

アサツキの *in vitro* 大量増殖法に関する研究

高 樹 英 明・曲 英 華

山形大学農学部農業生産学講座
(平成6年9月1日受理)

In vitro propagation of *Allium schoenoprasum* L. var. *foliosum* Regel

Hideaki TAKAGI and Ying-hua QU

Section of Agricultural Production, Faculty of Agriculture,

Yamagata University, Tsuruoka 997, Japan

(Received September 1, 1994)

Summary

In vitro propagation by shoot-tip culture of *Allium schoenoprasum* L. var. *foliosum* Regel was investigated. B5 medium supplemented with 10 to 30 μ M of 2ip and 10 μ M of IBA was favorable for shoot formation of the shoot-tip explants when the cultures were incubated at 21°C under 16-h photoperiod. However, the shoot growth was inhibited on the media with high concentrations of IBA or 2ip. Ratios of malformed shoots increased as NAA concentrations of the media increased. Low temperature treatment to cultures did not promote shoot formation. Shoot formation and growth were much better in roller liquid culture than in solid culture when plantlets of large size were subcultured.

key words : *Allium schoenoprasum*, *in vitro* propagation, roller liquid culture, shoot-tip culture.

緒 言

アサツキ *Allium schoenoprasum* L. var. *foliosum* Regel は全国的に見ればきわめてマイナーな野菜であるが、東北・関東地方の一部地域では古くから冬季間に利用できる野菜として栽培され、一定の需要がある(高樹, 1987; 青葉, 1990)。アサツキは鱗茎によって栄養繁殖されてきたため、ウイルス汚染による生育・収量の低下の目立つ系統が見受けられる。ウイルス・フリーのアサツキ種苗の増殖は、球数型系統(岡安ら, 1980)では通常の栽培で1植物当たり数十個の側球(=小鱗茎)が形成され増殖率が高いので、比較的容易と考えられるが、促成栽培に用いられる球重型系統(岡安ら, 1980)では1植物当たり5~10個の側球しか形成されないので増殖の効率が悪く、急速な増殖のためには効率的な増殖法の採用を考える必要がある。大量増殖のためには *in vitro* 増

殖がまず考えられるが、アサツキに関する *in vitro* 増殖の報告は見当たらない。そこで、著者らはアサツキの *in vitro* 大量増殖法について検討を行ったが、ウイルスフリー種苗の増殖は変異の生じないことが要求されるので、培養中に遺伝的変異発生の少ないとされる茎頂培養法(Novak, 1990; 斎藤猛雄, 1990)をベースとした方法を検討した。具体的には *in vitro* でのシュートの大量増殖法について検討したが、液体回転培養法を採用するとシュートの増殖率が著しく高くなることが認められたので、その結果の概要を報告する。

材料および方法

実験1 培地のオーキシン、サイトカニン濃度とシュートの増殖・成長、発根

材料には山形大学農学部実験圃場産の‘バンバ’実生系(‘バンバ’の実生個体を栄養繁殖した系統)と‘小池’の側球を供試した。これらの系統は1植物当たりの側球数が5前後(1990年産)の、増殖率の比較的低い系統である。1990年7月の収穫時から翌年の2月3日まで無加

キーワード：アサツキ, *in vitro* 大量増殖, 液体回転培養, 茎頂培養

温の小屋で貯蔵した球から葉原基2~2.5枚を付けた茎頂を切り出して培養した。基本培地の種類や添加植物成長調節物質の種類・濃度はニンニクで好適だった例に準じ（高樹ら, 1989; 高樹・水上, 1990; 高樹・曲, 1991), 培地はB5基本培地にシヨ糖3%, ジュランガム0.2%およびオーキシンとしてIBA (3-indolebutyric acid) かNAA (α -naphthaleneacetic acid) を, サイトカイニンとして2ip (2-isopentenyl adenine) を加えたものとした(植物成長調節物質の濃度は第1表と第2表に示した)。培養試験管は初代培養(36日)では25mm ϕ ×100mmのものを, 継代培養(30日)では40mm ϕ ×130mmのものをを用いた(培地10ml)。培養温度は21℃とし, 培養光源には高演色形昼白色蛍光灯(松下電器産業(株)製の演色AAA昼白色蛍光灯N-EDL)を用い, 16時間日長とした(PPFD=約100 μ mol m⁻²s⁻¹)。66日間培養後に生育調査を行った。

実験2 茎頂外植体の *in vitro* 低温処理とシュートの増殖・成長, 発根

材料には山形大学農学部実験圃場産の‘置賜’と‘東堀越’(両系統とも1植物当たりの側球数が18前後の系統)の側球を供試した。球を1990年7月の収穫時から翌年の1月10日まで無加温の小屋で貯蔵し, その後実験開始時まで室内貯蔵した。1月30日に葉原基2~2.5枚を付けた茎頂を切り出して, シヨ糖3%, ジュランガム0.2%, IBA0.3 μ Mと2ip30 μ Mを添加したB5培地に置床した。置床した茎頂外植体を9℃で60日間低温処理後21℃で培

養を行った。初代培養(9℃無処理区では置床後の最初の60日間の21℃培養期間に相当する; 9℃60日間処理区では9℃の60日間培養とその後の21℃培養の最初の30日間までの計90日間の培養期間に相当する)での日長は植物育成用蛍光灯(松下電器産業(株)製のホルムクスPG)照明の8時間とし, 21℃の継代培養(9℃無処理区は120日間; 9℃60日間処理区は90日間)での日長は高演色形昼白色蛍光灯照明の16時間とした。培養試験管は実験1と同様とした。

実験3 液体培養と固形培地培養でのシュートの増殖・成長の比較

実験1で新シュートが約10本以上発生した培養植物(系統‘小池’)を分割して, 1植物体当たり約10本の新シュートを含む移植用植物体を調製し, 液体培地(60度傾斜2rpm回転培養)とジュランガムの固形培地に15体ずつ継代して, 培養を続け, その42日後に同一の培地に2回目の継代を行った。液体培地にはB5基本培地にシヨ糖3%, IBA0.3 μ M, 2ip30 μ Mを添加し, 固形培地には, これらにさらに0.2%のジュランガムを添加した。培養容器は250mlの広口三角フラスコを用い, アルミホイルで蓋をした。培養条件は21℃, 24時間日長とした照明光源は, 3波長形昼白色蛍光灯(松下電器産業(株)製の一般照明用の高効率高演色形蛍光灯パルックEX-N), 遠赤色光蛍光灯, 青色光蛍光灯の20W管を本数で5:2:2の比率で設置したものとした。後2者の蛍光灯を併用したのは, 3波長形昼白色蛍光灯単独では放射

第1表 ‘バンバ’実生系の茎頂外植体の成長・発達に及ぼすオーキシンとサイトカイニンの影響(実験1)。初代36日, 継代30日の計66日間培養。

IBA 濃度(μ M)	2ip	調査 植物数	最大シュート 長(mm)	新シュート数 /植物	新シュート形成 植物率(%)	根数/ 植物
0	0	11	108.2 \pm 5.0 ^a	0.0 \pm 0.0	0	4.8 \pm 0.3
0.3	3	11	62.6 \pm 6.5	5.4 \pm 1.9	82	4.5 \pm 1.1
1	3	10	80.1 \pm 13.7	4.8 \pm 1.0	100	5.3 \pm 1.2
3	3	13	57.4 \pm 5.1	5.9 \pm 1.7	92	5.5 \pm 0.9
1	10	11	90.3 \pm 10.0	6.2 \pm 1.2	100	4.8 \pm 1.1
3	10	12	71.4 \pm 8.5	7.4 \pm 1.1	100	3.4 \pm 0.9
10	10	14	47.2 \pm 7.6	10.9 \pm 2.4	100	1.4 \pm 0.7
3	30	13	46.5 \pm 7.1	4.8 \pm 0.7	100	0.3 \pm 0.3
10	30	11	33.2 \pm 5.9	10.0 \pm 4.2	100	0.2 \pm 0.2
30	30	9	33.3 \pm 4.5	9.3 \pm 1.9	100	0.0 \pm 0.0
10	100	9	39.2 \pm 6.0	7.3 \pm 1.4	100	0.0 \pm 0.0
30	100	8	18.9 \pm 2.8	3.5 \pm 1.5	75	0.0 \pm 0.0

^a平均値 \pm SE

第2表 '小池'の茎頂外植体の成長・発達に及ぼすオーキシシンとサイトカイニンの影響(実験1). 初代36日, 継代30日の計66日間培養.

IBA 濃度(μM)	NAA	2ip	調査 植物数	最大シュート 長(mm)	新シュート数 /植物	新シュート形成 植物率(%)	根数/ 植物
0	0	0	7	84.0 \pm 7.5 ²	1.4 \pm 0.4	71	15.0 \pm 3.3
0.1	0	1	8	57.4 \pm 8.4	20.0 \pm 3.0	90	17.1 \pm 5.4
0	0.1	1	10	53.1 \pm 8.3	18.3 \pm 4.4	100	22.8 \pm 5.9
0.3	0	3	8	40.9 \pm 6.5	20.9 \pm 5.4	100	6.3 \pm 2.8
0	0.3	3	7	40.7 \pm 6.4	24.3 \pm 5.5	100	12.7 \pm 4.3
1	0	10	8	44.0 \pm 5.8	28.3 \pm 4.7	100	6.4 \pm 3.5
0	1	10	7	36.6 \pm 2.3	36.7 \pm 5.2	100	15.1 \pm 4.3
3	0	30	7	23.1 \pm 3.7	22.0 \pm 5.5	100	0.1 \pm 0.1
0	3	30	6	27.7 \pm 1.7	35.8 \pm 3.3	100	7.0 \pm 2.4

²平均値 \pm SE

が少ない遠赤色光と青色光とを補光するためである。

結果および考察

培地のオーキシシン, サイトカイニン濃度とシュートの増殖・成長, 発根(実験1)

側球から切り出した茎頂外植体のシュートの伸長は'バンバ'実生系, '小池'の両系統ともホルモン・フリー区が最も良好で(第1, 2表), オーキシシン, サイトカイニンの添加はいずれの濃度においてもシュートの伸長を抑制し, 'バンバ'実生系ではIBAが10 μM 以上か2ipが30 μM 以上の添加で伸長が強く抑制された。また, '小池'ではIBAかNAAの3 μM と2ipの30 μM の混用で伸長が強く抑制された。

新シュートはホルモン・フリー区ではほとんど形成されなかったが, オーキシシンとサイトカイニンの添加によって形成が著しく促進された(第1, 2表)。これはニンニクと同様で(高樹ら, 1989; 高樹・水上, 1990; 高樹・曲, 1991), 混用の場合の最適濃度は'バンバ'実生系ではIBA 10 μM , 2ip 10~30 μM であった。'小池'でもシュート形成促進に対する2ipの最適濃度は'バンバ'

実生系と同様の10~30 μM と推定された。'小池'のシュート形成に対するオーキシシンの最適濃度に関しては, 3 μM 以下の濃度範囲内で, IBA, NAAともに1~3 μM が最適濃度といえる。なお, オーキシシンの種類によってシュート形成促進効果に差異が見られ, NAAのほうがIBAよりシュート形成促進作用の強い傾向が認められたが(第2表), NAAでは濃度が高くなるにしたがって(1 \rightarrow 3 μM), 葉のねじれや奇形のシュートが増加した。IBAではシュートの形態は高い濃度でも正常であった。アサツキの茎頂培養では添加オーキシシンとしてNAAは不適当で, IBAが適当と考えられる。

培養植物の発根は両系統ともホルモン・フリー区が比較的良好であったが, 'バンバ'実生系では10 μM 以上のIBAか30 μM 以上の2ipが添加されると発根が強く抑制された。また, '小池'では3 μM のIBAと30 μM の2ipの混用で発根が強く抑制されたが, NAAの0.1~3 μM の添加は発根を促進する傾向が認められた。IBAには本実験の濃度範囲内では発根促進作用が認められなかった。

第3表 アサツキの茎頂外植体の成長・発達に及ぼす低温培養の影響(実験2)

系統	培養期間		調査 植物数	最大シュート 長(mm)	新シュート数 /植物	新シュート形成 植物率(%)	根数/ 植物
	9 $^{\circ}\text{C}$	21 $^{\circ}\text{C}$					
置賜	0日	180日	10	79.2 \pm 4.9 ²	52.6 \pm 3.6	100	18.0 \pm 4.1
	60	120	12	64.0 \pm 3.4	10.5 \pm 1.5	100	0.8 \pm 0.4
東堀越	0	180	12	28.3 \pm 1.5	9.7 \pm 2.6	100	4.4 \pm 0.8
	60	120	12	65.3 \pm 7.1	1.1 \pm 0.5	67	0.6 \pm 0.3

²平均値 \pm SE

茎頂外植体の *in vitro* 低温処理とシュートの増殖・成長、発根（実験2）

‘置賜’と‘東堀越’両系統とも茎頂外植体の *in vitro* 低温処理によって新シュートの形成が抑制された（第3表）。これはニンニクとは逆の結果であった（高樹・曲, 1991）。本実験では供試球はすでに自然低温をかなり受けているが、アサツキは自然条件下では初秋に球が発芽して、越冬前に分けつ（側芽形成）することを考えると、アサツキには側芽形成のための低温要求はなく、シュートの生育に伴って側芽が順次形成されるものと思われる。したがって、*in vitro* 低温処理を行った区の新シュート形成数が少なくなったのは、培養温度が低いため、低温処理期間中はシュート形成を含む成長が抑えられたためと思われる。なお、‘東堀越’では低温処理区の新シュートの伸長がかなり良好であったが、これはこの系統の低温処理区の植物の新シュートの形成が極めて少ないため（約1本）、シュートの伸長成長の競合が少なくなり、低温処理期間中の成長抑制を差し引いても対照区が多シュート体よりシュートの伸長が良好になったためと考えられる。一方、‘置賜’では低温処理区の植物もある程度、新シュートを形成したため、この効果が見られなかったであろう。発根も低温処理によって抑制された。

液体培養と固形培地培養でのシュートの増殖・成長の比較（実験3）

固形培地（ジェランガム）で育成した多シュート体を引続き固形培地で継代培養するより、液体培地に継代して回転培養を行ったほうがシュートの形成と成長が優れ

ていた（第4表）。液体培養42日間では主軸シュートが平均14.3mm伸長し、新シュートが平均15.2本形成された。これに対して、固形培地では主軸シュートの伸長はわずかに3.9mmで、新シュートの形成も3.6本であった。培養をさらに続け112日間培養中に形成された新シュート数は、液体培養では平均45.5本であったが、固形培地培養では平均14.4本であった。第4表には主軸シュートと最長の新シュートの長さしかのせていないが、液体培養植物のシュートは全体的に成長が良好で、培養植物全体の量は固形培地のものより外観的にはるかに大きくなった。これは、液体回転培養では培養植物の培地からの栄養成分の吸収、光条件が固形培地培養より有利になるからであろう。両培養区とも一部の個体の基部に球状物が形成された。しかし、解剖した結果、これらの球状物は典型的な鱗茎ではなく、何枚かの普通葉の葉鞘基部が肥大したものであった。

液体培養植物のシュートは培養中にほとんど分離したので、シュートを1本ずつに分けて継代する時や順化のために外に植え出す時に労力的に容易であった。なお、液体培養を開始する時、シュートがまだ小さくて植物体のほとんどが培地の液体中に沈む場合には、成長がきわめて不良になったので、最初は固形培地などでシュートをある程度以上大きくしてから液体回転培養に移すことが必要であると考えられる。

以上の結果は、アサツキは液体回転培養を用いる茎頂培養法でシュートを大量に増殖することが可能であることを示した。その方法は、茎頂外植体を最初は約2カ月

第4表 ‘小池’の茎頂培養植物の継代培養方法（液体培養と固形培地培養）がシュートの成長・発達に及ぼす影響（実験3）

		液体培養	固形培地培養
培養開始時	主軸シュート長(mm)	68.2±9.9(15) ^a	68.4±6.0(15)
	最大新シュート長(mm)	52.2±6.7	57.2±6.3
	新シュート数	9.7±0.9	10.1±3.1
培養42日後	主軸シュート長(mm)	82.1±13.3(15)	72.3±6.1(15)
	最大新シュート長(mm)	68.2±7.5	63.5±6.2
	新シュート数	24.9±2.9	13.7±3.9
培養42日間の平均増加量	主軸シュート長(mm)	14.3	3.9
	最大新シュート長(mm)	16.0	7.7
	新シュート数	15.2	3.6
培養112日後	新シュート数	55.2±13.3(10)	24.5±7.6(15)
培養112日間の平均増加量	新シュート数	45.5	14.4

^a平均値±SE（調査植物数）

間 IBA 10 μ M, 2ip 10 μ M を含むジェランガムなどの固形培地で培養してシュートの増殖と伸長をすすめ(途中で1回継代), 次いで液体培地に継代して, 約3カ月間回転培養することである(途中で1~2回継代). この方法により'小池'では, 1茎頂から約35(固形培地上での増殖数)×4(液体培養中の増殖倍数)=約140本のシュートが5カ月後に得られた.

摘 要

アサツキの茎頂培養での *in vitro* 大量増殖法について検討した. 茎頂外植体をショ糖3%, ジェランガム0.2%のB5培地を用いて, 21 $^{\circ}$ C, 16時間日長で培養した場合, IBA 10 μ M, 2ip 10~30 μ M を含む培地で最も多くのシュートが形成されたが, シュートの伸長は添加オーキシンとサイトカイニンの濃度が高くなると抑制された. NAAの濃度が高くなると奇形のシュートが生じやすかった. 低温処理はシュート形成を促進しなかった. ある程度以上大きくなったシュートを液体培地に継代して回転培養(2rpm)すると, 固形培地に継代した場合に比べて, シュートの形成・成長が著しく促進された.

引 用 文 献

- 青葉 高. 1990. ネギ・ニンニクその他ネギ類基礎編. アサツキ. p.417-423. 農業技術体系野菜編8. 農文協. 東京.
- Novak, F. J. 1990. *Allium* tissue culture. p.233-250. In: Rabinowitch, H. D. and J. L. Brewster (eds.). Onions and allied crops Vol. I. CRC Pres Inc. Florida.
- 岡安俊明・富樫 博・栗田公司. 1980. 庄内砂丘におけるアサツキの系統選抜試験. 砂丘研究. 27: 19-27.
- 斎藤猛雄. 1990. 茎頂培養法. p.41-48. 最新バイオテクノロジー全書編集委員会編. 野菜の組織・細胞培養と増殖. 農学図書. 東京.
- 高樹英明. 1987. アサツキの生長力の季節的変動と休眠. 園学雑. 56: 60-69.
- 高樹英明・水上克朗・柴田千鶴子. 1989. ニンニクの茎頂の生長と不定芽発生に及ぼすオーキシンとサイトカイニンの影響. 園学雑. 58(別2): 234-235.
- 高樹英明・水上克朗. 1990. ニンニクの茎頂培養における小植物体の栄養生長と側枝発生に及ぼす無機多量要素. オーキシン並びにサイトカイニン濃度の影響. 園学雑. 59(別2): 326-327.
- 高樹英明・曲 英華. 1991. ニンニクの *in vitro* 小りん茎生産に及ぼす低温前処理, 生長調節物質及び日長の影響. 園学雑. 60(別1): 224-225.