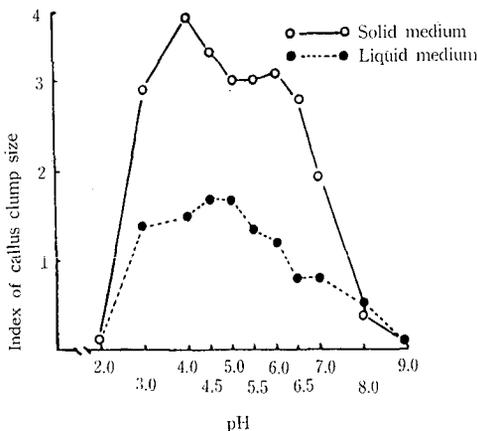


Fig. 20. Effect of pH on callus formation in the *in vitro* culture of internodal segments from seedling shoots (after 12 weeks of culture).

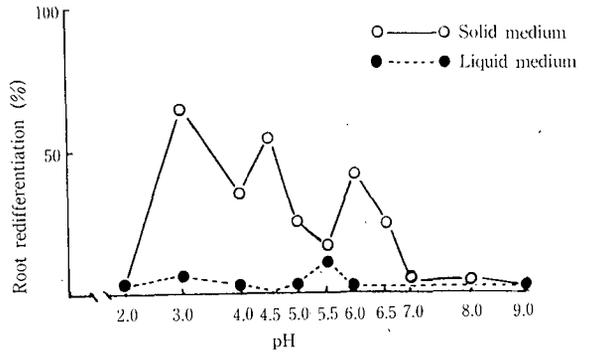


Fig. 21. Effect of pH on root differentiation from calluses derived from internodal segments from seedling shoots (after 12 weeks of culture).

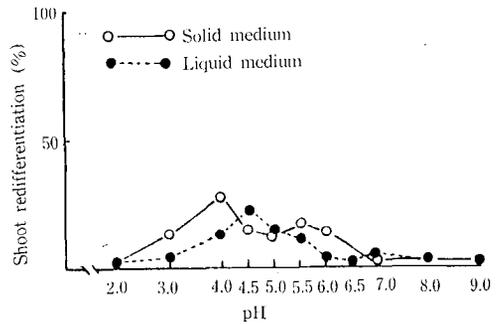


Fig. 22. Effect of pH on shoot differentiation of calluses derived from internodal segments of seedling shoots (after 12 weeks of culture).

成が認められ, かなり広範囲の pH 値において良好な生長がみられた。固形培地上におけるカルスの生長は液体培地のそれよりもはるかに旺盛であった。

カルスからの根の分化は, Fig. 21 に示したように, 固形培地の場合 pH 3.0~6.5 で認められ, 分化率は最高約 65% であったが, 液体培地の場合は根の分化率が極めて低かった。

一方, カルスからの茎の分化については, Fig. 22 に示したとおりで, pH 3.0~6.0 で認められたが, 分化率は根の分化の場合より低かった。また茎の分化については, 固形培地と液体培地との間に大きな差は認められなかった。

このように, アスパラガスの実生の茎組織を培養した場合においては, カルス形成ならびに器官分化に対する pH の許容範囲はかなり広いことが認められた。

IV 移植の影響

第1章第2節IIにおいて、アスパラガス芽生えの茎からとった節間部切片を培養した場合のカルス形成ならびに器官分化について述べた。本実験では、実生茎切片の培養において比較的初期の段階で移植を行った場合、器官分化にどのような影響を及ぼすかということについて検討した。

1. 材料および方法

組織片の作製：第1章第2節Iで述べたのと同様の実生の茎節間部切片を用いた。

前培養：培地は、MS培地を基本とし、シュクロース20 g/l、生長調節物質および寒天7 g/lを含み、pHを5.5に調整したものである。生長調節物質は、NAAおよびBAを単独でまたは組み合わせて添加し、この前培養培地中の生長調節物質の種類・濃度の違いにより、Table 3に示すようなA~Hの8区を設けた。

Table 3. Concentrations of BA and NAA in each medium in preculture before transfer.

Growth regulator	Mark of media							
	A	B	C	D	E	F	G	H
BA (mg/l)	0	0	0	0.1	1.0	1.0	1.0	10.0
NAA (mg/l)	0	0.1	1.0	1.0	0	1.0	10.0	1.0

組織片は、1区当たり120個(100 ml容三角フラスコ1容器当たり3個を置床)とした。また、初代培養は25°C、暗所の条件下で行った。

移植：移植はそれぞれの区について前培養3日、7日、14日後に行った。移植後の培養に用いた培地(以下移植培地と称する)は、1種類とし、生長調節物質無添加であるほかは前培養のそれと全く同様である。移植後の培養は25°C、1日16時間照明(白色蛍光灯, 4,000 lx)の条件下で行った。

調査：移植後の培養を11週間行ったのち調査した。とくにカルスの大きさについては次のような指数によって調査した。すなわち、指数0：カルス形成が認められない、0.5：米粒大、1.0：アズキ粒大、2.0：ダイズ粒大、3.0：ダイズ粒の2倍の大きさ、4.0：ダイズ粒の3倍の大きさとし、これに基づいて調査を行った。

2. 結果

(1) カルス形成

カルス誘導はまず置床組織片の切断面においてみられ

た。無移植区におけるカルス形成はつぎのとおりである。NAA無添加の区(A, E)においては、カルス形成は全く認められなかった。その他のNAA 0.1~10.0 mg/lを添加した区では、1~2週間後にカルス形成がみられ、4週間後には90~100%のカルス形成組織片率となった。カルスの生長は、NAAを1.0 mg/l以上の濃度で添加し同時にBAを組み合わせて添加した区において良好であった。最もカルスの生長が良好であったのは、BA 1.0 mg/lとNAA 1.0 mg/lとを組み合わせて添加した場合であった(Fig. 23)。

つぎに移植を行った場合についてみるとつぎのとおりである。カルスの生長は、移植を行った区においては、無移植区よりも概して劣っていた。例えば、最も良好であった前培養を14日間行った区においても、カルス塊の大きさは無移植の区のそれの $\frac{1}{2}$ ~ $\frac{1}{3}$ であった。移植した場合、最もカルス形成が劣っていたのは前培養3日間の区であった。また、前培養7日間の区のカルスの大きさは、前培養14日間の区と前培養3日間の区との間にあった。

(2) 根の分化

本実験において形成された根は、すべてカルスから再分化したものであった。根の再分化は、カルスを形成した区においてはすべて認められ、特に、B, FおよびG培地では高い根分化率を示した(Fig. 24)。NAA 0.1 mg/l単用の区(B)についてみると、無移植の区が最も高い分化率を示し、移植区のそれは、無移植区よりも低く、前培養期間の短い区ほど分化率が低い傾向が認められた。特に、3日間前培養を行ったのみの区では全く根の分化がみられなかった(Fig. 24-B)。

一方、高濃度のBAおよびNAAを添加した区(F, G, H)では、根の再分化は移植することによって促進された。すなわち、F区(BA 1.0 mg/l NAA 1.0 mg/l添加)では、前培養を14日間行ったのち移植した場合に根分化率が最も高く無移植の場合に最も低かった(Fig. 24-F)。G区(BA 1.0 mg/lおよびNAA 10.0 mg/l)ならびにH区(BA 10.0 mg/lおよびNAA 1.0 mg/l)においては、根分化率は、前培養3日間の場合に最も高く、無移植の区で最も低かった(Fig. 24-G, H)。また、C区(NAA 1.0 mg/l単用)およびD区(BA 0.1 mg/l, NAA 1.0 mg/l)では、無移植区および移植区のすべてにおいて根の分化が認められ、移植の効果は特に認められなかった。

本実験全体を通じてみた場合、根再分化組織片率は、G区における前培養3日間の場合に最も高く(96.7%)、

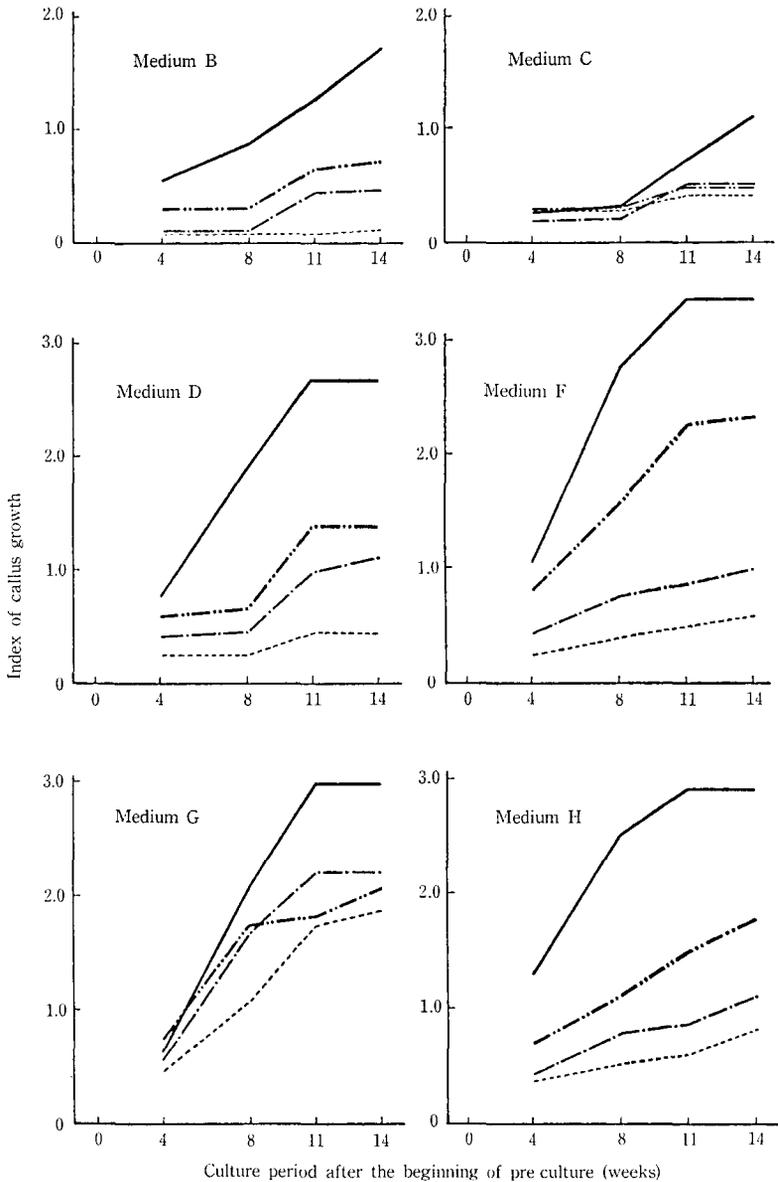


Fig. 23. Effect of growth regulators and transferring on callus growth.
 — long-term culture without transferring, — · — 7-day preculture
 - - - 14-day preculture, ····· 3-day preculture

次いで、F区の前培養14日間の場合(90.0%)およびB区は無移植の場合(86.7%)であった。

(3) 茎の分化

本実験において分化した茎はすべてカルスから再分化したものであった。茎の再分化は、Fig. 25 に示したとおりで、BA および NAA を高濃度で添加した区 (F,

G, H) で観察された。この場合、生長調節物質を含まない培地に移植することにより、茎の分化が著しく促進された。すなわち、F および H 区の前培養14日間の場合に80~90%の高分化率を示したが、無移植の場合には10~20%と低かった。G区においては、前培養期間の長さによらず茎の分化が認められたが、その率は2~

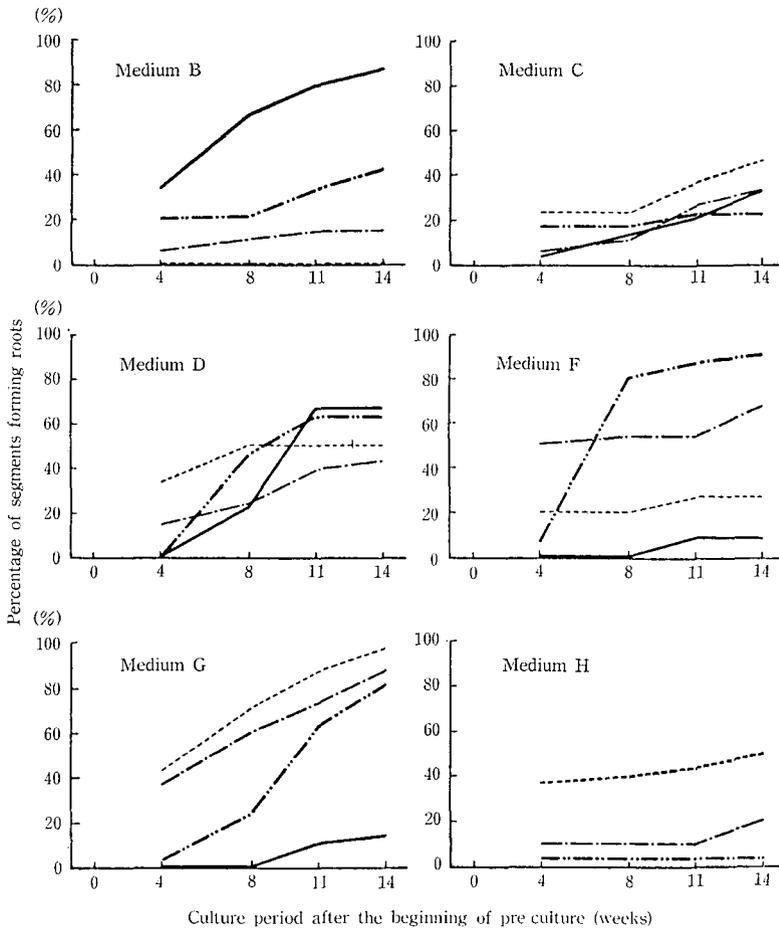


Fig. 24. Effect of growth regulators and transferring on root formation.
 — long-term culture without transferring, - · - · - 7-day preculture
 - · · - 14-day preculture, · · · · · 3-day preculture

30%と低かった。

根および茎を同時に分化したものの割合はF区 (BA 1.0 mg/l, NAA 1.0 mg/l) の前培養14日間の場合に最も高かった。

3. 考 察

カルス形成に対しては、オーキシンおよびサイトカイニンを同時に添加したほうが効果的である場合^{2,11,12,39,40,41}があるが。

本実験では、カルス形成は、BAの有無によらずNAA 0.1~10.0 mg/lを含むすべての区において認められた。NAA無添加の場合には全く認められなかった。無移植の場合には、BAおよびNAAをともに含む区でカルスの生長は良好で、特にBA 1.0 mg/lおよびNAA 1.0 mg/lを含む区で最も良好であった。この傾向はアスパ

ラガスの約培養の場合と同様であった⁴²。

本実験では、それぞれの区ごとにみた場合、カルスの生長は、無移植区において良好であり、概して移植区はこれより劣り、移植区の中では、特に前培養期間の短い区において劣っていた。このことから、カルス生長については、ある期間を通じて生長調節物質を与えることが必要であり、本実験におけるように生長調節物質無添加の培地に移植した場合には、良好な結果が得られないことがわかった。

カルスからの根の再分化は、NAA 0.1~10.0 mg/lを含むすべての培地で認められたが、根分化組織片率は培地に添加したBAまたはNAAの濃度に応じて変動した。すなわち無移植区では、その率は、B区 (NAA 0.1 mg/l単用)において最も高く、次いでD区 (BA 0.1

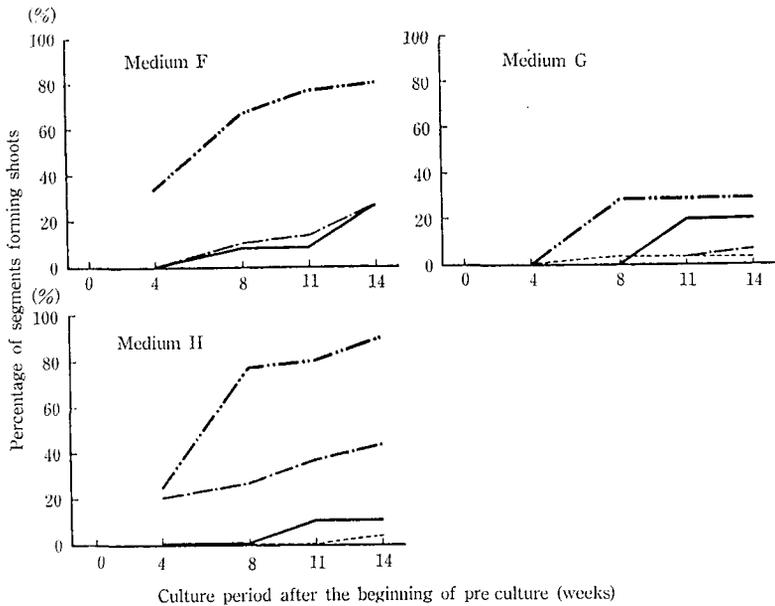


Fig. 25. Effect of growth regulators and transferring on shoot formation.

— long-term culture without transferring, — · — · — 7-day preculture
 - - - - 14-day preculture, ····· 3-day preculture

mg/l, NAA 1.0 mg/l) で高い率を示したが、他の区ではいずれも低かった。本実験では、根の分化に及ぼす移植の影響は、前培養培地中の BA または NAA の濃度によって、その現われ方が異なっていた。すなわち、B区では、根分化率は移植することによって低下したが、F区 (BA 1.0 mg/l, NAA 1.0 mg/l), G区 (BA 1.0 mg/l, NAA 10.0 mg/l) および H区 (BA 10.0 mg/l, NAA 1.0 mg/l) においては、生長調節物質無添加の培地に移植することによって、根の分化が促進された。この場合、根の分化に適切な前培養の期間は、前培養培地に添加した生長調節物質の濃度によって異なっていた。例えば、F区では前培養 14 日間後移植の場合に最も分化率が高かったのに対し、H区では前培養 3 日間後移植の場合に最も高かった。これらの結果から、培養体は、短期間の前培養中に、根の分化に必要な生長調節物質を取り込むものと考えられる。

茎の分化は、BA と NAA とを同時に添加した区においてのみ認められた。この場合、無移植の区では分化率 (20% 以下) は低かったが、移植を行った場合には高くなり、特に F および H 区の前培養 14 日間後移植の場合に高い分化率を示した。これらの結果から、生長調節物質無添加の培地に移植することを前提とした場合、茎の分化に至適な前培養の条件は、BA 1.0~10.0 mg/l および

NAA 1.0 mg/l の組合せ添加ならびに 14 日間の前培養を行うことであると考えられる。器官を分化させるために、生長調節物質の濃度が前培養培地のそれと異なる培地に移植することがあるが^{5,8,14,19,43,44,45})。これについては今後検討を加える必要があると考えられる。

第2章 若茎組織の生体外培養

第1節 若茎頭部小側枝の培養

アスパラガスの若茎の頭部においては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について検討した。

1. 若茎頭部小側枝の培養におけるオーキシシン (NAA, IBA, 2,4-D) およびサイトカニン (BA) の影響

1. 材料および方法

(1) 培養組織片: 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 20 cm 程度に伸ば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。その後、先端部約 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

Table 4. 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).

Growth regulator	Predeveloping lateral shoot		1st lateral branch			2nd lateral branch	Root formation		callus formation		
	Length	Thick-ness*	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**	
	(cm)		(%)		(%)	(%)	(%)	(%)	(%)		
None	(A)	1.8	1.0	63	8.1	61	60	0	0	16	0.1
NAA 10 ⁻⁵ M	(B)	1.5	1.0	44	2.5	25	0	41	10	69	2.3
IBA 10 ⁻⁵ M	(C)	2.7	1.2	64	4.9	44	33	29	7	43	0.7
2,4-D 10 ⁻⁵ M	(D)	2.4	1.3	63	2.9	0	5	13	3	22	2.5
NAA 10 ⁻⁵ M+BA 10 ⁻⁶ M	(E)	2.9	2.6	71	7.3	39	30	4	0	93	2.9
IBA 10 ⁻⁵ M+BA 10 ⁻⁶ M	(F)	2.9	2.2	75	5.3	26	33	0	0	79	2.6
2,4-D 10 ⁻⁵ M+BA 10 ⁻⁶ M	(G)	1.5	2.9	47	5.3	41	21	0	0	78	1.9
BA 10 ⁻⁶ 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 5. 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).

Growth regulator	Predeveloping lateral shoot		1st lateral branch			2nd lateral branch	Root formation		callus formation		
	Length	Thick-ness*	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**	
	(cm)		(%)		(%)	(%)	(%)	(%)	(%)		
None	(a)	1.3	1.0	28	1.6	0	0	0	0	6	0.1
NAA 10 ⁻⁵ M	(b)	2.8	1.1	50	2.4	0	8	50	21	80	2.6
IBA 10 ⁻⁵ M	(c)	3.8	1.4	76	2.6	0	6	71	14	91	2.0
2,4-D 10 ⁻⁵ M	(d)	1.0	2.0	54	2.2	0	0	13	4	51	1.9
NAA 10 ⁻⁵ M+BA 10 ⁻⁶ M	(e)	2.9	2.4	60	2.9	0	13	0	0	96	3.0
IBA 10 ⁻⁵ M+BA 10 ⁻⁶ M	(f)	4.3	2.4	73	3.3	0	13	0	0	91	2.7
2,4-D 10 ⁻⁵ M+BA 10 ⁻⁶ M	(g)	2.4	2.4	38	2.1	0	0	0	0	77	2.3
BA 10 ⁻⁶ 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, 5-10mm; 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.

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のち、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: 基本培地はMS培地とし、シュクロース0.1 Mと所定の生長調節物質を添加したのち、pHを5.5に調整した。つぎに粉末寒天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/cm²で15分間行った。生長調節物質はオーキシシンとしてNAA 10⁻⁵ M、IBA (indole-3-butyric acid) 10⁻⁵ M、2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) 10⁻⁵ Mを用い、また、サイトカイニンとしてはBA 10⁻⁶ Mを用いて、それらの組み合わせによりTable 4に示す8区を設けた。

(3) 培養条件: 上記の小側枝を1容器あたり2個ずつ置床し、25°Cで培養した。光条件は4,000 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週間後から2週間ごとに小側枝、1次分枝および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週間後に調査を打ち切った。枝の名称についてはFig. 26に示した。

2. 結 果

(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次分枝の発生は植込み1~2週間後より始まり、BA無添加の区は4週間後でほとんど止ったが、BA添加区では6~8週間まで発生が続いた。1次分枝の発生数は、明所培養区では14週間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週間後から

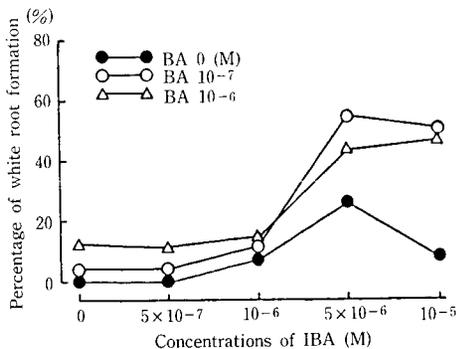


Fig. 26. Effect of growth regulators on the formation of white roots in culturing the predeveloping lateral shoots in the head of asparagus spears (after 12 weeks of culture in Expt. 2).

みられ、一般に発育率は14週間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週間後の調査結果はTable 4, 5のとおりで、明所区ではA, C, D, E, F, H区で1次分枝、2次分枝の発生が旺盛で、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, b, 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、叢状を呈するものが多かったが、暗所区では白色で叢状の茎の発生は認められなかった。

(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。また個体によっては小側枝全体がカルスに被われることもあった。この現象はオーキシシンとBAの両方を添加した区、特にG区に多く観察された。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 4, 5)。

(3) 根の分化: 主としてオーキシシン単独添加区で根の分化が認められた(Table 4, 5)。オーキシシンの種類別にみると、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、オーキシシン単独添加区では、明所区のいずれにおいても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。しかし、一般に根の発育は旺盛ではなかった。

II 若茎頭部小側枝の培養におけるBAおよびIBA組合せ添加の影響

1. 材料および方法

BAを0, 10⁻⁷, 10⁻⁶ Mの3段階とし、これにIBAの0, 5 × 10⁻⁷, 10⁻⁶, 5 × 10⁻⁶, 10⁻⁵ Mの5段階を組み合わせた15区を設けたほかは第2章第1節Iの場合と同様の方法とした。なお、培養は明所(5,000 lx, 16時間日長)であった。

2. 結 果

本実験ではすべての区において1次分枝、2次分枝が発生したが、BA単独添加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イ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た。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 無添加の場合の IBA が 0 または 5×10^{-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 5×10^{-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. 26)。すなわち、本実験の範囲内では BA 10^{-7} M である場合の IBA 5×10^{-6} または 10^{-5} M において根の分化率が高く、オーキシン単独のほうが発根が良好であった前述の I の結果とは必ずしも傾向は一致しなかった。

第 2 節 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の比較を行った。なお、摘出する茎頂部組織の大きさについても検討した。

1 茎頂部組織 (0.5 mm) の培養におけるオーキシン (NAA, IBA) およびサイトカイニン (BA) の影響

1. 材料および方法

(1) 培養組織片：若茎の頭部約 5 cm を第 2 章第 1 節 I の場合と同様の方法で十分に洗浄したのち、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、次亜塩素酸ナトリウム液に 10 分間浸漬して表面殺菌を行った。直ちに無菌室内で滅菌水を用いて二度洗ったのち、安全カミソリと針を用い解剖顕微鏡下で小側枝の茎頂部組織を 0.5 mm 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 & SKOOG の処方 (1962)¹⁸⁾ に従って添加した。また、ビタミン、アミノ酸、その他の添加物については MURASHIGE & SKOOG の処方¹⁸⁾ による Table 6 に示す物質を加えた (NAA およびカイネチンを除く)。添加した生長調節物質については BA を 0, 5×10^{-8} , 10^{-7} , 5×10^{-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. 27)。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。光条件を明所 (1,000 lx, 16 時間日長) とした。

Table 6. Nutrient medium composition

Ingredients	(mg/ℓ)
Inorganic constituents	MURASHIGE & 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 ₂ PO ₄ ·H ₂ O	170.0
Difco Bacto agar	6,000.0

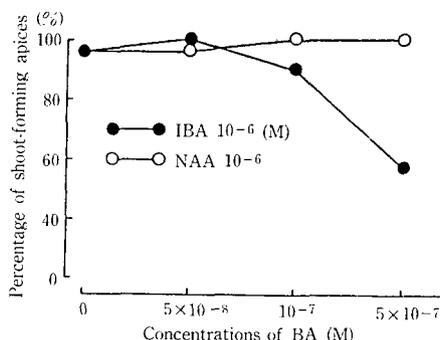


Fig. 27. Effect of growth regulators on shoot formation in culturing the 0.5 mm-length apices excised from the predeveloping lateral shoots in the head of asparagus spears (after 12 weeks of culture).

2. 結 果

茎の発育は概して良好で、IBA 10^{-6} M + BA 5×10^{-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. 27)。カルス形成率は NAA 添加区では BA が 5×10^{-7} M の区以外は 30% 以下の形成率であった (Fig. 28)。また、根の分化もみられ、分化率は NAA, IBA 両区とも BA 無添加が低濃度で高く、BA が高濃度になると低下する傾向が認められた (Fig. 29)。

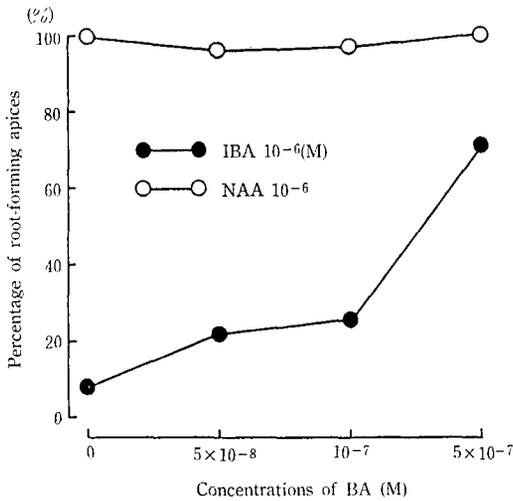


Fig. 28. Effect of growth regulators on callus formation in culturing the 0.5 mm-length apices excised from the predeveloping lateral shoots in the head of asparagus spears (after 12 weeks of culture).

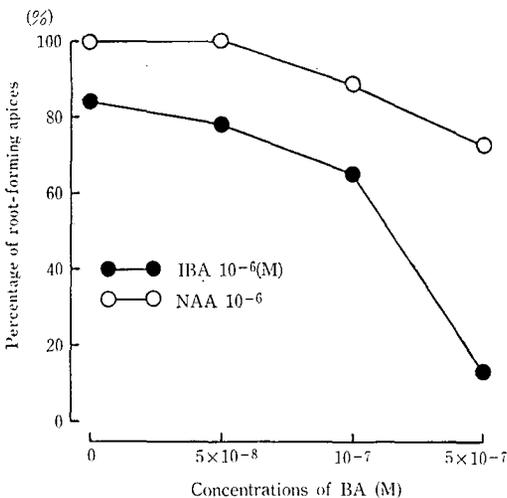


Fig. 29. Effect of growth regulators on root formation in culturing the 0.5 mm-length apices excised from the predeveloping lateral shoots in the head of asparagus spears (after 12 weeks of culture).

II 茎端 (2~3 mm) の培養におけるオーキシシン (IBA) およびサイトカイニン (BA) の影響

1. 材料および方法

(1) 培養組織片: 第2章第2節I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: 生長調節物質については, BAを0, 10^{-7} , 5×10^{-7} Mの3段階, IBAを0, 5×10^{-7} , 10^{-6} , 5×10^{-6} , 10^{-5} Mの5段階とし, これらを組み合わせた15区を設けたほかは第2章第2節I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第2章第2節Iと同様とした。

2. 結果

茎の発育個体率は概して高く, 茎の伸長はBA添加区で良好であった (Fig. 30)。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 5×10^{-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, オーキシシン濃度が高い区で高まる傾向が認められた (Fig. 31)。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} ~ 5×10^{-7} M, IBA 10^{-5} Mを添加した区で良好であり, 植物体の再生も若干認められた。カルスの形成は根の分化と同様にオーキシシンの濃度が高い区で良好であった。

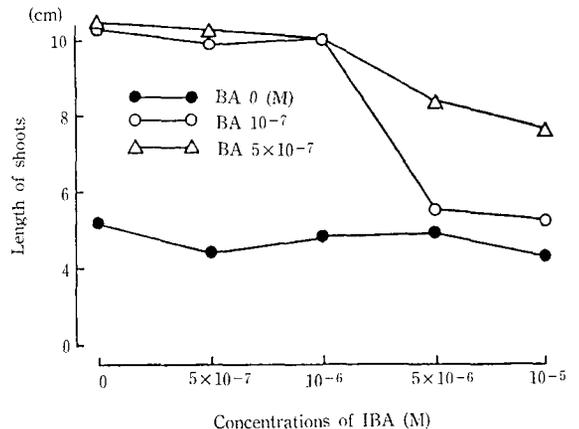


Fig. 30. Effect of growth regulators on shoot growth in culturing the 2-3 mm-length apices excised from the predeveloping lateral shoots in the head of asparagus spears (after 12 weeks of culture).

III 茎頂部組織 (0.2 mm) の培養における光条件の影響

1. 材料および方法

(1) 培養組織片: 第2章第2節I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第2章第2節Iよりやや小さく, 長さ

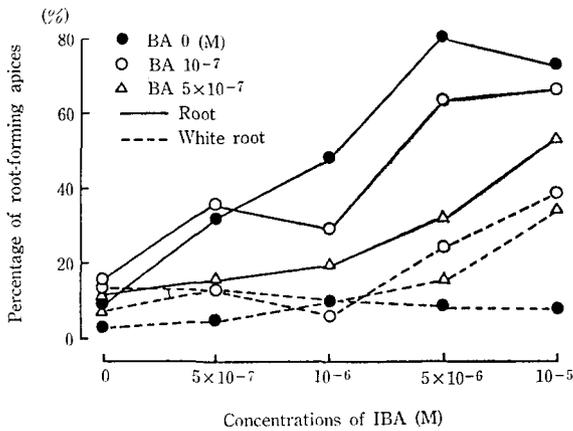


Fig. 31. Effect of growth-regulators on root formation in culturing the 2-3 mm-length apices excised from the predeveloping lateral shoots in the head of asparagus spears (after 12 weeks of culture).

0.2 mm 程度とした。

(2) 培地の調製： 第 2 章第 2 節 I と同様の固形培地を用いたが、生長調節物質は NAA 0.3 mg/l とカイネチン 0.1 mg/l とを組み合わせて添加した。他はすべて第 2 章第 2 節 I と同様とした。

(3) 培養条件： 光の条件は、500, 1,000, 5,000 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、特記しない部分は第 2 章第 1 節 I と同様である。

2. 結 果

(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かりみられた。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 区では 50% で最も低かった (Table 7)。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. 32)。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、茎の数は暗所区で特に少なく、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 7)。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 週後ころより擬葉が発生したが、暗所区では認められなかった。しかし、擬葉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

Table 7. 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).

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.

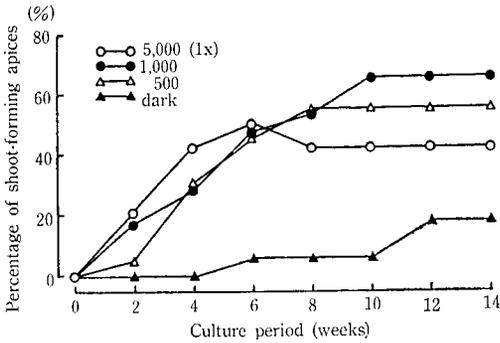


Fig. 32. Time course changes in shoot formation in culturing the 0.2 mm-length apices excised from the predeveloping lateral shoots in the head of asparagus spears.

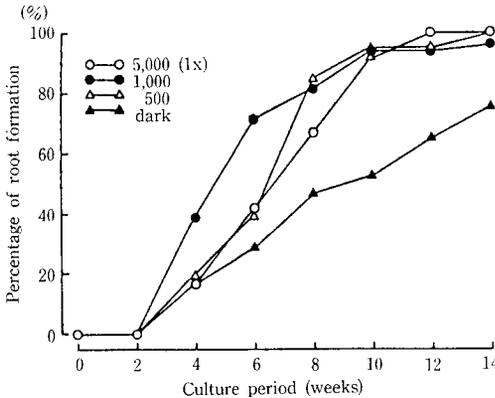


Fig. 33. Time course changes in root formation in culturing the 0.2 mm-length apices excised from the predeveloping lateral shoots in the head of asparagus spears.

多かった。しかし培養初期のころは肥大のよう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) で試験管内いつばいに広がり旺盛な生長を示した (Table 7)。

(3) 根の分化: 根の発生は各区とも培養3~4週ごとに始まり、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. 33)。

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 7)。

なお、茎と白色根の両方を分化しこれらがバランスを保って発育した場合は幼植物体にまで発育する個体もみられた。

第5節 考 察

アスパラガスの組織培養は、LOO^{9,46)} がシュートの無限生長を行なわせたのに始まり、GALSTON⁴⁷⁾, GORTER⁷⁾, ANDREASSEN³⁾ らと受け継がれてきた。原田⁴⁸⁾, INAGAKI ら^{14,44)}, 八鍬³⁹⁾ はカルスからの器官分化、幼植物再生に成功した。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告されている⁴⁷⁾。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⁸⁾, MURASHIGE ら¹¹⁾ 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^{13,19,20)} の行っている方法で、まずある部位の組織片を培養して多数の茎が発生した培養体 (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。本実験では前者の方法について検討するため、若茎頭部小側枝、小側枝の茎頂部を材料として、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を試みた。その結果は上述のとおりで、上記2種の組織片の中で茎と根 (特に白色根) の両方を形成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つの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できるわけではなく、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、さらに地下茎と鱗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となるためには、さらに地下茎、鱗芽群の形成についても検討する必要があるものと考えられる。

組織の分化がかなり進んでいる小側枝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、生体外培養に関する研究から得られた知見を応用することにより、現在は不可能である挿木繁殖についても、将来その技術を確立できる可能性があるものと考えられる。

若茎頭部小側枝の発育率は低かったが、個体によっては茎が叢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、まず多数の茎を形成させたのち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には、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及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も効果的であった。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 の効果が顕著で、適濃度はいずれの場合も 10^{-6} ~ 10^{-5} M の範囲にあるものと考えられる。根の分化に及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、一定の傾向はみられなかった。また、光の強さについてみると、茎頂部組織の培養においては白色根が分化した組織片の割合は、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、若茎の二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が認められた。特定の有用な形質を有する株を保存または増殖する場合には、本実験で用いた方法で充分であると思われるが、営利的栽培で必要とされる大量のクローンを供給する場合には本研究の結果を基礎として、地下茎・鱗芽群の形成などについてさらに検討すれば充分その可能性があるものと考えられる。

また、クローンの大量増殖という観点からみれば、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多段的な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。

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オーキシンとサイトカイニンの相互作用が知られている。したがって、カルス経由で植物体を再生させる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、これに添加するオ

ーキシンおよびサイトカイニンの濃度範囲を決定し、さらにカルスの生長ならびに器官分化のための濃度の至適組合せについて検討しなければならない。また WILMAR ら³³⁾ はアスパラガス実生の第1次茎の切片を LINS-MAIER & SKOOG の培地で培養し、2,4-D 1.0 mg/l とカイネチン 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。

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^{49,50,51)}を除きオーキシンは必須成分として加えられている^{26,50,51,52,53,54,55,56,57,58)}。しかし、生長調節物質の一つであるサイトカイニンを含まない培地でもカルスを形成させることが可能で多くの場合サイトカイニンはカルス誘導に必須なものではないと考えられている^{49,54,59)}。

第4節IのBA無添加の区でオーキシンが適量添加された場合には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オーキシンのみでカルスを誘導しうることが実証された。しかし、カルスの生長をさらに促進するためには、培地にオーキシンとサイトカイニン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ったが、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オーキシンとサイトカイニンが全く独立的に作用するものではなく、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は現在までの観察結果から MS 培地は WHITE の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ったが、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は無添加でもオーキシン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った。

またオーキシンとして用いた2,4-DおよびNAAはともに根および茎の分化を誘起するために有効であった。

第3章 培養体に発生した茎の茎頂および節部組織の培養

第2章で述べたとおり、若茎頭部の小側枝、小側枝の茎頂部組織、若茎中間部の輪切り切片を培養した場合、いずれの部位の組織片からも茎と根の分化が認められ一部再生植物体も得られたが、大量増殖に用いるには増殖率がやや低かった。

そこで、栄養繁殖を目的とする場合は、試験管の中でまず茎だけを効率よく増やし、その培養体の茎の切片を移植して植物体を再生させる方法のほうが増殖率はるかに高まり有利であると考えられる。この場合、茎を発生させることは比較的容易であるので、本章では培養体の茎を材料として、その茎頂部および節部切片を培養した場合の器官分化について検討した。

第1節 培養体茎頂の培養

I 茎頂 (0.5 mm) からの器官分化に及ぼす IBA および NAA の影響

1. 材料および方法

(1) 培養組織片: 'メリーワシントン 500' の8年生株の若茎小側枝の培養によって得られた叢生状の分枝から直径1 mm程度のものを選び、解剖顕微鏡下で長さ0.5 mmの茎頂を取り出して培養した。

(2) 培地組成: 第2章第1節と同様、無機塩類およびアミノ酸、ビタミンなどの有機物質は MURASHIGE & SKOOG の処方に従い、これにシュクロース 2.0% と所定の生長調節物質を添加した後、pH を 5.5 に調整した。さらに粉末寒天 6 g/l を加えて加熱溶解したのち 20 mm×120 mm の試験管に 10 ml ずつ分注し、アルミホイルで封じた。滅菌は 120°C、1 kg/cm² で 15 分間行った。生長調節物質としては IBA と NAA を用い、それぞれの5段階の濃度 (10⁻⁷, 5×10⁻⁷, 10⁻⁶, 5×10⁻⁶ および 10⁻⁵ M) の単用と無添加の場合の計 11 区を設けた。

(3) 培養条件: 上記の茎頂部組織片を 1 試験管あたり 1 個ずつ置床し、25°C、1,000 lx (白色蛍光灯使用)、1日 16 時間照明の条件下で培養した。置床組織片数は 1 区当たり 25 とした。

(4) 調査方法: 培養開始 2 週間から 2 週間ごとに茎の発育、カルス形成、根の分化・発育について調査を行った。

2. 結 果

茎の発育は早いもので培養 2 週間ごろより始まったが、かなり遅れて発育するものもあった。培養 12 週間における茎発育個体率は Fig. 34 のとおりで、オーキシン無添加では 20% に止まったが、IBA の 5×10⁻⁷~10⁻⁵ M で 65~80%、NAA の 5×10⁻⁷~5×10⁻⁶ M では 60~65% とかなり高かった。また、茎が発育した個体についての平均茎数は 2~6 本であったが、オーキシンの種類ならびに濃度による明瞭な差は認められなかった (Fig. 35)。

根の分化は各区とも培養 3~4 週間ごろに始まり、徐々に根分化個体数が増加した。12 週間後の調査結果は Fig. 36 のとおりで根の分化率は IBA 10⁻⁶~10⁻⁵ M、NAA 5×10⁻⁷~10⁻⁵ M で 80% 以上に達した。しかし、白色根の分化率はそれほど高くなり、最高で NAA 5×10⁻⁶ M 区の約 30% であった (Fig. 36)。

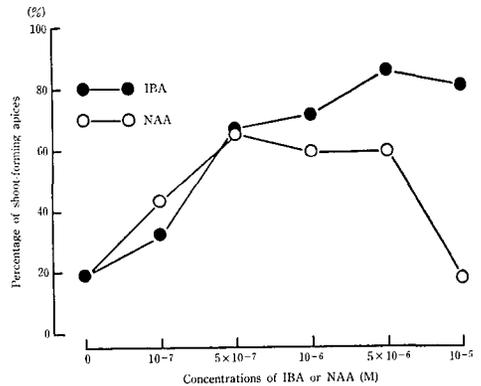


Fig. 34. Effect of growth regulators on shoot formation in culturing 0.5 mm-length apices excised from the stock shoots (after 12 weeks of culture).

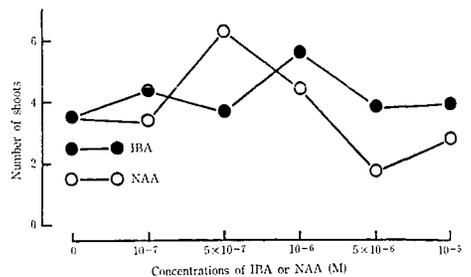


Fig. 35. Effect of growth regulators on shoot growth in culturing 0.5 mm-length apices excised from the stock shoots (after 12 weeks of culture).

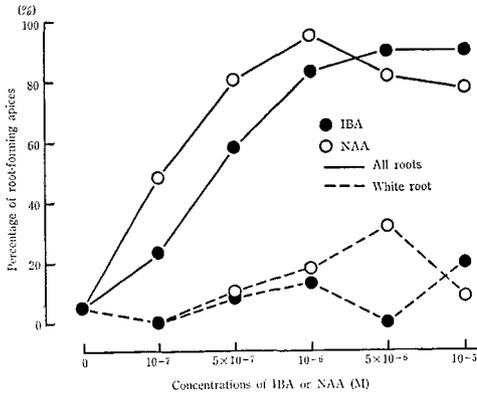


Fig. 36. Effect of growth regulators on root formation in culturing 0.5 mm-length apices excised from the stock shoots (after 12 weeks of culture).

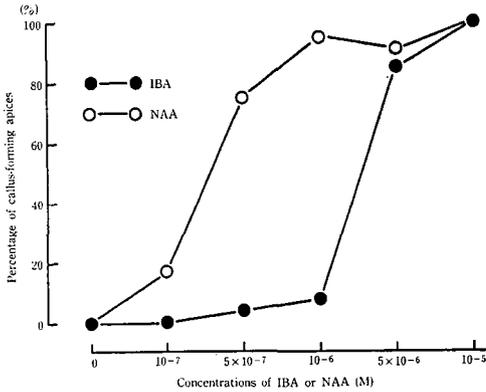


Fig. 37. Effect of growth regulators on callus formation in culturing 0.5 mm-length apices from the stock shoots (after 12 weeks of culture).

カルス形成率は Fig. 37 に示すとおりで、オーキシン低濃度で低かったが、濃度が高まるにつれて高くなった。しかし、 $5 \times 10^{-7} \sim 10^{-6}$ M では、NAA 添加区で 70~90% の組織片がカルスを形成したのに対し、IBA 添加区では 10% 以下の形成率で、両者の間に明瞭な差が認められた。さらに濃度が高まり、 $5 \times 10^{-6} \sim 10^{-5}$ M になると NAA IBA のいずれにおいても 80% 以上のカルス形成率でほとんど差は認められなくなった。

II 培養体茎頂の培養における組織片の大きさと器官分化

1. 材料および方法

(1) 培養組織片：茎頂部組織片の大きさを 0.2~0.4

mm, 0.5~1.0 mm および、3.0~5.0 mm の 3 段階としたほかは第 3 章第 1 節 I と同様とした。

(2) 培地の調製：生長調節物質を IBA 10^{-6} M 単用としたほかは第 3 章第 1 節 I と同様とした。

なお、培養条件、調査方法はすべて第 1 章第 1 節と同様である。

2. 結果

培養 12 週後における調査結果は Fig. 38 のとおりで、茎発育率は 60~70% の範囲であり組織片の大きいほうがわずかではあるが茎の発育率が高い傾向が認められた。しかし、茎数は組織片が小さいほど明らかに多かった。また、植物体再生に不可欠な根の分化率も組織片の小さい区で高かった。また、白色根の分化率は概して低く、最も小さい組織片 (0.2~0.4 mm) で 20% 程度であった。

第 2 節 培養体の茎節部組織の培養

節部切片の培養については種々の濃度の NAA および IBA を単用または BA と組み合わせて添加した培地を用いて予備実験を行った。その結果をみると、培地上で培養を続けた場合、根の分化率が低く、幼植物の再生率はいずれの培地組成においてもきわめて低かった。一方、ある期間生長調節物質を含む液体培地または固形培地で培養した後、生長調節物質無添加の固形培地に移植して培養すると、かなり発根率が高まることと認められた。したがって、本章では生長調節物質を含む液体培地で前培養を行ったのち固形培地に移植した場合の器官形成について検討した。

I IBA を含む液体培地での前培養と移植の効果

1. 材料および方法

(1) 培養組織片：若茎小側枝の培養で得られた茎 (直径 1 mm 程度) から取り出した節部をもつ長さ約 1 cm の切片を用いた。

(2) 培地組成：第 2 章第 1 節と同様、無機塩類およびアミノ酸、ビタミンなどの有機物質は MURASHIGE & SKOOG の処方に従い、シュクロース 2.0% 及び所定の生長調節物質を添加した。生長調節物質の種類、濃度ならびに処理法は Table 8 に示すとおりである。すなわち、初めから IBA 10^{-6} M を含む寒天培地に置床して培養を続けた A 区のほかは、初めの 1 日、3 日または 7 日間を IBA 10^{-5} M 単用またはこれに BA 10^{-6} M を組み合わせて添加した液体培地で前培養した。その後 C~H の 6 区は生長調節物質を除いた寒天培地に移植し

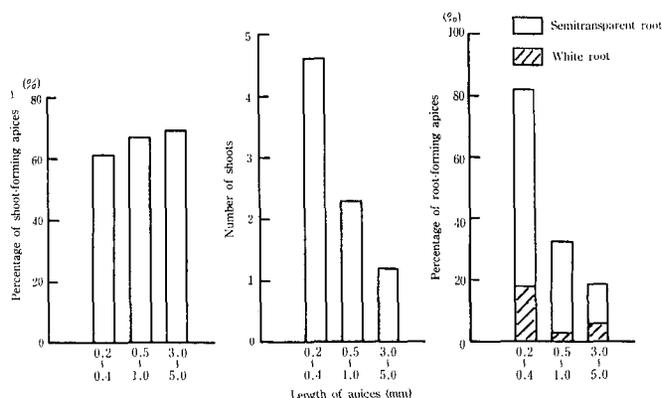


Fig. 38. Effect of sizes of apices on organ formation in culturing the apices excised from the stock shoots (after 12 weeks of culture).

Table 8. Effect of the growth regulators and transferring on organ formation in culturing 1 cm-length shoot segments with a node excised from the stock shoots (after 10 weeks of culture).

Mark of batches	Conc of growth regulators in liquid medium used in preculture		Culture Period in preculture (day)	Conc. of growth regulators in solid medium after transfer		Percentage of shoot-forming segments (%)	Number of shoots per segment	Length of shoots (cm)	Percentage of root-forming segments (%)	Number of roots per segment	Length of roots (cm)
	BA (M)	IBA (M)		BA (M)	IBA (M)						
A	—	—	—	0	10^{-6}	90.0	5.3	7.8	0	—	—
B	0	10^{-5}	7	0	10^{-6}	37.5	4.7	5.3	22.5	2.3	1.9
C	0	10^{-6}	1	0	0	75.0	4.5	7.5	2.3	1.0	2.0
D	0	10^{-5}	3	0	0	60.0	5.4	6.4	10.0	1.5	1.5
E	0	10^{-5}	7	0	0	45.0	3.0	4.0	7.5	1.0	1.3
F	10^{-6}	10^{-5}	1	0	0	79.5	5.4	6.0	2.3	1.0	0.5
G	10^{-6}	10^{-5}	3	0	0	97.5	7.3	7.3	12.5	1.6	1.0
H	10^{-6}	10^{-5}	7	0	0	96.4	4.4	7.3	32.1	4.8	2.3

た。また、B区についてはIBA 10^{-6} Mを加えた寒天培地に移植した。

(3) 培養条件：培養は 25°C 、1,000 lx、16時間日長の条件下で行なった。なお、容器は100 ml容三角フラスコを用い、前培養では1容器当たり30 mlの液体培地に20組織片を入れ、移植後寒天培地上で培養する場合は1容器あたり4組織片を置床した。この場合、1区当たり10~11容器、40~44組織片とした。

2. 結 果

茎の発育は植込み1週間後から始まったが、根の分化はそれよりかなり遅れ4~5週後より始まった。培養10週後の調査結果はTable 8のとおりで、茎の発育は概して良好であったが、根の分化率は特に高い区は認められなかった。これらのうち、根の分化率の最も高いのは

H区(32.1%)で、B区(22.5%)がこれに次いでいた。これらはいずれも液体培地で7日間前培養後に寒天培地に移植した区であり、培養液中の生長調節物質はH区がBA 10^{-6} MとIBA 10^{-5} Mとを含み、B区はIBA 10^{-5} M単用であった。また、移植後の固形培地は、H区の場合生長調節物質を含まず、B区はIBA 10^{-6} Mのみを添加したものである。なお、本実験においては直接寒天培地に置床したA区では発根が認められなかった。

II NAAを含む液体培地での前培養と移植の効果

1. 材料および方法

(1) 培養組織片：IIの場合と同様の培養茎から取り出した節部をもつ長さ7 mmの切片を用いた。

(2) 培地組成と処理法：移植前の培養(前培養)に用

Table 9. Concentrations of BA and NAA in each medium in preculture before transfer.

Growth regulator	Mark of media					
	A	B	C	D	E	F
BA (M)	0	0	0	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁵
NAA (M)	0	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁵	5×10 ⁻⁵

いた培地の組成については、生長調節物質は Table 9 に示すように BA と NAA を組み合わせた A~F の 6 通りとし、他は I と同様の液体培地とした。これらの培地で 3 日、7 日または 14 日間前培養したのち、生長調節物質を含まない固形培地に移植して培養を続けた。

また、比較のために、初めからそれぞれの培地組成の寒天固形培地に植え込んで、移植を行わずに培養を継続した区も設けた。

(3) 培養条件： 上記の節部切片の前培養では 1 容器

あたり 30 個ずつ、固形培地では 5 個ずつ置床し、25°C、4,000 lx、16 時間日長の条件下で静置培養を行った。1 区あたり組織片数は 55 (11 容器) とした。

(4) 調査方法： 第 1 章第 1 節と同じ方法によって行った。

2. 結 果

茎および根の発育開始期は I の場合とほぼ同様で、茎は植込み 1 週間後より、根は 4~5 週間後よりそれぞれ分化発育が始まった。各区の茎の発育、カルス形成、根分化についての経時的变化は Fig. 39, 40, 41, 42 に示すとおりである。

まず初めから生長調節物質無添加の固形培地に植え込んだ Medium A (Fig. 39, 40, 41, 42 の左上) をみると、茎の発育は 80% に達したが、カルス形成率、根の発育はともに極めて低かった。次に NAA のみを 10⁻⁶M 添加した Medium B (Fig. 39, 40, 41, 42 の左側の中段) では、茎の発育は液体培地に 14 日間浸漬したのち生長調節物質無添加の固形培地に移植した区では

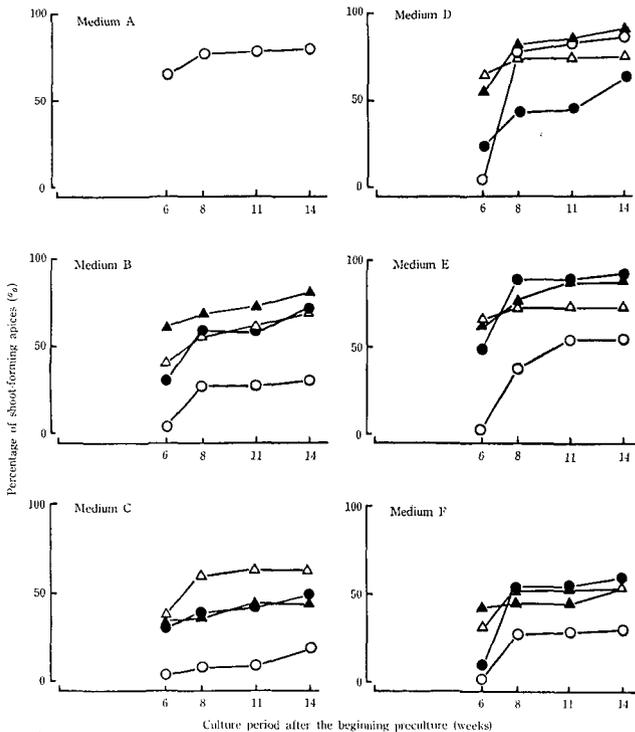


Fig. 39. Effect of the growth regulators and transferring on shoot formation in culturing 7 mm-length segments with a node excised from the stock shoots.

○—○ long-term culture without transferring, ●—● 3-day preculture
 △—△ 7-day preculture, ▲—▲ 14-day preculture

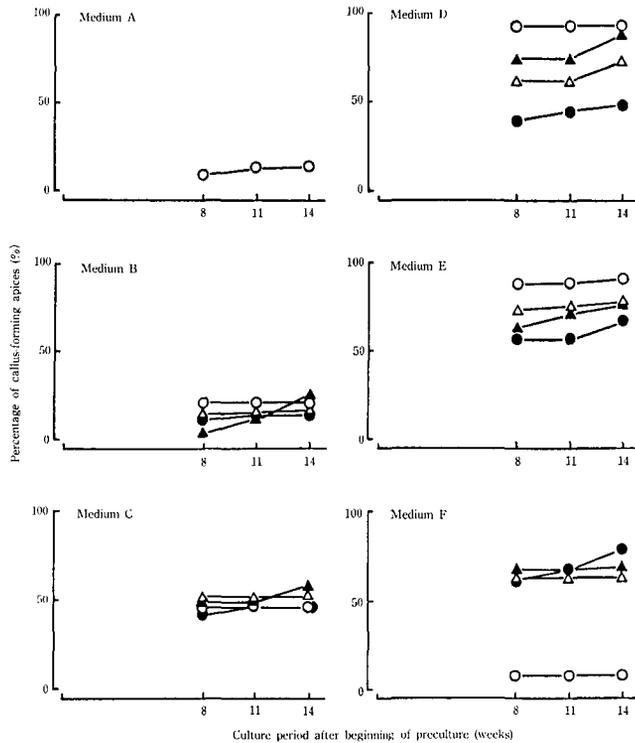


Fig. 40. Effect of the growth regulators and transferring on callus formation in culturing 7 mm-length segments (with a node) excised from stock shoots.

○—○ long-term culture without transferring, ●—● 3-day preculture
△—△ 7-day preculture, ▲—▲ 14-day preculture

80%程度で最も高く、最初から固形培地上で培養を継続した区は約30%で最低であった。カルスの形成と根の分化は移植の有無に関係なく、すべての区で良好ではなかった。以上2種の培地に比べると Medium C (NAA 10^{-5} Mのみ添加), Medium D (BA 10^{-6} M, NAA 10^{-5} M添加), Medium E (BA 10^{-5} M, NAA 10^{-5} M添加), Medium F (BA 10^{-5} M, NAA 5×10^{-5} M添加)の4種の培地の中では、茎の発育だけではなく、カルス形成率や根の分化率もかなり高い区があった。これらのうち、カルス形成率は Medium Dと Medium Eの無移植区で特に高かったが、植物体再生に関係の深い根の分化率は、全般を通じて移植区が高く、移植の効果が認められた。なお、これらの区のうち、茎と根の両方を分化した組織片率が最終的にはほぼ50%に達したのは、Medium D (BA 10^{-6} M, NAA 10^{-5} M)で14日間前培養した区と Medium F (BA 10^{-5} M, NAA 5×10^{-5} M)で3日、7日および14日間前培養した区であった。また、茎の前培養開始後比較的早く茎と根の両者を分化

したのは Medium C (BA無添加, NAA 10^{-5} M)で7日間前培養した区, Medium Dで7日および14日間前培養した区, Medium E (BA 10^{-5} M, NAA 10^{-5} M)で7日または14日間前培養した区および Medium Fで7日間前培養した区などであった。

第3節 考 察

アスパラガスの栄養繁殖を目的として組織培養を行った報告は少なくないが、これらを見ると二つの方法が試みられている。その一つは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 ANDREASSEN と ELLISON³⁾, CHIN, C. K.⁴⁾, GALSTON⁴⁷⁾, GORTER⁷⁾, GREINER⁴³⁾, HASEGAWA ら⁸⁾, MURASHIGE ら¹¹⁾, STEWARD と MAPES¹²⁾, TAKATORI ら²⁾などが試みている。第二の方法は、ある部位の組織片を培養して多量の茎 (stock plants) を形成させ、その茎の切片を培養して多数の植物体を再生させる方法で、INAGAKI ら⁴⁴⁾, MATSUBARA と CLORE¹⁰⁾,

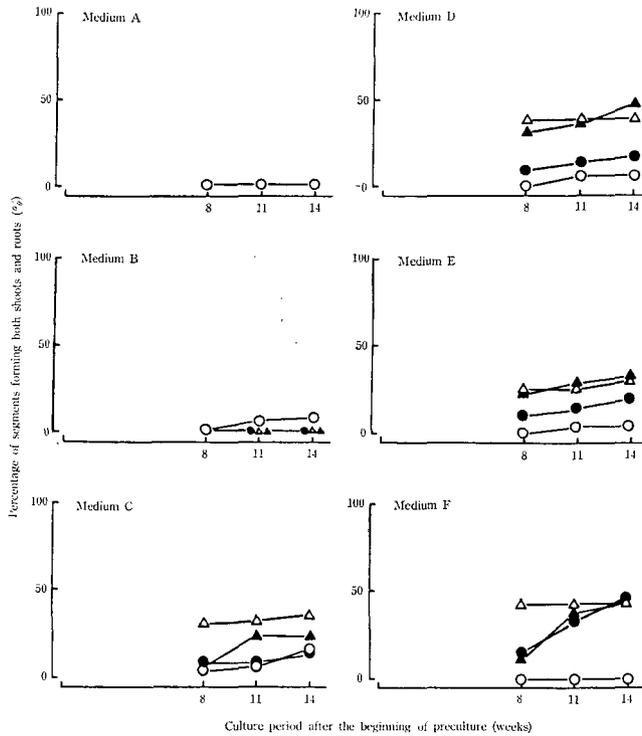


Fig. 41. Effect of the growth regulators and transferring on root formation in culturing 7 mm-length segment with a node excised from the stock shoots.

○—○ long-term culture without transferring, ●—● 3-day preculture
 △—△ 7-day preculture, ▲—▲ 14-day preculture

YANG と CIORE^{13,19,20} などが報告している。本章では第2の方法について検討するため、培養体の茎を材料として、その茎頂と節部切片を培養した場合の器官形成について四つの小実験を行った。

まず、茎頂培養を行った第1節1の結果についてみると、茎の発育も根の分化もオーキシン無添加区よりも、適濃度のオーキシンを添加した区で良好であった。すなわち、茎の発育に対する適濃度はIBAで $5 \times 10^{-7} \sim 10^{-5}$ M, NAAで $5 \times 10^{-7} \sim 5 \times 10^{-6}$ Mと考えられ、根の分化に対してはIBAで $10^{-6} \sim 10^{-5}$ M, NAAで $5 \times 10^{-7} \sim 10^{-5}$ Mが適濃度の範囲と考えられた。

この結果をみると、茎の発育に対する適濃度の範囲はIBAのほうがNAAよりやや広く、根の分化に対する適濃度の範囲はNAAの方がやや広いことになる。いずれにしてもアスパラガスの培養体に発生した茎の茎頂を培養した場合においては、器官形成に適するオーキシンの濃度範囲はかなり広いといえることができる。また、茎頂部の組織片の大きさについて検討した第3章第1節

IIの結果では組織片が小さいほど発育する茎数も多く、根の分化率も高かった。GREINER⁴³ や MURASHIGEら¹¹)も同様のことを認めているが組織片が小さすぎると生存率が低いので、その点も考慮すべきであろう。

第2章でも述べたようにアスパラガスの組織培養を行った場合、分化する根には透明な根と白色の根があり、白色根のほうが概してよく伸長し、分岐根を発生しやすく、根の機能は明らかに透明根より旺盛である。したがって、栄養繁殖を目的とする場合は白色根の分化が特に重要である。第3章第1節IIの結果をみると、発根率はかなり高かったが白色根の分化率は高い場合で20%程度であった。

また、茎頂培養の場合は切断面から根が分化するため、根の発生する部位と芽の原基とが離れていることが多く、両者の組織的つながりができにくい傾向が認められ、植物体再生の際の問題点と考えられる。すなわち、アスパラガスの株が発育して完全な植物体となるためには鱗芽群をもった地下茎ができ、その下部から白色根が

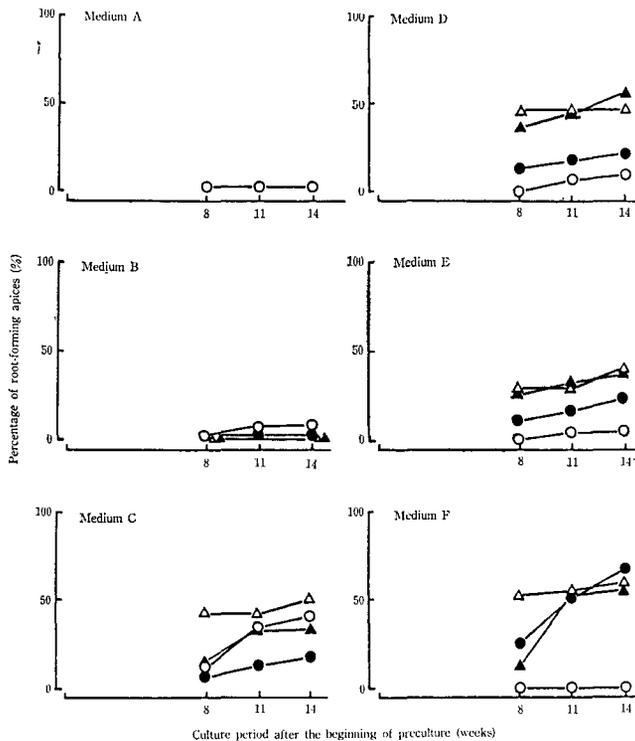


Fig. 42. Effect of the growth regulators and transferring on the shoot and root formation in culturing 7 mm-length segments with a node excised from the stock shoots.

○—○ long-term culture without transferring, ●—● 3-day preculture
 △—△ 7-day preculture, ▲—▲ 14-day preculture

発生するといういわゆる地下茎の体制が整う必要がある。したがって、植物体の再生率を高めるには、ただ単に茎や根の発生率を高めるだけではなく、地下茎の体制を如何に整えるかという点が重要な課題となる。

以上の点から考えると節部切片の培養は、茎頂培養に比べ地下茎の体制を整え易いことがわかった。すなわち、節部切片を培養した場合に節部に生ずるいわゆる‘節根’は白色根である場合が多く、節部から発育する茎と組織的に早くつながり、鱗芽群や地下茎の形成も比較的容易であった。節部切片の培養においては、生長調節物質を含む固形培地上で長期間培養を継続するよりは、初めに生長調節物質を含む液体培地で7~14日間培養して適量生長調節物質を取り込ませた後、生長調節物質を含まない寒天培地に移植して培養した場合のほうが根の分化率ははるかに高かった。このような移植の効果についてはすでにいくつかの報告^{20,60)}で認められており、節部切片の培養を行う場合に適用できる方法と考えられる。この場合、前培養に液体培地または固形培地の

いずれを用いるかということ、また、前培養に使用する培地組成、とくに生長調節物質の種類と濃度、前培養の期間について、さらに十分な検討を加えることによって、より高率で確実な植物体再生の方法が確立されるものと思われる。

つぎに、オーキシンの種類について、これまで筆者らが行った実験を総合的に検討してみると、IBAは組織片からの直接的な根の形成(白色根)を促すことが多いのに対し、NAAは低濃度でもカルス形成を誘起し、カルスからの再分化根が多くなる場合が多かった。しかし、NAAを用いた場合にもIBAと同程度の白色根が分化することがあり、この点についてはさらに詳細な検討が必要であると考えられる。

栄養繁殖の最終目的である培養茎からの植物体再生率は、各実験を平均すると20~30%と必ずしも満足できるものではなかった。しかし、これらの調査打ち切り後、さらに2~3ヵ月放置しておくことかなりの切片が白色根を分化して、十分に移植できる再生植物体の状態に

まで発育している場合も多い。これらの結果を含めると再生率はかなり高まることが推察される。

筆者らは、現在二つの目的のためにアスパラガスの組織培養による栄養繁殖を行っている。その一つは雄性系統の花粉親となる超雄株 (MM 株) を増殖すること (第4章第2節において詳述)、および母本として用いるための優良形質を有する雌株を急速に増殖することであり、他の一つは肥培管理に関する試験を行なうための形質の揃った栄養系を増殖するためである。なお後者についてはすでに1株から約250株のクローンを育成して砂耕による肥料試験の材料に供し、好成績を収めている。

第4章 アスパラガスにおける組織からの器官形成技術の利用

第1章、第2章、第3章では、アスパラガスのいろいろな部位を培養した場合の結果について述べたが、本章ではこれらの培養技術を実際に用いて行った応用面の実験について述べる。特にこれまで筆者が行った実験は、アスパラガスにおける有用遺伝子源の凍結保存への応用、アスパラガスの雄性系統育成における超雄株の増殖への応用などである。

第1節 液体窒素による有用遺伝子源の凍結保存における利用

各種作物において遺伝子源保存の重要性が増大しつつあるが、個体レベルすなわち圃場などに栽植して行う維持・保存法では、多大な労力と経費を必要とするとともに病虫害等による消滅の危険性もある。一方、種子による保存法もあるが作物の種類によっては必ずしも利点のみとはいえない。このような場合、植物体再生が可能な部位を保存しておき、必要に応じてその部位から植物体を再生させて用いるという方法によることもできる。

近年注目されている方法の一つに液体窒素 (LN₂) による凍結保存がある。これは超低温 (-196°C) 下で植物体の一部 (細胞, 生長点部組織, 茎頂など) を凍結して保存しておき、育種などを行う際に必要に応じて植物体を再生させて用いる方法である。この凍結保存法は、すべて無菌的に行われることおよび融解後において植物体再生が可能であることが必須の条件となる。換言すれば、凍結保存法は、凍結・融解に関する技術と組織培養に関する技術とから成っており、両者が確立してはじめて完成するものである。

本研究では、アスパラガスにおける組織培養技術の応用としてアスパラガス有用遺伝子源の凍結保存への適用

を試みた。

I 液体窒素中で凍結した茎端の生存に及ぼす凍害防御物質の影響

植物組織を凍結保存する場合、凍害防御物質を含んだ凍結媒液中に凍結保存すべき組織片を浸漬して凍害防御物質を適当量だけ取り込ませたのち、その組織片を凍結媒液ごと冷却して保存することがある。本節では、このような方法によってアスパラガスの茎頂を LN₂ 中で凍結した場合の生存に及ぼす凍害防御物質 (本実験では dimethyl sulfoxide —以下 DMSO と略記—を用いた) の濃度の影響について検討した。

1. 材料および方法

操作は次の手順によってすべて無菌的に行った。

(1) 組織片の調製: 1月から2月にかけての耐寒性が高くなっていると思われるアスパラガス株 (品種メリーワシントン 500, 5年生) を掘り上げ箱植えにして、温室内 (15~25°C) で萌芽させた。若茎が 10~25 cm に伸長したときその頭部から小側枝をとり、表面殺菌 (次亜塩素酸ナトリウム溶液—有効塩素 1%, 10分間浸漬) を行ったのち、1.5~2.0 mm の茎端組織をとり出して材料とした。

(2) 凍結媒液処理: 上記組織片をスピッツ管中の凍結媒液 (グルコース 3% および DMSO 4, 8, 16 および 20% を含む) 0.25 ml に浸漬 (3°C, 2時間) した。

(3) 予備凍結: スピッツ管ごとアルコール槽 (0°C) 中に挿入して冷却した。-10°C まで冷却したのち植水し、その後 0.5°C/min で -40°C まで予備凍結を行った。

(4) 液体窒素 (LN₂) 浸漬処理: 予備凍結終了後直ちに LN₂ 中に入れ (急速冷却: 300°C/min) 30分間放置した。

(5) 融解: 40°C の温水中で急速融解した。

(6) 凍害防御物質の排出: 融解した組織片を MURASHIGE & SKOOG の処方による物質を含む溶液の中に浸漬して 30分間放置した。

(7) 生死判定および植物体再生のための培養: MS 培地, シュクロース 2%, IBA 5×10⁻⁷ M, BA 10⁻⁷ M および寒天 7 g/l を含む培地を用いて, 25°C, 4,000 lx (16時間日長, 白色蛍光灯) の条件下で培養した。

2. 結果および考察

Fig. 43 に示すとおり, DMSO 12% および 16% の区で高い生存率 (80~82%) を示した。このことから, アスパラガスにおいては上述の処理方法で DMSO の濃度を 12~16% とした場合, 液体窒素中での凍結保存が可

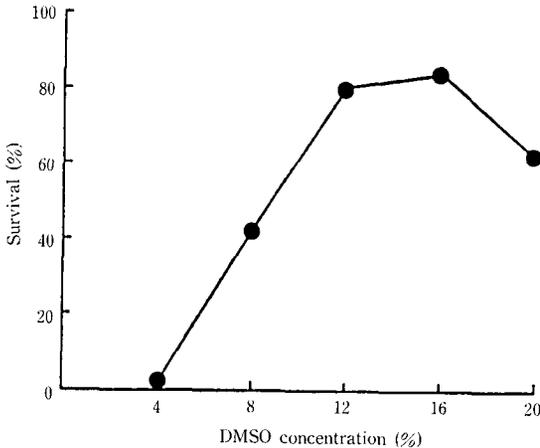


Fig. 43. Effect of DMSO concentrations on survival of shoot tips immersed in liquid nitrogen after prefreezing to -40°C .

能であることが実証された。

アスパラガスを材料としたこの種の報告は見当らないが、他の種の植物を用いて液体窒素中で凍結処理を行い、融解後の生存に成功した報告をみると、培養細胞を凍結した場合の DMSO の至適濃度は 5~8% であると報告されている。しかし、茎頂を凍結保存した場合には相対的に高い濃度の 12~16% が適当であると報告されており^{61,62)}、Fig. 43 に示したように、本実験においても DMSO の濃度は 12~16% が至適で、そのときの生存率は 80~82% であった。

このことは、培養細胞では DMSO の取り込みが迅速に行われるため濃度が高すぎると薬害の出る恐れすらあるが、茎頂などの組織は多数の細胞が集まったある種の体制を有する構造体であるところから、DMSO などの凍害防御物質の取り込みがはるかに遅く、内部まで浸透するのにある時間を要するものと思われる。本実験においても、培養細胞では薬害が現われると思われる 12~16% の濃度が適当であり薬害も現われなかった。薬害は 20% の場合に現われたのみであった。

以上のことから、アスパラガスの茎頂を凍結保存する場合の凍結防御物質 DMSO の濃度は 12~16% が適当であると考えられる。

なお、液体窒素中で凍結し融解したのち第 2 章で述べたのと同じ方法で培養した茎頂は生存しており、幼植物が再生した。

II 液体窒素中で凍結した茎頂の生存に及ぼす予備凍結温度の影響

植物の細胞または組織を凍結保存する場合の一つの方法として、予備凍結を行ってから LN_2 中に入れる方法が用いられている^{63,64)}。予備凍結は細胞外凍結を起こさせて細胞内の水を細胞外へ移動させて脱水し、致命的な細胞凍結を防ぐものであるが、この場合最低何度まで冷却するのが適当であるかという問題がある。換言すれば、過度の低温まで予備凍結を行うと、予備凍結過程すなわち LN_2 中に入れる前の過程において組織・細胞が生存できなくなる。一方、 LN_2 中での凍結過程においては、組織・細胞内に存在する水の量は少ない方がよい。すなわち、組織・細胞が生存できる限界内においてなるべく低い温度まで予備凍結を行って脱水しておいた方がよい。これらのことから、本実験ではアスパラガス茎頂を LN_2 中で凍結する場合に適する予備凍結温度について検討した。

1. 材料および方法

凍結媒液中の DMSO 濃度を 16% とし予備凍結過程における最低温度を -10° 、 -20° 、 -30° 、 -40° 、 -50° および -60°C の 6 段階としたほかは、すべて第 4 章第 1 節 I と同様である。

2. 結果および考察

SAKAI の報告^{63,64)} によれば、予備凍結過程において充分脱水しておくこと、その後の液体窒素による凍結過程において細胞内に生ずる氷晶が小さくまた少なくなり、組織・細胞の生存にとって効果が大きかった。本実験においても、Fig. 44 に示したように、 -10°C までの予備凍結ではその後液体窒素中に入れた場合の生存率は 30% に過ぎなかったが、予備凍結温度が低くなるに従って LN_2 凍結・融解後の生存率が高くなり、 -30° 、 -40° 、 -50° および -60°C では生存率はいずれも 100% であった。

以上の結果から、アスパラガス茎頂組織の凍結保存においては、少なくとも -30°C 以下の温度まで予備凍結を行ってから LN_2 中で保存するのが適当であると考えられる。

III 液体窒素中で凍結した茎頂の生存に及ぼす予備凍結冷却速度の影響

予備凍結過程において所定の温度まで冷却するとき重要である条件の一つに冷却速度がある。すなわち、冷却速度が速すぎると、細胞外凍結による脱水が起こる前に

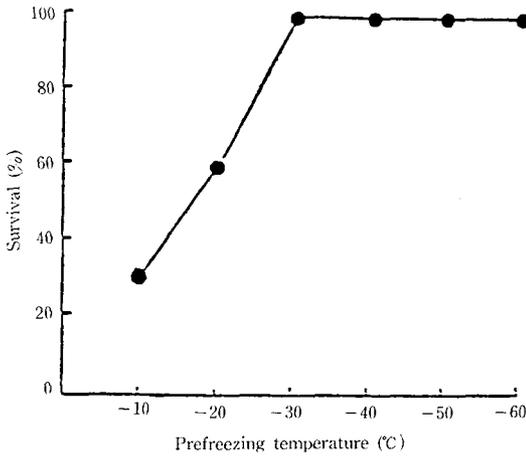


Fig. 44. Effect of prefreezing temperatures on survival of shoot tips immersed in liquid nitrogen after prefreezing.

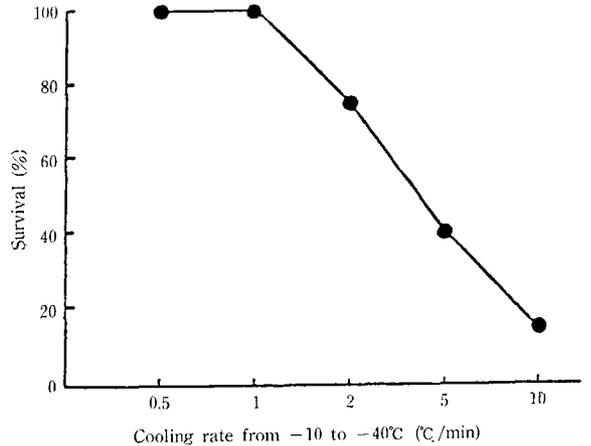


Fig. 45. Effect of cooling rates in prefreezing on survival of shoot tips immersed in liquid nitrogen.

細胞内の水が細胞内凍結を起こしてしまうことになる。そこで、本実験では予備凍結過程における冷却速度について検討した。

1. 材料および方法

凍結媒液中の DMSO 濃度は 16% とし、予備凍結温度は -40°C とした。また、予備凍結の冷却速度は 0.5°, 1°, 2°, 5° および 10°C/min とした。その他については第 4 章第 1 節 I の場合と同様である。

2. 結果および考察

Fig. 45 に示したとおりで、予備凍結過程における冷却速度が 0.5°C/min および 1°C/min のときには、液体窒素中で凍結し融解後茎頂培養を行った場合の生存率は 100% であったが、冷却速度が 2°, 5°, 10°C/min と速くなるにつれて生存率は低下し、10°C/min のとき約 15% であった。

このことから、アスパラガス茎頂の凍結保存における予備凍結の冷却速度については、0.5°~1°C であれば至適範囲内にあるものと思われる。冷却速度が速すぎる場合には、細胞外凍結により脱水される前に細胞内の水が細胞内凍結を起こしてしまうため細胞が死滅するものと思われる。

IV 考 察

従来、液体窒素 (-196°C) 中のような超低温下での生存に関する凍結実験は、凍結・融解過程およびその後の生死判定における条件設定の斉一性ないしは容易さとい

う観点から、主として細胞レベルで培養細胞などを用いて行われてきた^{65,66,67,68,69,70}。しかし、最近では、凍結・融解後の植物体再生が確実であることが凍結保存技術確立の上で不可欠であるとの考え方に基づき、組織・器官などのさらに高次の体制をもつ植物材料を用いて実験が行われつつある。すなわち、現在では主として茎頂が用いられており、カーネーション^{65,71,72}、エンドウ⁷³、イチゴ^{61,74}、ジャガイモ^{75,76,77,78}、トマト⁷⁹、などにその例がみられる。しかし、これらの茎頂においては主要な生長点は 1 カ所存在するのみであり、凍結によりこの生長点が壊死した場合には植物体再生が不可能となる。

一方、本実験において用いたアスパラガス小側枝の茎頂では、数箇所生生長点が散在しており、これらの中の 1 箇所のみが生存していれば植物体再生が可能である。換言すれば、本研究で用いた茎頂は他の植物で用いられている茎頂と異なっているかに高次の体制をもっており、このことは凍結保存・植物体再生の上で一つの利点であると考えられる。また、このことは、今後凍結保存技術を確立する上で、植物体のどのような部分を凍結保存の材料とすべきかという点について示唆を与えるものと思われる。

第 2 節 雄性系統育成における超雄株増殖への利用

アスパラガスは雌雄異株であり、雌株よりも雄株の方が相対的に収量が多く、栽培上は雄株のみを栽植することが有利であるといわれている。アスパラガスでは、種子繁殖における雌雄の割合は 1:1 となる。また、性の判

別は花器によって行う以外に方法はなく、さらにすべての株において花器が着生するのに2年を要するという事実がある。したがって、通常の栽培では雌株のみを選んで栽植することは技術的に不可能で、圃場では雌株と雄株とがほぼ同数存在している。このようなことから、雌株のみを生ずる種子集団を得ることが望まれているが、その場合の一つの方法として超雌株を花粉親として用いる方法がある。これは、アスパラガスの性は1対の対立遺伝子Mおよびmによって決定され、通常の雌株はMm、雄株はmmであるところから、超雌株(MM)を花粉親として雌株(mm)と交配すれば、それらの種子から得られる個体はすべて雌株(Mm)となって現われるという考え方に基づくものである。この場合の超雌株(MM)は、アスパラガスでは、極くまれにしか存在しない両全花を着ける株を元にして作出するのであるが、この作出過程は多大な労力と長い年月(約10年)を要するのみでなく、得られる超雌株の数も極めて少ない。したがって、これらの超雌株は、通常のアスパラガス栽培に必要な大量の雌性種子を得るための花粉親株としては数量的に不充分である。

そこで本実験では、前述のような方法で得られた少数の超雌株を元にして、栄養繁殖の手法でなるべく多くの超雌株を得るための一つの方法として組織培養法を取り上げ、その応用について検討した。なお、本実験では、第1段階として元の植物体(超雌株)の若茎頭部小側枝の茎端を培養して生体外で多数の茎を発生させ、第2段階としてその培養体から叢状に発生した多数の茎の節部から切片をとり、これらをさらに培養することによって植物体を再生させるという方法によった。

1. 材料および方法

多数の茎をもつ培養体を得るための若茎頭部小側枝の培養は次のように行った。沢田ら⁸⁰⁾の作出した超雌株'MM-1'の若茎頭部小側枝から、2~3mmの茎端を取り出して培養した。培地は、MURASHIGE & SKOOGの処方による物質、シュクロース20g/l、BA 10⁻⁷M、NAA 10⁻⁶Mおよび寒天7g/lを含み、pHを5.5に調整したものである。培養条件については25°C、4,000 lx(16時間日長、白色蛍光灯)とし、100 ml容三角フラスコに25 ml培地を入れ組織片は3個ずつ置床した。

上述の培養を、3か月間行ったのち、その培養体の茎から茎端または節部切片を取り培養した。培地には、オーキシンとサイトカイニンとを組み合わせて添加したが、オーキシンとしてはIBA 10⁻⁷または10⁻⁶MならびにNAA 10⁻⁷または10⁻⁶Mを用い、サイトカイニン

としてはBA 10⁻⁷Mを用いた。培地は100 ml容三角フラスコに25 mlずつ入れこれに組織片を4個ずつ置床した。培養は25°C、4,000 lx(16時間日長、白色蛍光灯)の条件下で行った。

2. 結果および考察

(1) 培養体の茎端を培養した場合：茎端の生長は培養開始2週間後にみられ、大部分の茎端が伸長した。一方、根の分化は、培養1か月後から茎端の基部において始まった。分化した根には、白色で通常の根と同じいわゆる白色根と、半透明でやや柔らかな根いわゆる半透明根の2種類があった。両方の根を含めた場合の根を分化した組織片の割合はFig. 46に示したとおりで、IBA 10⁻⁶MおよびBA 10⁻⁷Mを組み合わせて添加した区およびNAA 10⁻⁶M単用の区において約60%と最も高く、ついでIBA 10⁻⁷または10⁻⁶M単用の区ならびにNAA 10⁻⁷M単用の区であった。

植物体再生には'半透明根'よりも'白色根'の方が適しているので、白色根を分化した組織片の割合についてみるとFig. 46に示したとおりで、IBA 10⁻⁶MとBA 10⁻⁷Mとを組み合わせて添加した区において最も高く約40%で、ついでIBA 10⁻⁷Mまたは10⁻⁶M単用の区において高かった。オーキシンとしてIBAを用いた場合の方がNAAを用いた場合に比べ、BAとの組合せ添加または単用の別によらず、白色根の分化率が概して高かった。なお、'白色根'を分化した茎頂は鉢上げする

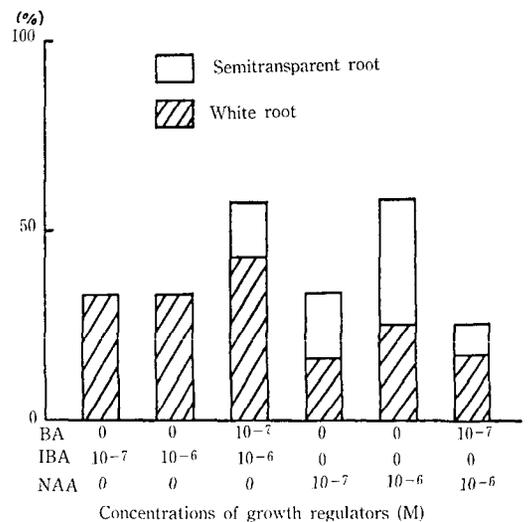


Fig. 46. Percentage of apices forming roots in culturing apices excised from the stock shoots of 'MM-1' after 12 weeks of culture.

ことにより大部分が完全な植物体となった。

培養体の茎の節部切片を培養した場合、培養1週間後に節部から茎が分化し始め、4~5週間後には根の分化が始まった。茎の分化は大部分の組織片においてみられたが、根を分化した組織片の割合は茎端を培養した場合のそれよりもやや低かった。また、節部切片を培養した場合には、茎と白色根とを形成した培養体は、鉢上げすると、ほとんどすべてのものが基部に地下茎先端部の鱗芽群に相当するものを形成し完全な植物体となった。

この実験では、茎端および節部切片のいずれを培養した場合においてもすべての区においてカルス形成がみられ、MM-1はカルスを形成しやすい系統と考えられた。なお、再生した植物の染色体数について観察したところ、茎端または節部切片のいずれから再生した植物もすべて2倍体 ($2n=20$) であった。

第3章第1, 2節で述べたように、培養体の茎からとった茎端を培養した場合、良好な茎の発生は $IBA 5 \times 10^{-7} \sim 10^{-5} M$ または $NAA 5 \times 10^{-7} \sim 10^{-5} M$ を添加した場合にみられ、根を分化した組織片の割合は $IBA 10^{-6} \sim 10^{-5} M$ または $NAA 5 \times 10^{-7} \sim 10^{-5} M$ を添加した場合に比較的高かった。また、根を分化した組織片の割合については、概して茎端を培養した場合の方が節部切片を培養した場合より高かったが、このような結果は、他の報告^{9,19,23,28})と同様であった。このように組織培養法による超雄株 MM-1 の栄養繁殖が可能であり現在この方法を用いて実際に超雄株の栄養繁殖を継続中である。なお、これらの増殖個体はすべて先に述べた染色体数、外部形態、着花性、開花期その他の形質においても特に目立った変異は認められず、花粉親として十分利用できる個体であった。

第5章 総合考察

本研究結果の細部についての考察はそれぞれの項において述べたので、ここでは本研究における特徴的な事項について総括的に述べることにする。これまで行われてきたアスパラガスの組織培養においては、実用面における大量増殖を目的として行われたものが多く^{5,7,19,20,43,47})地上部の栄養器官とくに若茎の一部分が材料として用いられてきた。

本研究では、より広い観点からアスパラガスの植物体の各組織。器官について培養を行い、それに関与している条件について検討を加えておく必要があると考え、次のようなものを培養した。すなわち、幼植物として実生を用い、その節部および節間部茎切片、成植物体では、

若茎の頭部における小側枝または茎頂、また培養過程において得られた培養体の茎頂および茎節部切片の培養も行った。

まず、茎葉の形成について特徴的なことは、実生茎切片の培養において、暗所で培養した実生から取った節を有する切片を培養したとき、節部から発生する茎の数は、暗所培養の場合よりも明所培養の場合においてはるかに多かったことである。これは、実生ができるまでの過程における光の有無ならびに、それからとった切片の培養過程における光の有無が器官形成に及ぼす影響を及ぼすかについて検討を加える必要があることを示唆するものと考えられる。

つぎに、若茎頭部小側枝の茎頂を培養した場合に、茎頂の発育および根の分化がみられ幼植物を再生させることができた。近年、アスパラガスにおいてもウイルス病が注目され始め、無ウイルス個体の作出については、YANG ら⁸¹)が若茎茎頂の培養を行ない、無ウイルス個体を得ているが、本研究で取り上げた若茎小側枝茎頂の培養は、若茎そのものの茎頂ではなく、若茎頭部小側枝の茎頂を培養するもので、1本の若茎の頭部から20~30個取ることができ、能率よく無ウイルス個体を作成する方法として利用できる点で極めて優れている。

アスパラガスの完全植物体の再生においては、地下茎と鱗芽群が重要な意味をもっている。YANG²³)らは鉢植えにしたアスパラガス若齢植物の茎の下部節に aerial crown を形成させることに成功している。このことは、アスパラガス植物体の各部位における crown 形成の能力を知る上で意義があり興味深い。

本研究のアスパラガス組織の培養における crown の形成については、節を有する切片を培養した場合に容易であり、特に、極く若い実生の茎節部切片の培養において明所培養、生長調節物質無添加または低濃度添加の場合に貯蔵根様白色根の発生が多くみられ crown の形成が顕著であった。また、培養体から発生した茎の節部切片を培養した場合について、実生の茎節部切片を培養した場合と比較すると、茎の発生についてはそれほど大きな差は認められなかったが、貯蔵根様の根の発生は前者において劣っていることが観察された。

このことは、実生の茎の節部と、いったん生体外で培養された培養体に発生した茎のそれとにおける crown 形成能の違いによると考えられ、今後の crown の形成に関する研究について示唆を与えるものと思われる。

つぎに、本研究で得られた結果から実用可能な利用面について考察することとする。アスパラガスにおいては

同一品種内においても株によって収量・品質などにかなり大きな違いがある。このため、これらのうち特に優良な形質を有する株から栄養繁殖法によって大量の栄養系を増殖し、実際の栽培圃場において栽植することができれば、栽培上の効用は極めて大きいと考えられる。

アスパラガスの無性繁殖法としては、これまで株分けによる方法が用いられてきたが、この方法では1個体の元の株から一度に得られる個体数は数株程度であること、ならびに地下茎の切断部から土壌病菌が入りやすく、それがその後の病害発生の原因となるなど難点が多い。このようなことからこれまでアスパラガスの栄養繁殖を目的とした組織培養に関する各種の研究が行われてきたが、現在のところ実用化には至っていない。

本研究では、アスパラガスの各部位からの器官形成が可能であり、多段的に培養を行うことにより、能率よくかなり多数の植物体再生が可能となった。これは、実験的にはもちろん実用面においても充分役立つものであって、得られた知見は、今後のアスパラガスの大量増殖技術確立のための基礎資料として大きな意義をもつものと考えられる。さらに、得られた知見を実際に応用した結果、第5章において述べたように、超雄株の組織を生体外で培養することによって栄養繁殖が可能となり、栽培上有利な雄性系植物の短期間大量採種のために効果的に活用できることが確認できた。

また、本研究の結果を実際面に利用した別の例として、優良な品種中の代表的な1株から約250株の栄養系を得て、これを砂耕法によるアスパラガスの肥料・栄養に関する試験の材料として用いたものがある。すなわち、アスパラガスにおいては、前述のように個体間差が大きく不斉であるため、通常の子孫繁殖によって得られた個体を用いる肥料試験においてはその遂行が極めて困難であった。しかし、本研究の結果として得られた栄養系を使用したことにより成果が確実なものとなった。このことは、アスパラガスに関する今後の各種の研究に栄養系を用いることが可能であり、その成果が期待できることを実証したといえることができる。

本研究で得られた知見を応用して進めた他の一つの例として凍結保存に関する実験をあげることができる。すなわち、アスパラガス若茎小側枝の茎端部を第5章に述べた方法で処理した後、液体窒素中で凍結し、これを融解したのち、茎端培養を行ったところ、80~100%という極めて高い生存率が得られ、これらの茎端はやがて完全な植物体を再生した。この結果から、植物体の一部を液体窒素中で-196°Cまで冷却して凍結し、融解したの

ち完全な植物体に再生させた数少ない成功例の一つにアスパラガスを加えることができるとともに、アスパラガスの有用遺伝子源の凍結保存法を確立し得ることが明らかとなった。

本研究によって得られた結果および研究の意図は、アスパラガスにおける今後の研究の進展ならびに栽培面における実用的な技術の確立に寄与するものと考えられる。

第8章 摘 要

本研究において得られた結果の概要について述べると以下のとおりである。なお、培養条件については、特に記さない場合は、25°C、4,000 lx (16時間日長)、寒天固形培地 (pH 5.5) とした。

1. 実生の第1次茎節部切片を、MS培地、シュクロース2%、およびNAA 0, 0.001, 0.01, 0.1, 1.0および10.0 mg/lを含む寒天固形培地を用いて明所および暗所で培養した。結果の要約は次のとおりである。

(1) 茎は節部から直接伸長し、茎発生組織片率は、生長調節物質無添加またはNAA低濃度添加の場合に、明所および暗所のいずれにおいても90~100%であった。茎数は、暗所でNAA 0.1 mg/lおよびBA 0.1 mg/lを含む場合に多かった。茎の長さは、明所でNAA 0.001 mg/lの場合および暗所でNAA 0.01 mg/lの場合に大であった。明所および暗所のいずれにおいても、BAを高濃度で添加すると茎が太くなる傾向がみられた。

(2) 根には二つの種類があった。すなわち、一つは節部から直接的に分化する白色で貯蔵根様の長い根であり、他はカルスから再分化する半透明で短い根であった。前者は明所で生長調節物質無添加または低濃度添加の場合にみられ、後者は明所および暗所のいずれにおいてもNAA 0.01~1.0 mg/lおよびBA 1.0 mg/lのときに認められた。

(3) カルス形成率は、NAA 0.1~10.0 mg/lとBAとが共存している場合に高く、90~100%であった。カルスはBA単用の場合にも形成された。

(4) 節をもつ茎切片を培養した場合においては、節部より茎が発生するとともに貯蔵根様の白色根を分化したものは、容易にcrownを形成し完全な植物体となった。

2. 実生の第1次茎からとった長さ約1 cmの節間部組織をMS培地により、25°C、暗所で培養した場合の結果の要約は次のとおりである。

(1) カルスの良好な生長はNAAとBAの両方が添加されたとき、または、NAA単用のときに認められた。

この場合、カルスの生長に対する NAA の至適濃度は、培地に BA が添加されているか否かによって異なり、BA 無添加の場合には NAA 0.1 mg/ℓ、BA を 0.1~10.0 mg/ℓ の範囲で添加した場合には NAA 1.0 mg/ℓ でカルスの生長が最も良好であった。

(2) 根は BA 低濃度 (0, 0.1 mg/ℓ), NAA 0.1 および 1.0 mg/ℓ で分化が良好であった。根の分化率は BA 無添加の場合には NAA 0.1 mg/ℓ で最も高く、BA 0.1 mg/ℓ の場合は NAA 1.0 mg/ℓ で最高であった。

(3) 茎は、暗所では BA と NAA がともに 0.1 および 1.0 mg/ℓ の区で分化が良好であった。明所では BA 0.1~10.0 mg/ℓ と、NAA 0.1 ならびに NAA 1.0 mg/ℓ の範囲で分化率が高かった。NAA の至適濃度は BA の濃度によらず 1.0 mg/ℓ であった。

(4) 本試験においてはオーキシンとして NAA を用いたが、2,4-D を用いた場合より根および茎の分化率が高かった。

(5) カルスから根および茎の両方を分化し、幼植物の再分化率の最も高かったのは BA 0.1 mg/ℓ+NAA 1.0 mg/ℓ の区であった。

(6) 明所と暗所とで培養した結果の比較では、明所でのみ BA 10 mg/ℓ の区にも茎の分化がみられたほかは、カルスの生長、器官の分化に大きな差は認められなかった。

3. 培地に添加した糖の影響について調べるため、MS 培地に NAA 1.0 mg/ℓ, BA 0.1 mg/ℓ およびシュクロース、グルコース、フラクトースの3種の糖を 0, 2, 4, 8, 16% で添加した寒天固形培地を用いて実生の茎節部切片を培養した場合の結果の要約は次のとおりである。

(1) いずれの糖においても 1~4% のとき、カルス形成率は 90~100% で高かった。また、糖濃度 8% までは、濃度が高くなるにつれて、形成率も高くなったが、16% ではカルスの形成はほとんど認められなかった。

(2) カルスの生長は、いずれの糖においても 2~4% のとき良好であったが、1, 8 および 16% では劣った。カルスの生長については、3種の糖の間に差が認められた。

(3) 茎分化率および茎数については、いずれの糖においても 2% のとき最も大きかった。茎の分化については3種の糖の間に特に大きな差は認められなかった。

(4) 根分化率および根の数は、いずれの糖においても 4% のとき最も高く、根の分化に至適な糖濃度は茎の分化のそれよりも高かった。分化した根は糖濃度が低い場合には半透明で細く短いものであったが、糖濃度が高い

場合には、たくて長い貯蔵根様の根であった。

4. 実生節間部切片および若茎柔組織切片を培養した場合の pH の影響について調べた結果、いずれの場合においても pH の至適範囲はかなり広いことがわかった。カルス形成は pH 3.0~8.0、根の分化は pH 3.0~6.5、茎の分化は pH 3.0~6.0 でみられた。

5. 実生の第1次茎節間部切片を、MS 培地を基本としシュクロース 2%, NAA および BA を単独でまたは組み合わせて添加した液体培地を用いて 3, 7 および 14 日間培養したのち、生長調節物質を除去した寒天固形培地に移植した。結果の要約はつぎのとおりである。

(1) カルス形成は、NAA 0.1~10.0 mg/ℓ を含む区において観察された。移植の効果は認められず、無移植の区においてカルスの生長が最も良好であった。カルスの生長は、いずれの区においても BA 1.0 mg/ℓ, NAA 1.0 mg/ℓ のとき最も良好であった。

(2) 根の再分化は、カルスを形成したすべての区においてみられたが、根分化率は、NAA および BA の有無と密接な関連があることが認められた。移植の効果は、移植前の培地に含まれる BA および NAA と関連があった。BA 1.0 mg/ℓ+NAA 10.0 mg/ℓ を含む培地で 3 日間前培養を行ったのち移植した区、同じく BA 1.0 mg/ℓ+NAA 1.0 mg/ℓ で 14 日間培養を行った区、および NAA 0.1 mg/ℓ 単用で移植を行わずに培養した区において根分化率は高かった。

(3) 茎の再分化は、BA 1.0 または 10.0 mg/ℓ および NAA 1.0 mg/ℓ を含む液体培地で 14 日間培養したのち移植した場合に最も良好であった。また、茎と根とを分化したものの割合は、BA 1.0 mg/ℓ および NAA 1.0 mg/ℓ を含む培地で 14 日間培養したのち移植した場合に最も高かった。

6. 若茎頭部小側枝、小側枝の茎頂の2種の組織片を無菌的に培養した。

培地は、MS 培地にシュクロース 0.1 M、生長調節物質 (オーキシンとして NAA, IBA, 2,4-D および 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% を添加したもので、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 2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。

(2) 茎が発育し根も分化したものの割合は、頭部小側枝の茎頂を培養した場合に最も高かった。

(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、多段的に培養を繰り返して栄養系を増殖する場合の最初の材料として有効である。

(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作用がみられることもあった。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、培養体の生存率が高くなり、茎の発生も良好となった。BA が高濃度 (10^{-5} M 以上) の場合には茎の伸長が抑制されて太くなり、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認められなかった。また、光の強さについては、茎頂部組織の培養で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。

7. 若茎頭部の小側枝を培養して得た培養体の茎の茎頂部および節部切片を培養し、器官形成に及ぼす生長調節物質、組織片の大きさ、移植の影響などについて検討した。

結果の要約は次のとおりである。

(1) 0.5 mm の茎頂を培養した結果では、IBA 5×10^{-7} ~ 10^{-5} M, NAA 5×10^{-7} ~ 10^{-6} M の範囲で茎の発育が良好であり、根の分化は IBA 10^{-6} ~ 10^{-5} M, NAA 5×10^{-7} ~ 10^{-5} M で良好であった。

(2) 茎頂組織片の大きさについての比較では、茎の発育は組織片が大きい場合にわずかに良好であったが、根の分化は組織片の小さい区で良好であった。

(3) 節部切片の培養においては、生長調節物質 (BA, IBA) を含む液体培地に浸漬してから固形培地に移植した場合に移植の効果が認められた。これらのうち、根の分化率の最も高かったのは BA 10^{-6} M と IBA 10^{-5} M を含む液体培地に 7 日間浸漬したのち、生長調節物質を除いた固形培地に移植した区であった。

(4) 節部切片を BA と NAA を含む液体培地に浸漬処理した後、生長調節物質を除いた固形培地に移植した場合でも、全般を通じて移植区の根の分化率が高かった。なお、茎と根の両方を分化した組織片の割合が 50% 以上に達したのは BA 10^{-6} M, NAA 10^{-5} M に 14 日間

浸漬した区と BA 10^{-5} M, NAA 5×10^{-5} M に 3 日, 7 日, 14 日間浸漬した区であった。

(5) 若茎頭部の小側枝を培養して得た培養体の茎の茎頂部および節部切片を培養すると植物体が再生した。これにより、若茎の組織を出発点として、得られた培養体の一部を材料とする生体外培養を繰り返すことにより、栄養系を増やすことが可能であることがわかった。

8. 若茎頭部小側枝の茎端を液体窒素中で凍結し、その生存について検討した。

(1) DMSO 処理 (凍結媒液中) は濃度 12~16%, 3°C, 120 分間浸漬の条件が適当であった。

(2) 予備凍結は、凍結媒液中の DMSO 濃度を 16% とし、 0.5° ~ 1.0° C/min で -30° C 以下まで行うのが適当で、100% の生存率が得られた。

(3) 生存していた小側枝から完全な植物体が再生し、アスパラガスの有用遺伝子源を液体窒素中で凍結保存し得ることが実証された。

9. 超雄株の栄養繁殖の可能性について検討するため、頭部小側枝を培養して発生させた培養体の茎の切片を材料として培養を行った。培地は、MS 培地、シュクロース 2%, 生長調節物質 (BA, IBA, NAA) を含む寒天固形培地を用いた。

(1) 茎頂を培養した場合には、茎を形成し白色根を分化したものの割合は、BA 10^{-7} M および IBA 10^{-6} M を含む場合か、または NAA 10^{-6} M 単用の場合に高く約 40% であった。

(2) 節部切片を培養した場合には、茎および根を分化したものの割合は、茎頂の場合よりも低かったが、それらはすべて植物体にまで生長した。

(3) 本実験の結果から、さらに各種条件を検討すれば、組織培養法によって超雄株を増殖することが可能になるものと考えられる。

以上のように、本研究によって、アスパラガス植物体の各部位の生体外培養を行うことにより器官形成が可能であり、その結果をアスパラガスにおける有用遺伝子源の凍結保存ならびに超雄株の栄養繁殖に利用し得ることが実証された。さらに、本研究における培養系は、アスパラガスに関するより広い研究領域において有効に利用し得ることが示唆された。

引用文献

1. TAKATORI, F. H., MURASHIGE, T. and STILLMAN, J. I.: Tissue culture of asparagus plants. *Calif. Agr.* 21(8): 8-9. 1967

2. TAKATORI, F. H., MURASHIGE, T. and STILLMAN, J. I.: Vegetative propagation of asparagus through tissue culture. *HortScience* 3: 20-22. 1968
3. 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
4. CHIN, C. K.: Promotion of shoot and root formation in asparagus *in vitro* by ancymidol. *HortScience* 17: 590-591. 1982
5. DORÉ, C.: La multiplication clonale de l'asperge (*Asparagus officinalis* L.) par culture *in vitro*: son utilisation en sélection. *Ann. Amélior. plantes* 25: 201-224. 1975
6. FONNESBECH, M., FONNESBECH, A. and BREDMOSE, N.: Development of asparagus plumosus shoot tips grown *in vitro*. *Physiol. Plant.* 40: 73-76. 1974
7. GORTER, C. J.: Vegetative propagation of *Asparagus officinalis* by cuttings. *J. Hort. Sci.* 40: 177-179. 1965
8. 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
9. LOO, S. W.: Further experiments on the culture of excised asparagus stem tips *in vitro*. *Amer. J. Bot.* 33: 156-159. 1946
10. MATSUBARA, S. and CLORE, W. J.: Vegetative propagation of asparagus from lateral buds. *Sci. Rep. Fac. Agric. Okayama Univ.* 43: 19-26. 1974
11. 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
12. STEWARD, F. C. and MAPES, M. O.: Morphogenesis and plant propagation in aseptic cultures of asparagus. *Bot. Gaz.* 132: 70-79. 1971
13. YANG, Hsu-Jen and CLORE, W. J.: Rapid vegetative propagation of asparagus through lateral bud culture. *HortScience* 8: 141-142. 1973
14. 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
15. GASPAR, T. and HOOF, P. Van: Application of a test for peroxidase in the choice of asparagus plants for *in vitro* propagation. *Revue de l'Agriculture* 29(3): 583-592. 1976
16. GOLDSTEIN, L. D., JENNINGS, P. H. and MARSH, H. V. Jr.: L-Phenylalanine ammonia-lyase activity in asparagus spears: effects of excision and incubation. *Plant Cell Physiol.* 13(5): 783-793. 1972
17. HOOF, P. Van and GASPAR, T.: Peroxidase and isoperoxidase changes in relation to root initiation of asparagus cultured *in vitro*. *Scientia Horticulturae* 4(1): 27-31. 1976
18. MURASHIGE, T. and SKOOG, F.: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497. 1962
19. YANG, Hsu-Jen and CLORE, W. J.: Development of complete plantlets from moderately vigorous asparagus shoots of stock plants *in vitro*. *HortScience* 9: 138-140. 1974
20. YANG, Hsu-Jen and CLORE, W. J.: *In vitro* reproductiveness of asparagus stem segments with branch shoots at a node. *HortScience* 10: 411-412. 1975
21. KATSUMI, M.: Physiological effects of kinetin effect on the thickening of etiolated pea stem sections. *Physiol. Plant.* 15: 115-121. 1962
22. KODA, Y. and OKAZAWA, Y.: Cytokinin production by asparagus shoot apex cultured *in vitro*. *Physiol. Plant.* 49: 193-197. 1980
23. YANG, Hsu-Jen and CLORE, W. J.: Induction of aerial crowns in *Asparagus officinalis* L. by Kinetin-NAA treatment. *HortScience* 8: 490-491. 1973
24. SKOOG, F. and MILLER, C. O.: Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 11: 118-131. 1975
25. LEE, T. T. and SKOOG, F.: Effects of substituted phenols on bud formation and growth of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 18: 386-402. 1965

26. STEWARD, F. C., MAPES, M. O. and SMITH, J.: Growth and organized development of cultured cells. I. Growth and division of freely suspended cells. *Amer. J. Bot.* **45**: 693-703. 1958
27. STEWARD, F. C.: Growth and organized development of cultured cells. III. Interpretations of the growth from free cell to carrot plant. *Amer. J. Bot.* **45**: 709-713. 1958
28. HAMZI, H. Q. and SKOOG, F.: Kinetin-like growth-promoting activity of 1-substituted adenines 1-benzyl-6-aminopurine and 1-(dimethylallyl)-6-aminopurine. *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A.* **51**: 76-83. 1964
29. KATO, Y.: Physiological and morphogenetic studies of fern gametophyte by aseptic culture. III. Growth and differentiation of single cells isolated from callus tissues of *Pteris vittata*. *Cytologia* **29**: 79-85. 1964
30. KATO, Y.: Physiological and morphogenetic studies of fern gametophytes and sporophytes in aseptic culture. IV. Controlled differentiation in leaf callus tissues. *Cytologia* **30**: 67-74. 1965
31. LINSMAIER, E. M. and SKOOG, F.: Organic growth factor requirements of tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* **18**: 100-127. 1965
32. 西 貞夫, 大沢勝次, 豊田 努: やく培養の利用に関する研究 (第4報) 各種そ菜やくカルスからの幼植物の分化について. *育学雑* **20** 別冊 2: 58-59: 1970
33. WILMAR, C. and HELLENDOORN, M.: Growth and morphogenesis of asparagus cells cultured *in vitro*. *Nature* **217**: 369-370. 1968
34. 山田康之: 植物組織における分化系. *生物物理* **6**: 23-31. 1966
35. 多賀辰義, 岩淵晴郎, 山吹一芳, 佐藤滋樹: アスパラガスの生産に及ぼす環境要因の解析 (第1報) 若茎収穫期間の長短と貯蔵根中の炭水化物濃度及び収量. *北海道立農試集報* **43**: 63-71. 1980
36. SHIOMI, N., YAMADA, J. and IZAWA, M.: Isolation and identification of fructooligosaccharides in roots of asparagus (*Asparagus officinalis* L.). *Agr. Biol. Chem.* **40**: 567-575. 1976
37. SHIOMI, N., YAMADA, J. and IZAWA, M.: A novel pentasaccharide in the roots of asparagus (*Asparagus officinalis* L.). *Agric. Biol. Chem.* **43**: 1375-1377. 1976
38. 澤田英吉: アスパラガス. 誠文堂新光社 41-42. 1962
39. 八鍬利郎, 原田 隆, 稲垣 昇: 園芸作物のやく培養に関する研究 (第1報) アスパラガスのやく培養におけるカルス誘導と器官分化. *園学雑* **41**: 272-280. 1972
40. 八鍬利郎, 原田 隆, 黒崎利明: 園芸植物の栄養繁殖に関する基礎的研究 (第1報) 組織培養におけるブドウ新梢組織片からのカルス形成と発根. *北大農邦文紀* **8**: 397-403. 1973
41. 八鍬利郎, 原田 隆, 半沢光子: 園芸植物の栄養繁殖に関する基礎的研究 (第2報) トマト組織片からのカルスおよび器官の形成におよぼす生長調節物質の影響. *北大農邦文紀* **9**: 25-41. 1973
42. 稲垣 昇, 原田 隆, 八鍬利郎: 園芸作物のやく培養に関する研究 (第2報) アスパラガスのやくからのカルス誘導について (1). *園学雑* **49**: 71-78. 1980
43. GREINER, H. D.: Vegetative Vermehrung von Spargel (*Asparagus officinalis* L.) durch die Kultur von Sproßspitzen. *Gartenbauwissenschaft* **39**: 549-554. 1974
44. 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
45. 入谷正樹, 原田 隆, 八鍬利郎: 園芸植物の栄養繁殖に関する基礎的研究 (第3報) ニンジンの組織培養におけるカルスならびに器官形成. *北大農邦文紀* **12**: 281-291. 1981
46. LOO, S. W.: Cultivation of excised stem tips of asparagus *in vitro*. *Amer. J. Bot.* **32**: 13-17. 1945
47. GALSTON, A. W.: On the physiology of root initiation in excised asparagus stem tips. *Amer. J. Bot.* **35**: 281-287. 1948
48. 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
49. GAUTHERET, R. J.: Factors affecting differentiation of plant tissues grown *in vitro*. In "Cell differentiation and morphogenesis." North-Holland Pub. Co. Amsterdam: 55-95. 1966
50. STRAUS, J. and LARUE, C. D.: Maze endosperm tissue grown *in vitro*. I. Culture requirements. *Amer. J. Bot.* **41**: 687-694. 1954
51. TABATA, T. and MOTOYOSHI, F.: Hereditary

- control of callus formation in maize endosperm cultured *in vitro*. *Jap. J. Genetics* **40**: 343-355. 1965
52. CAREW, D. P. and SCHWARTING, A. E.: Production of rye embryo callus. *Bot. Gaz.* **119**: 237-239. 1958
53. NORSTOG, K. J.: Growth of rye-grass endosperm *in vitro*. *Bot. Gaz.* **117**: 253-259. 1956
54. OKAZAWA, Y., KATSURA, N. and TAGAWA, T.: Effects of auxin and kinetin on the development and differentiation of potato tissue cultured *in vitro*. *Physiol. Plant.* **20**: 862-869. 1967
55. STEINHART, C. E.: Tissue culture of a cactus. *Science* **137**: 545-546. 1962
56. STRAUS, J.: Maize endosperm tissue grown *in vitro*. III. Development of a synthetic medium. *Amer. J. Bot.* **47**: 641-647. 1960
57. TULECKE, W.: Arginine-requiring strains of tissue obtained from ginkgo pollen. *Plant. Physiol.* **35**: 19-24. 1960
58. WEST, F. R. and MIKA, E. S.: Synthesis of atropine by isolated roots and root-callus cultures of belladonna. *Bot. Gaz.* **119**: 50-54. 1957
59. 山田康之: 植物におけるカルス誘導と組織培養. 植物の化学調節 **2**(1): 7-14. 1967
60. WEI-YAN, Z. and XIN-FA, M.: A study on the propagation of asparagus clones from explanted axillary buds. *Acta Agri. Univ. Pekinensis* **7**: 89-94. 1981
61. SAKAI, A., YAMAKAWA, M., SAKATA, D., HARADA, T. and YAKUWA, T.: Development of a whole plant from an excised strawberry runner apex frozen to -196°C . *Low Temp. Sci.* **B36**: 31-38. 1978
62. UEMURA, M. and SAKAI, A.: Survival of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) shoot apices frozen to the temperature of liquid nitrogen. *Plant & Cell Physiol* **21**: 85-94. 1980
63. SAKAI, A.: Survival of plant tissue at super-low temperatures. IV. Cell survival with rapid cooling and rewarming. *Plant Physiol.* **41**: 1050-1054. 1966
64. SAKAI, A.: Some factors contributing to the survival of rapidly cooled plant cells. *Cryobiology* **8**: 225-234. 1971
65. ANDERSON, J. D. and MC DANIEL, R. G.: Low temperature preservation of carnation meristems. Abst. in 1979 ASHS annual meeting. *HortScience* **14**: 423. 1979
66. FINKLE, B. J. and ULRICH, J. M.: Effects of cryoprotectants in combination on the survival of frozen sugarcane cells. *Plant Physiol.* **63**: 598-604. 1979
67. NAG, K. K. and STREET, H. E.: Freeze preservation of cultured plant cells. I. The pretreatment phase. *Physiol. Plant.* **34**: 254-260. 1975
68. SAKAI, A. and SUGAWARA, Y.: Survival of plant germplasm in liquid nitrogen. In *plant Cold Hardiness and Freezing Stress* (LI, P. H. and A. SAKAI eds.) *Academic Press N. Y.*: 345-359. 1978
69. WITHERS, L. A.: Freeze preservation of somatic embryos and clonal plantlets of carrot (*Daucus carota* L.). *Plant Physiol.* **63**: 460-467. 1979
70. WITHERS, L. A. and KING, P. J.: Proline: A novel cryoprotectant for the freeze preservation of cultured cells of *Zea mays* L. *Plant Physiol.* **64**: 675-678. 1979
71. SEIBERT, M.: Shoot initiation from carnation shoot apices frozen to -196°C . *Science* **191**: 1178-1179. 1976
72. SEIBERT, M. and WETHERBEE, P. J.: Increased survival and differentiation of frozen herbaceous plant organ cultures through cold treatment. *Plant Physiol.* **59**: 1043-1046. 1977
73. KARTHA, K. K., LEUNG, N. L. and GAMBORY, O. L.: Freeze-preservation of pea meristems in liquid nitrogen and subsequent plant regeneration. *Plant Sci. Lett.* **15**: 7-15. 1979
74. KARTHA, K. K., LEUNG, N. L. and PAHL, K.: Cryopreservation of strawberry meristems and mass propagation of plantlets. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **105**: 481-484. 1980
75. BAJAJ, Y. P. S.: Regeneration of plants from potato meristems freeze-preserved for 24 months. *Euphytica* **30**: 141-145. 1981
76. GROUT, B. W. W. and HENSHAW, G. G.: Freeze-preservation of potato shoot-tip cultures. *Ann. Bot.* **42**: 1227-1229. 1978
77. GROUT, B. W. W. and HENSHAW, G. G.: Structural observations on the growth of potato shoot-tip cultures after thawing from liquid nitrogen. *Ann. Bot.* **46**: 243-248. 1980
78. TOWILL, L. E.: *Solanum tuberosum*: A model for studying the cryobiology of shoot-tips in

- the tuber-bearing *Solanum* Species. *Plant Sci. Letters* 20: 315-324. 1981
79. GROUT, B. W. W., WESTCOTT, R. J. and HENSHAW, G. G.: Survival of shoot meristems of tomato seedlings frozen in liquid nitrogen. *Cryobiology* 15: 478-483. 1978
80. 澤田英吉, 田村 勉, 八鍬利郎, 原田 隆, 今河 茂, 山本茂雄, 佐藤滋樹, 山吹一芳: アスパラガスにおける雌性系統の育成に関する研究(第1報) 超雌株(MM)の選抜と雌性系統の試作について. 北大農附属農場研究報告 23: 41-49. 1983
81. YANG, HSU-JEN and CLORE, W. J.: Obtaining virus free plants of *Asparagus officinalis* L. by culturing shoot tips and apical meristem. *HortScience* 11: 474-475. 1976

Summary

Studies on organogenesis of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) tissues and its utilization were carried out through *in vitro* culture of various kinds of tissues. In all experiments, the *in vitro* cultures were practiced uniformly on a agar-solidified medium under conditions of 25°C, 4,000 lx (16-hour day length) and pH 5.5. Results of the experiments are as follows.

1. Segments with a node, excised from a primary shoots of seedlings, were cultured on a agar-solidified medium containing MS medium 2% sucrose, 0, 0.001, 0.01, 0.1, 1.0 and 10.0 mg/ℓ NAA in the light or dark. Results obtained are summarized as follows: (1) All shoots emerged on the nodes. On the media without growth regulators and with low concentrations of NAA, rates of segments developing shoots were 90 to 100% in both the light and the dark. Numbers of shoots formed were comparatively large with 0.1 mg/ℓ NAA combined with 0.1 mg/ℓ BA. An average shoot length was large at 0.001 mg/ℓ of NAA in the light, and at 0.01 mg/ℓ of NAA in the dark. High concentrations of BA increased shoot thickness in both the light and the dark. (2) Two kinds of roots were differentiated: one was a white, long and storage root-like root on a node; the other was a semitransparent root redifferentiated on a callus. The former was observed at none or low concentrations of growth regulators in the light, while the latter was seen with 0.01-1.0 mg/ℓ NAA combined with 1.0 mg/ℓ BA in both the light and the dark. (3) Additions of 0.1-10.0 mg/ℓ NAA with

BA gave high shoot formation rates (90-100%). Callus formation was induced by additions of BA alone. (4) In the culture of shoot segments with a node, shoots emerged from the node, and the cultures with a storage root-like root made a crown to became an intact plant.

2. Results in culturing internodal segments (1 cm in length) of seedling first shoots on agar-solidified media containing MS medium and growth regulators at 25°C in the dark are as follows: (1) The combined additions of NAA and BA and a single addition of NAA enhanced vigorous callus growth. In this case, an optimal concentration of NAA for callus growth was determined depending on whether BA was added to the media or not. A single addition of 0.1 mg/ℓ NAA or combined additions of 0.1-10.0 mg/ℓ BA and 1.0 mg/ℓ NAA give rise to vigorous callus formation. (2) Root differentiation was good, when none and low concentrations (0, 0.1 mg/ℓ) of BA were added in combination with 0.1 or 1.0 mg/ℓ of NAA. Root differentiation rates were the highest at 0.1 mg/ℓ of NAA combined with no BA, and at 1.0 mg/ℓ of NAA with 0.1 mg/ℓ of BA. (3) Rates of the cultures that differentiated shoots were high at 0.1 and 1.0 mg/ℓ of both BA and NAA in the dark, and at 0.1-10.0 mg/ℓ of BA combined with 0.1 or 1.0 mg/ℓ of NAA in the light. The optimal concentration of NAA was 1.0 mg/ℓ regardless of BA concentrations. (4) In this experiment, rates of cultures with roots were higher with NAA than with 2,4-D. (5) Both roots and shoots redifferentiated on the calluses. The highest rate of cultures developing plantlets was obtained at 0.1 mg/ℓ of BA and 1.0 mg/ℓ of NAA. (6) When results of the experiment in the light were compared with those of the experiment in the dark, hardly any differences existed in callus growth and organ formation, except that only in the cultures in the light, shoot formation was observed at 10.0 mg/ℓ of BA.

3. To examine the effect of sugar added to media, nodal segments excised from seedling shoots were cultured on agar-solidified media containing MS medium, 1.0 mg/ℓ NAA, 0.1 mg/ℓ BA and 0, 2, 4, 8 and 16% of sugars (sucrose, glucose and fructose). Results obtained are as follows: (1) One to four percents of the three kinds of sugars gave the highest percentage (90-100%) of

segments with callus. Within the range of 0-8% of the sugars, the percentages of segments producing calluses increased with the increase of the sugar concentrations. Callus formation was slightly observed at 16% of the sugars. (2) Callus growth was vigorous at 2-4% of the concentrations of each sugar used, and showed a decline at 1, 8, and 16% of it. Differences in callus growth were recognized among the three sugars. (3) Two percent of the each sugar gave the highest rate of shoot-differentiating cultures, and the largest average shoot number per culture. Shoot differentiation showed hardly any differences among the three sugars. (4) Differentiation rates and average number of the roots were the highest at 4% of the sugars, and an optimal concentration of the sugar for root differentiation were higher than those for shoot differentiation. Semitransparent, thin and short roots differentiated at low concentrations of the sugars, while thick and long roots emerged at high concentrations of the sugars.

4. Experiments, which examined the effects of varying pH in culturing the internodal segments of seedling shoots and the disk-shaped pith tissues of spears, showed that in case of the two kinds of plant materials, a range of optimal pH was considerably wide. Callus formation was observed at pH 3.0-8.0; root differentiation, at pH 3.0-6.5; shoot differentiation, at pH 3.0-6.0.

5. Internodal segments of the first shoot of seedlings were aseptically cultured in a liquid medium containing MS medium, 2% sucrose, single or combined NAA and BA for 3, 7, and 14 days, and were transferred onto agar-solidified media without growth regulators. Results are as follows: (1) Callus formation was observed in treatments with 0.1-10.0 mg/ℓ NAA. An enhancing of the effect of transfer on callus growth were not recognized, because callus growth was best in a treatment without transfer. Callus grew most vigorously with 1.0 mg/ℓ BA and 1.0 mg/ℓ NAA. (2) Root redifferentiation was induced in all treatments with callus formation, and rates of cultures with roots related closely to the presence or absence of NAA and BA. The enhancing effects of the transfer on root differentiation depended on the presence or absence of BA and NAA in the media of primary cultures. Rates of cultures with roots were high in the following three treatments: the

transfer after 3-day culture on media with 1.0 mg/ℓ BA and 10.0 mg/ℓ NAA, the transfer after 14-day culture with 1.0 mg/ℓ BA and 1.0 mg/ℓ NAA, the continuous culture with 0.1 mg/ℓ NAA alone. (3) Shoot redifferentiation was excellent, when the transfer was made after 14-day culture with 1.0 or 10.0 mg/ℓ BA and 1.0 mg/ℓ NAA. Rates of cultures differentiating shoots and roots were the highest with transfers after 14-day culture with 1.0 mg/ℓ BA and 1.0 mg/ℓ NAA.

6. The following explants were cultured aseptically: small lateral shoots and apices of small lateral shoots. The media used contained MS medium, 0.1 M sucrose, growth regulators (NAA, IBA, 2,4-D and IAA of auxins; BA of cytokinins; added singly or in combination depending on the experiments) and 0.7% agar. The cultures were kept at 25°C in the light (500-5,000 lx, 16-hour day length) or in the dark. (1) The two kinds of explants showed shoot development, root differentiation and plantlet regeneration. (2) The highest rate of cultures developing shoots and differentiating roots was obtained in the culture of apices of small lateral shoots in a spear head. (3) When small lateral shoots in spear heads were cultured, many shoots (corresponding to a lateral shoot in formation) emerged in a rosette form. It is considered that nodal segments are useful as primary plant materials to multiply a clone, because they have many nodes. (4) Auxins for shoot emergence were optimum at low concentrations, when they were added singly, and occasionally had an inhibitory effect at a high concentration of 10^{-4} M. Combined additions of 10^{-7} M- 10^{-6} M BA and auxins made survival rates of cultures high, and enhanced the shoot emergence. High concentrations (more than 10^{-5} M) of BA inhibited shoot elongation and resulted in shoot deformation. (5) IBA and NAA were more effective in root differentiation than the other auxins (IAA and 2,4-D) used in these experiments. Additions of 10^{-6} - 10^{-5} M of IBA and NAA were optimal in the differentiation of a storage root-like white root. (6) Regarding light conditions, shoot elongation was vigorous in the dark, and root differentiation showed no clear tendency in relation to the conditions. In addition, on light conditions in culturing shoot apices, differentiation rates of cultures with storage rootlike white roots were slightly

high under 500 lx, and numbers of shoots and the white roots were large under 5,000 lx.

7. Effects of growth regulators, segment size and transfer on organogenesis were investigated through culturing shoot apices and nodal segments, which were excised from the shoots obtained by culturing small lateral shoots of spears. Results are as follows: (1) In an experiment, in which shoot apices 0.5 mm in length were cultured, 5×10^{-7} - 10^{-5} M IBA and 5×10^{-7} - 10^{-6} M NAA enhanced shoot differentiation, and additions of 10^{-6} - 10^{-5} M IBA and 5×10^{-7} - 10^{-5} M NAA made root differentiation frequent. (2) A comparison was run on the shoot apices, it was shown that shoot elongation was rapid in large apices, whereas root differentiation was frequent in smaller ones. (3) In culture of nodal segments of the shoots, transfer after immersion in liquid media containing growth regulators (BA and IBA) enhanced the differentiation and growth of organs such as shoot and root. Percentages of explants inducing root differentiation was highest, when the explants were transferred onto a medium without growth regulators after a 7-day immersion in liquid medium containing 10^{-6} M BA and 10^{-5} M IBA. (4) As a whole, root differentiation rates in transfer treatment were higher than those in the treatment without transfer, even when the segments were transferred onto the medium with no growth regulator, after immersion into liquid media containing BA and NAA. Rates of cultures with both shoots and roots were more than 50% in the 14-day immersion treatment in liquid media with 10^{-6} M BA and 10^{-5} M NAA, and in the 3-, 7-, and 14-day immersion treatment with 10^{-5} M BA and 5×10^{-5} M NAA. (5) Plantlets were regenerated in the culture of the apices and nodal segments of shoots of the cultures derived from small lateral shoots of spear heads. From the results, it is assumed that a clone can be propagated through repetitions of *in vitro* culture of the portions of

the cultures.

8. Survival of shoot tips (excised from small lateral shoots of spears) frozen in liquid nitrogen (-196°C) were investigated. (1) Optimal conditions of a treatment of keeping the plant materials in freezing solution were at 12-16% of DMSO, at 3°C and for 120 min. (2) An optimal prefreezing, which was carried out at 16% of DMSO, 0.5 - $1.0^{\circ}\text{C}/\text{min}$ of cooling rates and at -30°C of minimum freezing temperature, gave a high survival rate (100%). (3) From the fact that small tips (excised from lateral shoots) survived freezing in liquid nitrogen, it was confirmed that useful genetic resources of asparagus could be freeze-preserved in liquid nitrogen.

9. The capability of tissue cultures (for vegetative propagation) of a supermale plant of asparagus was investigated through culturing segments of shoots formed from lateral shoots in spear heads. Agar-solidified media used contained MS medium, 2% sucrose and growth regulators (BA, IBA and NAA). (1) In the culture of shoot apices, rates of cultures differentiating shoots and roots was high (about 40%) with 10^{-7} M BA + 10^{-6} M IBA and with 10^{-6} M NAA alone. (2) The rates of cultures differentiating both shoots and roots were higher in nodal segments than in shoot apices, and the cultures developed into plantlets. (3) From these results, it is considered that a supermale plant of asparagus can be multiplied through tissue culture.

From the results of this study, it is confirmed that organs (shoots and roots) and plantlets can be developed through *in vitro* culture of various segments excised from an asparagus plant, and that these facts suggests the possibility of applying the methods to freeze-preservation of useful genetic resources or germplasms and to the *in vitro* multiplication through tissue culture. In addition, it is indicated that the *in vitro* culture systems established in this study may be utilized in various researches on asparagus.