

アスパラガス側芽培養でのアンシミドールによる 発根及び多芽体形成

松原幸子・柘田正治^{a)}・村上賢治・高橋和久^{b)}
石倉 聡^{c)}

(生物機能・遺伝資源開発学講座)

Received November 1, 1990

In Vitro Rooting and Multiple Buds Formation from Asparagus Lateral Buds with Ancymidol

Sachiko MATSUBARA, Seiji MASUDA^{a)}, Kenji MURAKAMI,
Kazuhiisa TAKAHASHI^{b)} and Satoshi ISHIKURA^{c)}
(Division of Biological Function and Genetic Resources Science)

In vitro rooting of asparagus lateral bud was promoted by culturing on the MS medium containing 5 μ M ancymidol and 5 % sucrose, with about 90 % of survival explants. Multiple buds formation was observed by the addition of 3.9~39 μ M ancymidol and 3 % sucrose, with 12.7 shoots on the medium containing 11.7 μ M ancymidol, but some of them was vitrified tissues.

Plantlets with normal roots and shoots was obtained by culturing on the medium containing 5~10 μ M ancymidol and 5 % sucrose for 2 months, with 70 % of explants. Combination of ancymidol of 5~50 μ M and 5 % sucrose promoted multiple buds formation, and they grew to shoots by transferring to the medium without ancymidol.

緒 言

アスパラガスは雌雄異株であり、低いパーセンテージで両性花が見られることもある。性比は通常雌：雄が1：1であり、雄株は雄花のみをもつものから両性花と雄花をもつものまでの幅がある¹⁷⁾。栽培上は雄株の方が有利であるとの報告も多く、最近では全雄系の育種も行われるようになって来た。全雄系はYY性染色体をもつ超雄とXX性染色体の雌の交雑によるF₁育成か、XY染色体をもつ両性花の自家受粉により可能である¹⁷⁾。しかし前者についてはY染色体をもつ花粉の培養技術はまだ確立されているとはいえないため超雄の作出は難しく、後者の方法によると考えられる全雄系が最近やっと2, 3見られるようになって来た。

一方このような交配の手段によらず、性に関係なく非常に高品質の植物体が選抜された場合、*in vitro* 培養により大量増殖が可能である。*in vitro* 培養は、茎頂あるいは側芽の培養^{1,9,10,11,12,13)}、カルス培養^{16,21)}、細胞培養^{18,20)}あるいはプロトプラスト培養²⁾などがあり、このうち茎頂や側芽の培養は既に実用化の段階に入っている。ところが苗条伸長は比較的簡単に

a) 作物機能調節学 (Division of Eco-physiology for Crop Production)

b) 多木化学 (Taki Chemical Co.)

c) 広島県三次農業改良普及所 (Hiroshima Pref., Miyoshi Agricultural Extension Center)

誘導出来ても、発根が不安定であるために実際に利用出来る苗の生産効率が悪い。発根に関しては *in vitro* 培養で種々の処理が行われてきたが^{3,5,9,11)}、苗条の生理的条件により安定した結果を導くのが困難であった。最近、ancymidol と高濃度のショ糖による発根促進効果が報告され^{3,5)}、比較的安定した結果を得る事が出来るようになってきたが、これも確実とは言いがたい。

本実験では、これらの ancymidol とショ糖の相互効果を再検討し、より安定した結果を得ると同時に、ancymidol による多芽体誘導の効果を認めたので報告する。

材料及び方法

食用アスパラガス (*Asparagus officinalis* L.) の栽培種 'メリーワシントン500 W' の種子を基本培地に播種し、伸長してきた15-20日令の幼植物の側芽を用いた。基本培地は、ムラシゲ・スクーグ (1962)¹⁴⁾ の無機塩に2.0 (以下 $\text{mg} \cdot \ell^{-1}$) *myo*-イノシトール, 0.5ニコチン酸, 0.5塩酸ピリドキシン, 0.1塩酸サイアミン, 30000ショ糖及び支持体として2000ジェランガムを添加し、pH を5.7に調整したものである。培養物は、25°C, 1500 lx の定温器内においた。以下それぞれの実験について、特殊な条件を述べる。

発根に及ぼす ancymidol とショ糖濃度の影響：基本培地に 5 μM ancymidol, 30, 50又は70 $\text{g} \cdot \ell^{-1}$ ショ糖を添加した3種類の培地を作成し、100mlフラスコに各培地40mlずつ分注した。1フラスコ当たり10側芽ずつ植え付け、各区5フラスコとした。培養60日後に地上部及び地下部の生長状態を調査した。

多芽体形成に及ぼす ancymidol 濃度とショ糖の影響：基本培地に0.01から30 $\text{mg} \cdot \ell^{-1}$ ancymidol と30 $\text{g} \cdot \ell^{-1}$ ショ糖, 20 $\text{g} \cdot \ell^{-1}$ を添加した7種類の培地を作成し、上と同様に植え付けた。処理数も同様とした。培養60日後に多芽体形成の状態を調査した。

発根及び多芽体形成に及ぼす ancymidol とショ糖の濃度の影響：基本培地に ancymidol を0, 0.5, 10.0及び50.0 μM とショ糖30及び50 $\text{g} \cdot \ell^{-1}$ を組み合わせる添加した10種類の培地を作成し、7cmのプラントボックスに50mlずつ分注した。60日間培養後、発根及び地上部の生育状態、更に多芽体形成の状態を調査した。

多芽体の苗条伸長：側芽を ancymidol 10 μM 及び50 μM 添加培地で2週間培養後、形成された多芽体を基本培地に移植してさらに1週間培養し、地上部の生長を調査した。

結 果

発根に及ぼす ancymidol とショ糖濃度の関係：側芽の生長に及ぼす5 μM の ancymidol と3種類のショ糖濃度の影響を見たところ (Table 1), 生存率はショ糖濃度が高くなるほど低下した。3%ショ糖で74%の外植体が生長を始めたのに対し、7%ショ糖では40%しか生長

Table 1 Effect of sucrose concentration on rooting of lateral buds of 'Mary Washington 500 W' asparagus, 60 days after culture in a modified MS medium supplemented with 5 μM ancymidol

Conc. sucrose (%)	Percent growing explant	Rooting per growing explant (%)	Percent vitrified roots	Plantlet			Explant growing shoots	
				Fresh wt. (mg)	No. of roots	Longest root length (mm)	No. of roots	Longest shoot length (mm)
3	74	62.2	13	292	1.9	48	3.1	19
5	56	89.3	0	204	2.8	58	2.2	16
7	40	80.0	0	340	2.2	71	3.5	9

しなかった。一方、生長を始めた外植体の発根率は、5%シヨ糖で89.3%と一番高く、次いで7%、3%の順で、植え付け外植体当たりの発根苗条、つまり植物体になる率は5%シヨ糖で最も高く、50%であった。植物体当たりの根の状態は、3%シヨ糖区で水浸状の透明根の割合が13%であったが、5%、7%区では水浸状根は全く見られなかった。根数や根長も大きな差は見られなかったが、シヨ糖5~7%区で高かった。地上部の生長もシヨ糖濃度による大きな差は見られなかった。

多芽体形成に及ぼす ancymidol 濃度とシヨ糖の影響：ancymidol を1, 3, 10 mg・ℓ⁻¹添加した培地で多芽体の形成が見られた(Table 2)。ここで多芽体とは1側芽から2個以上の伸長していない芽をもつものを指す。ancymidol 0から0.1mg・ℓ⁻¹添加培地では苗条は総て伸長し、30mg・ℓ⁻¹ではすべて枯死した。生存率は ancymidol 濃度が高くなるにつれ低くなった。最高の多芽体の形成率は、ancymidol 3mg・ℓ⁻¹で70%となり、この区では生存個体の殆どが多芽体となった。またこれらの多芽体を分割しないで基本培地に移植したところ、1外植体当たりの伸長した苗条数は12.7本と多かった。

発根及び多芽体形成に及ぼす ancymidol とシヨ糖の濃度の影響：以上からシヨ糖濃度は、5%位が望ましいと思われたので、シヨ糖を5%及び対照として3%区を設け、また発根は5μM(1.28 mg・ℓ⁻¹)、多芽体は3mg・ℓ⁻¹前後の ancymidol の濃度で促進されたので、0から50μM(12.8 mg・ℓ⁻¹)の ancymidol 濃度での発根及び多芽体状態を見た(Table 3, Fig. 1)。いずれの処理区においても生存率は非常に高く、外植体の96.7~100%が生長した。それらの外植体の発根率は ancymidol 濃度による差が大きく、最も発根率が高かったのはシヨ糖3%の場合は5μMで83.3%が、5%シヨ糖の場合は10μMで70%、5μMで66.7%の外植体が発根した。根重もほぼ発根率と似た傾向が見られた。地上部の生長を見ると、生体重は ancymidol 0.5~10μMで重くなる傾向が見られたが、乾物率は ancymidol を添加したことによって低くなった。また ancymidol 添加区で、シヨ糖3%区では5%区と比較して乾物率が低く、水浸状組織が多いことと関係があるように見えた。両シヨ糖区で5μM以上の濃度の ancymidol 添加区で多芽体の形成が見られ、濃度の増加とともに形成率も増加した。特に50μM ancymidol 添加区では100%が多芽体になった。多芽体以外の外植体は、苗条伸長個体となった。伸長した苗条数は、3%シヨ糖区では ancymidol 0.5又は5μMの時、それぞれ2.9又は2.5となり、5%シヨ糖区では ancymidol 0.5μMで2.6になった以外は濃度による差は殆ど見られなかった。ただしこれらの苗条長は、ancymidol 濃度が高くなればなるほど抑制される傾向が見られた。以上のように、外植体の形質に関する処理要因の影響を分

Table 2 Effect of ancymidol concentration on multibuds formation of 'Mary Washington 500 W' asparagus, 60 days after culture in a modified MS medium supplemented with 3% sucrose

Conc. ancymidol (mg/ℓ)	Percent growing explant	Explant formed multibuds (%)	Fresh wt. explant formed multibuds (mg)	No. of shoots per explant*
0	93.3	0	—	2.1
0.01	90.0	0	—	2.8
0.1	76.6	0	—	2.8
1.0	83.3	43.3	1440	7.5
3.0	73.3	70.0	650	12.7
10.0	70.0	50.0	270	6.2
30.0	0	—	—	—

* : 1 month culture after transferring to the basal medium.

Table 3 Effects of concentrations of sucrose and ancymidol on rooting and multiple buds formation of lateral buds of 'Mary Washington 500 W' asparagus 60 days after culture in a modified MS medium

Conc. ancymidol μM (mg/ℓ)	Conc. sucrose (%)	Survival (%)	Rooting (%)	Root fresh wt. (mg)	Survival explant				Explant growing shoots	
					Top f.w. (mg)	Percent top dry matter	Forming multibuds (%)	Shoot growing (%)	No. of shoots	Longest shoot length (mm)
0	3	100	13.3	29	46	30.0	0	100	1.4	114
0.5 (0.128)	3	100	66.7	172	193	16.6	0	100	2.9	82
5 (1.28)	3	96.7	83.3	483	321	13.9	34.4	65.6	2.5	36
10 (2.56)	3	100	36.7	166	310	13.3	80.0	20.0	1.3	14
50 (12.80)	3	96.7	3.3	14	100	14.0	100	0	—	—
0	5	96.7	33.3	123	59	24.3	0	100	2.1	74
0.5 (0.128)	5	100	50.0	531	161	17.8	0	100	2.6	63
5 (1.28)	5	100	66.7	399	111	16.3	53.3	46.7	1.8	20
10 (2.56)	5	100	70.0	691	196	17.0	53.3	46.7	1.9	13
50 (12.80)	5	96.7	13.3	59	21	14.0	100	0	—	—
Significance										
Conc. ancymidol (A)		N.S.	**	**	*	**	**	**	**	**
Conc. sucrose (B)		N.S.	N.S.	**	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	**
A × B		N.S.	N.S.	**	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.

N.S., *, **: Nonsignificant or significant at $P = 0.05$ or 0.01 , respectively.

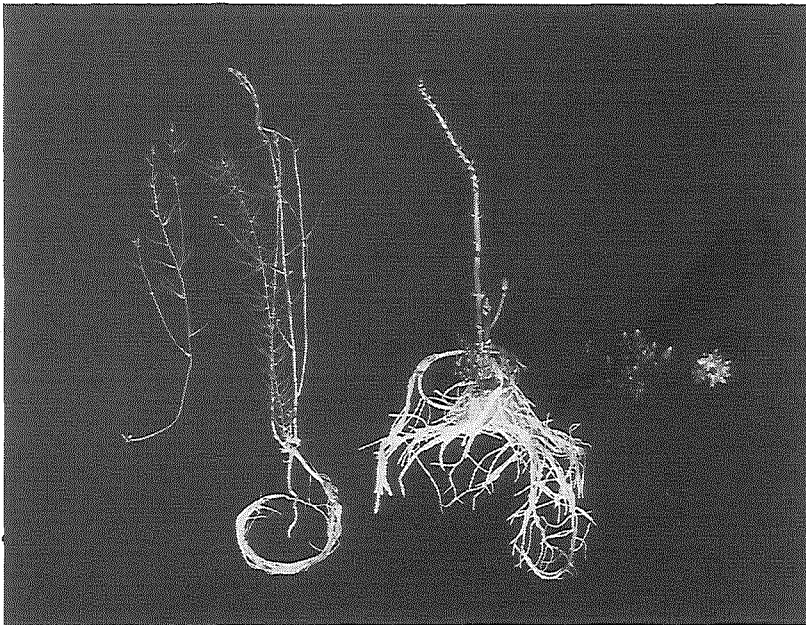


Fig. 1 *In vitro* rooting and multiple buds formation of asparagus from lateral buds cultured on the MS medium containing 0, 0.5, 10 and 50 μM ancymidol (from left to right) and 3% sucrose.

散分析によって見てみると、生存率はいずれの処理でも有意差が見られなかったが、その他の形質は処理による有意な差が見られた。ancymidol 濃度では地上部重で 5%，その他の形質では 1%水準で有意差が見られた。ショ糖濃度では根重と苗条長で 1%水準の有意差が見られたのみである。また、根重においては ancymidol × ショ糖の相互作用による有意差が見られた。

多芽体の苗条伸長：多芽体は基本培地に移植することにより伸長を始めたものが多かった。

10 μM ancymidol 添加区では60%, 50 μM 添加区では90%の外植体が多芽体を形成し, 基本培地に移植することにより苗条が伸長して来た (Table 4). 10 μM 区の方が50 μM 区より伸長苗条数も多く, かつ長くなった. しかし, これらの苗条の発根率は40%と低かった. ただし, これは1週間だけ基本培地で培養しただけの結果なので, 今後それ以上の期間も培養をつづける必要がある.

論 議

アスパラガス側芽培養による発根は種々の方法で試みられたが, Chin³⁾が5 μM ancymidol による発根促進を観察し, さらに Desjardins ら⁵⁾は5 μM ancymidol と7%ショ糖添加区により安定した発根が得られることを示した. しかし Desjardins らと本実験に供試した品種は異なるが, 5 μM ancymidol に組み合わせたショ糖濃度を3, 5, 7%で比較してみると, 本実験では7%より5%の方が発根も地上部生長も良く, 安定した結果を得ることが出来た. 本実験においては ancymidol 存在下では, ショ糖濃度が高くなるにつれて根の生長が促進されたが, 地上部の生長は抑制され, 結局ショ糖5%で順化可能個体が最も多く得られた. 高濃度のショ糖のみではアスパラガスの発根に効果が見られない¹³⁾との報告があるが, ancymidol 無添加培地ではショ糖濃度を高めても効果はなく, またこのショ糖の効果もマニトールに置き換わらないので浸透圧によるものではないと考えられる⁵⁾. ancymidol 存在下で発根率が高くなったのは, ancymidol が苗条や根の形成を阻害する働きをもつジベレリンの作用と拮抗したためである, と考えられている³⁾. 本実験において, ancymidol と5ないし7%ショ糖添加培地で形成された根は, 正常な太い白色根であった. Desjardins ら⁵⁾は, ancymidol 添加区で形成された根は, 太くて枝分かれない, いわゆる貯蔵根と呼ばれているもので, 一方 ancymidol 無添加区の根は, 繊維質で枝分かれており, いわゆる吸収根と呼ばれているものである事を指摘している. その理由としてジベレリンには加水分解酵素の活性を高める作用があるが, ancymidol によってショ糖分解酵素の活性が低下し, 糖が蓄積することにより, 貯蔵根が形成されるためであろうと考えている.

一方 ancymidol に多芽体形成能のあることは, ツクネイモにおいて証明された¹⁵⁾. ツクネイモの茎頂を10 $\text{mg} \cdot \ell^{-1}$ ancymidol, 3%ショ糖添加 MS 培地で培養すると, 多芽体が形成され, それを ancymidol 無添加培地に移植すると多くの苗条伸長が見られた. 本実験でも1~10 $\text{mg} \cdot \ell^{-1}$ ancymidol 添加培地でアスパラガス側芽を培養することにより多芽体を形成することが出来た. 特に Table 2 に示したごとく 3 $\text{mg} \cdot \ell^{-1}$ ancymidol 区では1外植体当たり12.7本が, また10 μM , 50 μM では10本前後の苗条が伸長してきた. アンチ・ジベレリンと考えられている ancymidol は, 頂芽優勢を強め側芽の生長を抑制するジベレリンの作用を抑え, 茎を伸長させず側芽を分化して多芽体とするものと考えられる. 多芽体の形成は, オーキシンとサイトカニンを組み合わせて培地に添加し誘導する方法が数種の作物で報告されている^{6,7,8)}. しかしこの方法ではカルスの形成や奇形等の異常形態になる場合がある. アスパラガスの ancymidol による多芽体形成では, カルス形成は見られなかったが, 水浸状になる

Table 4 Shoot growth from multibuds induced with ancymidol, 30 days after transferring to a modified MS medium

Ancymidol conc. in initial med. (M)	Survival (%)	Shoot growing (%)	No. of shoots	Longest shoot length (mm)	Rooting (%)
10	100	60.0	10.5	197	40.0
50	100	88.9	7.4	69	44.4

場合があり、特に3%ショ糖では多くなった。これは乾物率と関係があり、3%ショ糖区で5%ショ糖区に比較して低く、水分が多いことが分かる。水浸状化した組織は、柵状組織を欠き、海綿状組織のみを有しており、水分ストレスに弱く、順化に適さないと言われている⁴⁾。糖、寒天とジュランガムの濃度、植物ホルモンなども検討したが¹⁰⁾、100%正常に伸長させる方法は見いだせなかった。これは今後の課題であろう。さらに本実験の本来の目的は、優良株の栄養繁殖なので、将来は栽培中の植物の側芽を用いて試みる必要がある。

以上の結果、アスパラガス側芽培養における発根促進のためには5%ショ糖及び5 μ M ancymidol 添加 MS 培地が適していることがわかった。また多芽体形成は、ancymidol 濃度を10 μ M に高めた培地で60日間培養した後、基本培地に移植することにより苗条を伸長させることが可能であった。

摘 要

アスパラガス側芽培養での発根促進と多芽体形成のための培地条件を検討した。供試材料として‘メリーワシントン500 W’の播種後15-20日令植物の側芽を用いた。

側芽を5 μ M ancymidol と5%ショ糖添加 MS 培地で2週間培養したところ、生存個体の90%が発根した。一方、3.9-39 μ M ancymidol と3%ショ糖添加 MS 培地で2週間培養後に多芽体が形成した。11.7 μ M ancymidol では生存個体の70%と最も高率に形成し、それからは12.7本の苗条が伸長したが、そのうちの一部分は水浸状であった。

正常な植物体は、0.5-10 μ M ancymidol と5%ショ糖を添加した MS 培地で2週間培養することにより得られ、特に5-10 μ M ancymidol 添加により植え付け外植体の約70%が正常個体となった。また、5-50 μ M ancymidol と5%ショ糖を添加した MS 培地で2週間培養すると多芽体の形成が見られ、それらを MS 培地に移植することにより苗条の伸長が見られた。

文 献

- 1) Andreassen, D.C : Root initiation of stem tip cuttings from mature asparagus plants. Proc. Am. Soc. Hort. Sci. **90**, 158-162 (1967)
- 2) Bui Dang Ha, D., B. Norreel and A. Masset : Regeneration of *Asparagus officinalis* L. through callus derived from protoplasts. J. Exp. Bot. **26**, 263-270 (1975)
- 3) Chin, C.K. : Promotion of shoot and root formation in asparagus *in vitro* by ancymidol. Hort. Sci., **17**, 590-591 (1982)
- 4) Debergh, P., Y. Harubai and R. Lemeur : Mass production of globe artichoke (*Cynara scolymus*) : Evaluation of different hypotheses to overcome vitrification with special reference to water potential. Physiol. Plant. **53**, 181-187 (1981)
- 5) Desjardins, Y., H. Tissen and P.M. Harney : The effect of sucrose and ancymidol on the *in vitro* rooting of nodal selections of asparagus. Hort. Sci. **22**, 131-133 (1987)
- 6) 岩本 嗣・浜田広延・谷本秀夫・嘉 儀隆 : 組織培養によるハスの大量増殖 (第1報) 茎頂培養による植物体再生と多芽体形成. 園学要旨, 昭和63春, 222-223 (1988)
- 7) 岩本 嗣・森川弘道・山田康之 : *Solanum integrifolium* 胚軸からのマルチプレシュート形成. 育学雑, 37. 別冊 **2**, 28-29 (1987)
- 8) 川崎 渉・児島甚一郎・加納正博・昆 睦子・阿部珠巳・勝屋 登・関谷次郎 : 多芽体及びカルスを經由したラッキョウ種苗の大量育成. 第10回植物組織培養シンポジウム (講演要旨集), 97 (1987)
- 9) Matsubara, S. : Population effect in lateral bud culture of asparagus and promotion of root formation by transplanting. J. Jap. Soc. Hort. Sci. **42**, 142-146 (1973)
- 10) Matsubara, S. and W.J. Clore : Vegetative propagation of asparagus from lateral buds. Sci. Rep. Fac. Agr. Okayama Univ. **43**, 19-26 (1974)
- 11) Matsubara, S., M. Masuda and K. Takahashi : *In vitro* rooting of male and female asparagus derived from apices and lateral bud explants. 岡山大農学報, **74**, 1-5 (1989)
- 12) Morel, G.M. : Morphogenesis of stem apical meristem cultivated *in vitro* : Application to clonal

- propagation. *Phytomorphology*. **22**, 265—277 (1972)
- 13) Murashige, T., M.N. Shabde, P.M. Hasegawa, F.H. Takatori and J.B. Jones : Propagation of asparagus through shoot apex culture. I. Nutrient medium for formation of plantlets. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* **97**, 158—161 (1972)
 - 14) Murashige, T. and F. Skoog : A revised medium for the rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **15**, 473—497 (1962)
 - 15) 信森達也・内藤恭典 : 組織培養によるツクネイモの大量増殖, 園学要旨, 昭和62秋, 260—261 (1987)
 - 16) Reuter, G. : Adventitious organ formation and somatic embryogenesis in callus of *Asparagus* and *Iris* and its possible application. *Acta Hort.* **78**, 217—224 (1977)
 - 17) Reuter, G. : *Asparagus*. In *Handbook of Plant Cell Culture*. **2**, 11—242. (ed. Evans, D.A., W.R. Sharps, and P.V. Ammirato) McMillan Pub. Co. New York.
 - 18) Steward, F.C. and M.O. Mapes : Morphogenesis and plant propagation in aseptic cultures of asparagus. *Bot. Gaz.* **132**, 70—79 (1971)
 - 19) 高橋和久 : アスパラガスの組織培養による大量増殖に関する研究. 岡山大学修士論文. 13—31 (1989)
 - 20) Wilmar, C. and M. Hellendoorn : Growth and morphogenesis of asparagus cells cultured *in vitro*. *Nature* **217**, 369—370 (1968)
 - 21) Yakuwa, T., T. Harada, K. Saga and Y. Shiga : Studies on the morphogenesis of asparagus. I. Callus formation originating in the pith tissue of asparagus spears in tissue culture. *J. Jap. Soc. Hort. Sci.* **40**, 30—36 (1971)