

アスパラガス的高密度多芽状集塊の誘導と植物体再生

長久 逸・甲村 浩之・池田 好伸

キーワード：アスパラガス，多芽状集塊，大量増殖，液体回転培養

アスパラガス (*Asparagus officinalis* L.) はユリ科に属する雌雄異株の多年生草本で，若茎を食用とする。近年，食生活の多様化により緑黄色野菜の1つとして需要が増大しており，栽培面積も拡大されつつある。また，広島県農試では収量性の高い4倍体品種‘セトグリーン’⁹⁾，3倍体品種‘ヒロシマグリーン’²⁾を育成し，普及を図っている。

アスパラガスは雌雄異株で基本的に自殖ができない。そのため遺伝子のヘテロ性が強く，種子繁殖では均一な個体を得ることが困難である。また，株分けでは増殖率が低いと見られ，組織培養による増殖が望まれている。

アスパラガスの組織培養による増殖に関して，茎頂からの植物体再生は Murashige ら⁷⁾，Hasegawa ら³⁾および佐藤ら¹⁰⁾により報告されている。また，若茎側芽を培養し多数の苗条を形成させ，その苗条の切片から多数の植物体を再生させる側芽培養法が Matsubara ら⁶⁾および Yang ら^{15,16)}により報告されている。この方法は頂芽や側芽を含む節部を切り取って固形培地で継代培養するため，大量に扱う場合には多くの労力を要する。

一方，液体培養法は固体培養法に比較して増殖率が高く，大量増殖の手段として適している。特に，回転軸を傾け低速で回転させる垂直式の液体回転培養法は，培養物の極性を消失させ，芽の伸長および根の分化を抑制し，増殖させることができる。

ラン科植物のシンビジウム，カトレヤ等では液体回転培養によるプロトコーム様体を利用した増殖法が実用化されている。また，田中ら¹²⁾は液体回転培養による苗条原基を利用した増殖法を報告している。これらの液体回転培養法は，固体培養と比較して増殖率が高く，増殖維持も容易である。

本研究では液体回転培養法によるアスパラガスの増殖維持を目的に，高密度多芽状集塊の誘導および高密度多芽状集塊からの植物体再生について検討した。

材料および方法

1. 高密度多芽状集塊の誘導

材料は品種‘メリーワシントン500W’の圃場栽培株を用いた。若茎(15~20cm)の中間部分を切り取り，70%エタノールに数秒間，次亜塩素酸ナトリウム溶液(塩素濃度1%，Tween 20数滴添加)に15分間浸漬して表面殺菌を行い，滅菌水で3回洗浄した。りん片葉を取り除き，腋芽の茎頂組織0.5mmを摘出して培養に用いた。

誘導培地は無機塩濃度を1/2，ショ糖濃度を2%としたLinsmaier and Skoogの培地⁵⁾(LS培地)に，アンシミドールと6-benzylaminopurine (BA)を組合せた15種類の液体培地を用いた。滅菌はpHを5.8に調整した後，120℃，1 kg/cm²で15分間行った。

茎頂組織は，直径30mm，長さ200mmの試験管に20ml分注した液体培地に植え付け，25℃，1,000~5,000lx連続照明下，直径100cmのドラム型の垂直式回転培養装置にて2rpmの速度で回転培養を行った。

2. 高密度多芽状集塊からの植物体再生

再生培地は無機塩濃度を1/2とし，寒天0.8%を加えた1/2 LS培地に，ショ糖と3-indolebutyric acid (IBA)を組合せた8種類の固形培地を用いた。アンシミドール10.0mg/lを添加した1/2 LS液体培地で，9か月間継代培養した高密度多芽状集塊を2~3mm角に分割して，固形培地に移植し，25℃，3,000lx，16時間照明で培養した。

発根した幼植物体は甲村ら⁴⁾の方法に従い，パーミキュライトを入れたプラスチック製鉢に移植し，透明蓋付き容器内に鉢の底が水に浸るように置いて馴化後，鉢上げした。

3. 組織学的観察

継代培養中の高密度多芽状集塊を F A A で固定後、Bennett ら¹⁾の方法に従い、グリコールメタクリレート樹脂に包埋した。2-メトキシエタノール、100%エタノール、n-プロパノール、n-ブタノールの順序で脱水し、モノマーミクスチャー（94.5%グリコールメタクリレート、0.5% 2,2-アゾビス、5.0% P E G 400）に浸漬した。モノマーミクスチャーを満たしたゼラチンカプセルに試料を封入し重合させた。ミクロトームで10 μ mの組

織切片を作製し、トルイジンブルー染色して、組織学的な観察を行った。

4. 染色体の観察

高密度多芽状集塊から再生した植物体の若茎の小側枝を0.002M 8-hydroxyquinolineに20℃、4～5時間浸漬した後、エタノール・酢酸溶液（3：1）で4℃、24時間以上固定した。次に塩酸・酢酸溶液（1N塩酸：45%酢酸＝1：1）で60℃、10秒間解離処理を行い、酢酸

Table 1 The shoot tip culture of *Asparagus officinalis* in 1/2 LS medium supplemented with ancymidol and BA

BA (mg/l)	Ancymidol (mg/l)				
	2.0	5.0	10.0	20.0	30.0
0	MS 4/6 ^{a)} NG 1/6	MS 4/6 NG 1/6	MS 3/7	NG 6/7 D 1/7	NG 6/6
			MB*2/7		
			NG 1/7		
			D 1/7		
0.02	MS 5/6	MS 8/8	MS 4/7	D 4/6	D 5/6
			MB 2/7	NG 2/6	NG 1/6
			NG 1/7		
0.2	MS 6/6	MS 6/6	MS 2/6	NG 3/6	NG 3/6
			NG 4/6	D 3/6	D 3/6

MS : multiple shoots, MB : multiple buds, MB* : high density multiple buds, NG : no growth, D : dead

a) Number of shoot tips developed/Number of shoot tips planted

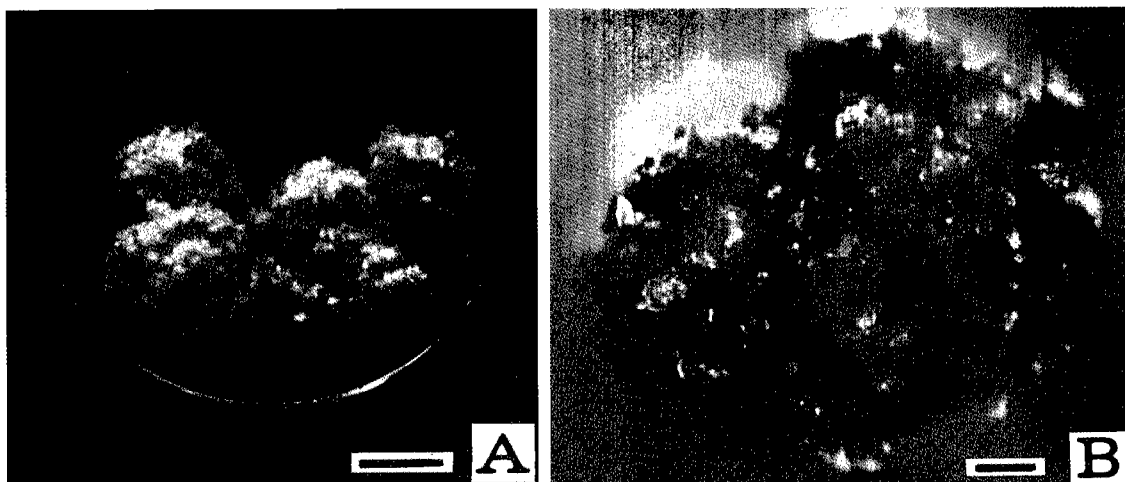


Fig. 1 A : Masses of high density multiple buds at 1 month period of the subculture.
B : A mass of high density multiple buds.
Bar=0.5cm (A), 1mm (B)

オルセイン染色し、押しつぶし法でプレパラートを作製して染色体を観察した。

実験結果

1. 高密度多芽状集塊の誘導

ジベレリン生合成の阻害剤であるアンシミドールとBAを組合せた15種類の1/2LS液体培地で、茎頂組織を回転培養した結果、アンシミドール10.0mg/ℓ単独添加区およびアンシミドール10.0mg/ℓ+BA0.02mg/ℓ添加区の2区において、緑色の突起状構造を多数有する多芽状集塊が形成された(Table 1)。特にアンシミドール10.0mg/ℓ単独添加区で形成された多芽状集塊は、アンシミドール10.0mg/ℓ+BA0.02mg/ℓ添加区で誘導された多芽状集塊に比べて増殖が良好で、コンパクトな突起状構造が密集した多芽状集塊で、高密度多芽状集塊(high density multiple buds)と名付けた。(Fig. 1A, 1B)。

アンシミドール20.0, 30.0mg/ℓ添加区では生育不良または枯死し、アンシミドール2.0, 5.0mg/ℓ添加区では、苗条の形態を保った状態の多芽体が形成された(Table 1)。

アンシミドール10.0mg/ℓ単独添加区で形成された高密度多芽状集塊は、約1か月毎に分割して同じ組成またはアンシミドール10.0mg/ℓ+BA0.002mg/ℓを添加した培地に移植し、誘導と同じ培養条件で継代培養することにより、現在まで2年間以上増殖維持されている。高密度多芽状集塊は回転培養中の振動では自然に分割され

Table 2 The monthly multiplication-rate of high density multiple buds after 1 year period of the subculture

High density multiple buds (accession no.)	Fresh weight(g)		Monthly multiplication -rate (B/A)
	Initial (A)	1 month (B)	
1	0.27	1.10	4.07
2	0.19	1.03	5.42
3	0.15	0.88	5.87
4	0.22	1.14	5.18
5	0.29	1.12	3.86
6	0.13	0.90	6.92
Mean			5.22

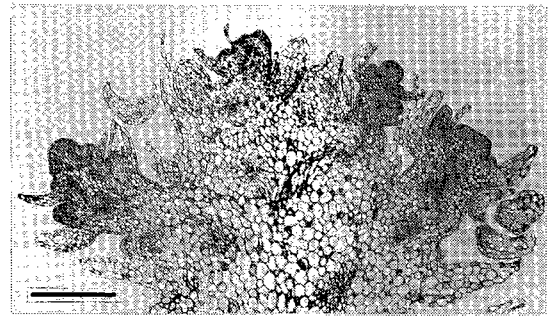


Fig. 2 A longitudinal section of a mass of high density multiple buds.
Bar=400μm

Table 3 Effect of IBA and sucrose on plant regeneration from high density multiple buds

Sucrose (%)	IBA (mg/ℓ)	No. of explants examined	No. of explants exhibiting shoot formation	Shoot		Root formation (%)	White-colored root formation(%)
				Number ^{a)}	Growth ^{b)}		
3	0	20	20	+++	+++	0	0
3	0.1	20	20	+++	++	2(10.0)	2(10.0)
3	0.5	20	20	+++	+	12(60.0)	4(20.0)
3	1.0	20	20	+++	±	1(5.0)	0
7	0	20	20	+++	±	0	0
7	0.1	20	20	+++	±	3(15.0)	2(10.0)
7	0.5	20	20	++	±	3(15.0)	2(10.0)
7	1.0	20	20	+	±	1(5.0)	1(5.0)

a) Indicated in three intensities : + (a few), ++ (some), +++ (many)

b) Indicated in four intensities : ± (slight), + (slow), ++ (moderate), +++ (vigorous)

ないが、ピンセットで容易に分割できる。分割移植した小集塊は次々に腋芽が発達し、回転培養することにより試験管内で転がり、球形集塊を形成する。

1年間継代培養した高密度多芽状集塊のその後1か月間の増殖率は、生重量比で約4～7倍で、平均約5倍であった (Table 2)。

継代培養中の高密度多芽状集塊の断面切片を Fig. 2 に示す。周縁部に、茎頂ドームと葉原基が分化し、腋芽が発達した状態の未発達した苗条が認められる。内部は液胞の発達した大型の細胞で構成されている。この未発達した苗条は1～2 mm程度しか伸長せず、腋芽部分が次々に発達して集塊を形成する。

2. 高密度多芽状集塊からの植物体再生

アンシミドール10.0mg/ℓ添加した1/2 LS 液体培地で9か月間継代培養した高密度多芽状集塊を2～3 mm角に分割して、ショ糖とIBAを組合せた8種類の1/2 LS 寒天培地に移植し、植物体の再生を検討した (Table 3)。

いずれの区においても全ての切片から苗条が再生し、多いものでは1切片から20本以上の苗条が形成された。苗条の形成数および伸長はショ糖3%+IBA無添加区が最も良好であった。ショ糖7%区またはIBA1.0mg/ℓ添加区では苗条の生長が抑えられた。

発根はIBA添加区で認められ、形成された根は半透明な不定根と白色根の2種類であった。ショ糖3%+IBA0.5mg/ℓ添加区で発根および白色根の形成が最も良く、発根率60%、白色根形成率20%であった。1切片

当たりの発根数は苗条形成数に比べて少なく1～3本であった。

白色根を形成した苗条 (Fig. 3A) はバーミキュライトに移植して、湿度を保った状態で生育させることにより、容易に馴化し、鉢上げすることができた (Fig. 3B)。

3. 再生植物体の変異性

高密度多芽状集塊から再生し鉢上げした植物体11個体は正常に生育し、外部形態の変異は認められなかった。

再生植物11個体の茎頂組織細胞の染色体数は、11個体の観察した全ての細胞において、 $2n=20$ の2倍体であった。

Table 4 Chromosome counts in the regenerated plants from high density multiple buds

Regenerated plant (accession no.)	Chromosome number ($2n$)	Number of cells observed
MW500W	20	7
1	20	43
2	20	17
3	20	43
4	20	57
5	20	23
6	20	30
7	20	17
8	20	22
9	20	17
10	20	11
11	20	21

MW500W : 'Mary Washington 500W'



Fig. 3 A : Regenerated plantlet with white-colored roots derived from high density multiple buds. B : Potted plants derived from high density multiple buds. Bar=1cm (A), 10cm (B)

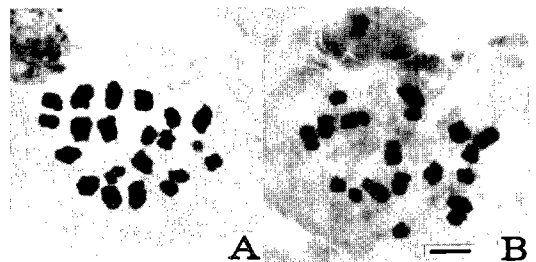


Fig. 4 Mitotic metaphase chromosomes in shoot apex cells. A : $2n=20$ of 'Mary Washington 500W', B : $2n=20$ of the regenerated plant. Bar= $5\mu\text{m}$

た (Table 4, Fig. 4B)。品種‘メリーワシントン 500W’の茎頂組織細胞の染色体数は $2n=20$ の2倍体であり (Table 4, Fig. 4A), 再生植物の染色体数の変異は認められなかった。

考 察

アスパラガスの若茎茎頂を、アンシミドール10.0 mg/ℓを添加した1/2LS液体培地で回転培養することにより高密度多芽状集塊を誘導することができた。この高密度多芽状集塊は周縁部に茎頂ドームと葉原基の分化が認められる非常にコンパクトで密集した芽の球状集塊で、芽の伸長が抑えられた状態で腋芽的に増殖する。

一方、田中ら¹²⁾がキク科のハプロパップスの液体回転培養で誘導した苗条原基集塊はドーム状構造の集合体で、茎頂ドームと葉原基の分化が認められない均一な集塊として増殖する。筆者らが今回作出した高密度多芽状集塊の形態および増殖様式は、ハプロパップスの苗条原基とは異なっていた。

アスパラガスの液体回転培養に関して、高柳ら¹¹⁾は品種‘メリーワシントン500W’の茎頂を、BA 0.2 mg/ℓ + NAA 2.0, または 4.0 mg/ℓを添加したMS液体培地で回転培養することにより、苗条原基に類似した小さな丸い突起状の構造で覆われた塊状の組織を誘導した。中島ら⁸⁾は品種‘ハイデル’の茎頂を、BA 0.2, 2.0 mg/ℓ と NAA 2.0, 4.0 mg/ℓを添加したMS培地で液体回転培養することにより、苗条原基に類似した小さな粒状の集塊を誘導した。しかし、これらの苗条原基様集塊の組織学的構造および増殖様式については明らかにされていない。筆者らが今回作出した高密度多芽状集塊は、外部形態からこれらの苗条原基に類似した集塊とは異なると考えられた。

高密度多芽状集塊は液体回転培養で増殖維持し、必要に応じて固形培地に移植することにより多数の苗条が得られる。1年間継代培養した高密度多芽状集塊では、その後1か月間の増殖率は生重量比で約5倍であった。また、高密度多芽状集塊はピンセットで容易に分割できた。2～3 mm角の切片を固形培地に移植後、多いものでは20本以上の苗条が同時に再生した。これらのことから高密度多芽状集塊を用いた培養法は、従来の固形培地での側芽培養法に比較して、増殖率が高く、増殖維持が容易であると考えられた。

一般にアスパラガスの側芽培養において、発根が不安定で植物体の再生率が低いことが問題となっている^{13,14)}。不定根および透明根は活着が悪く、馴化過程で

の生存率を高めるには白色根を形成させる必要がある。高密度多芽状集塊は、再分化培地に移植後、苗条を多数形成するが、白色根の形成率は20%、1切片当りの発根数は1～3本と非常に少なかった。今後、白色根の効率的な誘導条件の検討が必要である。

高密度多芽状集塊は、液体回転培養法で1か月毎に継代培養することにより、現在まで2年間以上増殖維持されている。9か月間継代培養後、再生させた植物において、外部形態、染色体数の変異は認められず、遺伝的に安定であると考えられた。

以上のことから、高密度多芽状集塊を用いた培養法は増殖率が高く、遺伝的に安定な長期間の維持が可能で、必要に応じて植物体に再生させることができると考えられた。

摘 要

1. アスパラガスの液体回転培養による増殖維持法を確立するために、高密度多芽状集塊の誘導および高密度多芽状集塊からの植物体再生について検討した。
2. 品種‘メリーワシントン500W’の若茎茎頂を、アンシミドール10.0 mg/ℓを添加した1/2LS液体培地で2rpmの速度で回転培養することにより、高密度多芽状集塊を誘導した。この高密度多芽状集塊は非常にコンパクトで密集した芽の球状集塊で、芽の伸長が抑えられた状態で、腋芽的に増殖する。
3. 高密度多芽状集塊は誘導と同じ条件で1か月毎に継代培養することにより、現在まで2年間以上増殖維持されている。1か月の増殖率は生重量比で約5倍であった。
4. 高密度多芽状集塊は、IBA 0.5 mg/ℓを添加した1/2LS寒天培地に移植することにより、多数の苗条を再生した。一部の苗条は白色根を形成し、完全な植物体となった。
5. 再生植物11個体全てにおいて、外部形態および染色体数の変異は認められなかった。
6. 高密度多芽状集塊を用いた培養法は、増殖維持が容易で、遺伝的に安定した維持ができ、必要に応じて植物体に再生させることができる。

謝 辞

本研究を実施するにあたり、広島大学理学部附属植物遺伝子保管実験施設の谷口研至講師から有益な指導と助言をいただいた。ここに感謝の意を表する。

なお、本研究の経費の一部は、農林水産省地域バイオテクノロジー研究開発促進事業予算によった。

引用文献

- 1) BENNETT, H. S., A. D. WYRICK, S. W. LEE and J. H. McNEIL: 1983. Science and art in preparing tissues embedded in plastic for light microscopy, with special reference to glycol methacrylate, glass knives and simple stains. *Stain Technol.* **51**: 71—97.
- 2) 長谷川繁樹・谷口義彦・沖森 當・寛 三男: 1987. 倍数体アスパラガスの育成に関する研究 第2報 三倍体の育成とその特性. 広島農試報告. **50**: 75—80.
- 3) HASEGAWA, P. M., T. MURASHIGE and F. H. TAKATORI: 1973. Propagation of asparagus through shoot apex culture. II. Light and temperature requirements, transplantability of plants, and cyto-histological characteristics. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **98**: 143—148.
- 4) 甲村浩之・長久 逸・池田好伸: 1990. アスパラガスの不定胚形成による大量増殖 第1報 実生組織からの不定胚の形成と植物体再生. 広島農試報告. **53**: 43—50.
- 5) LINSMAIER, E. M. and F. SKOOG: 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **18**: 100—127.
- 6) MATSUBARA, S. and W. J. CLORE: 1974. Vegetative propagation of asparagus from lateral buds. *Sci. Rep. Fac. Agr. Okayama Uni.* **43**: 19—26.
- 7) MURASHIGE, T., M. N. SHABDE, P. M. HASEGAWA, F. H. TAKATORI and J. B. JONES: 1972. Propagation of asparagus through shoot apex culture. I. Nutrient medium for formation of plantlets. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **97**: 158—161.
- 8) 中島寿亀・桑原宏司・田中政信: 1989. 胚様体, 苗条原基の利用法の開発 I. 苗条原基利用によるアスパラガスの大量増殖法の開発. 佐賀農試研報. **25**: 65—71.
- 9) 沖森 當・寛 三男・長谷川繁樹・谷口義彦: 1984. 倍数体アスパラガスの育成に関する研究 第1報 コルヒチン処理による四倍体の育成. 広島農試報告. **48**: 75—82.
- 10) 佐藤 洋・原田 隆・八嶽利郎: 1983. アスパラガスの形態形成に関する研究 第8報 若茎各部位の組織培養における器官形成. 北大邦文紀. **14**: 76—89.
- 11) 高柳謙治・西尾 剛・田中正美・藤原 修: 1985. 茎頂組織の液体回転培養による大量増殖. 園学要旨. 昭60春: 208—209.
- 12) TANAKA, R. and H. IKEDA: 1983. Perennial maintenance of annual *Haplopappus gracilis* (2n=4) by shoot tip cloning. *Jpn. J. Genet.* **58**: 65—70.
- 13) 浦上敦子: 1988. アスパラガスの組織培養による増殖とその育種の利用. 農及園. **63**: 271—273.
- 14) 八嶽利郎・原田 隆・飛世昌江: 1983. アスパラガスの形態形成に関する研究 第9報 培養茎の茎頂ならびに節部切片の培養における器官形成. 北大邦文紀. **14**: 174—186.
- 15) YANG, H. J. and W. J. CLORE: 1974. Rapid vegetative propagation of asparagus through lateral bud culture. *HortScience* **8**: 141—143.
- 16) YANG, H. J.: 1977. Tissue culture technique developed for asparagus propagation. *Hort-Science* **12**: 140—141.

Induction of High Density Multiple Buds and Plant Regeneration in Asparagus

Suguru CHOKYU, Hiroyuki KOUMURA and Yoshinobu IKEDA

Summary

Multiple compact shoot buds high-densely concentrated in tissue culture called "high density multiple buds" were found in *Asparagus officinalis* L. cv 'Mary Washington 500W' for the first time. A mass of high density multiple buds was induced from cultured shoot apex in 1/2LS liquid medium supplemented with 10.0mg/l ancymidol stirred in test tubes by gyrated drum (2rpm). It was maintained continuously by subculture at one month intervals for two years or more and proliferated through axillary bud formation. The monthly multiplication-rate was about five-fold the original fresh weight.

After high density multiple buds were placed on 1/2LS medium supplemented with 0.5mg/l IBA, 3% sucrose and 0.8% agar, many shoots were formed. Some shoots produced white-colored roots and grew into plantlets.

All the 11 plants regenerated were diploids ($2n=20$) which were the same chromosome number as the parental plant mass.

These results suggest that the method using mass of high density multiple buds can be applied for rapid proliferation of plants maintaining chromosomal and genetical stability.

Keywords: asparagus, micropropagation, multiple buds, liquid culture

