

ウド (*Aralia cordata* Thumb.) の効率的な不定胚形成

野 口 貴

I 緒 言

ウドは、ウコギ科(Araliaceae)に属する多年生草本植物で、香辛野菜の一つとして食用されている。東京では立川市などの北多摩地域で栽培され、軟白軟化ウドとして市場に出荷されている。このウド栽培は根株養成と根株を用いた茎葉部の軟化栽培という二つの段階を持ち、実生を育成して収穫・出荷する一般の野菜栽培と大きく異なっている¹⁾。根株の養成には、出刃包丁等で切りわけされた根株が新しい種株として用いられ^{1) 2)}、いわゆる「株分け」がウドの栽培や品種・系統の維持の上で欠かせない作業となっている。ところが、この株分け作業は生産現場で大きな負担となっているため、株分け作業を伴わない幼苗利用などによるウドの栽培法が期待されている。

そこで、組織培養法を用いたウドの幼苗作出について検討を開始した。植物の大量増殖法としては茎頂培養法が汎用されているが、予備試験の結果、増殖率が低く大量増殖には不適當と判断された。一方、不定胚誘導法は、ウコギ科と比較的近縁なニンジンやセリリーなどのセリ科(Apiaceae)で多くの成功例が報告され^{3) 4) 5)}、東京都と同じくウド生産の盛んな群馬県では既にウドの不定胚系増殖法が試験されるなど^{6) 7) 8) 9)}、大量増殖法として有望な方法であると考えられた。

本試験は、幼苗育成までの過程について、特に不定胚形成率の向上を目的に行ったものである。

II 材料及び方法

1. 初期培養条件

ウド育成系統「北系10」の第二展開葉を採取し、0.5%次亜塩素酸ナトリウム溶液で表面殺菌後、約1cm四方の大きさに調整した葉片を約25℃、散光条件下で培養した。培地はMS培地¹⁰⁾を1/2または1/4倍希釈したものを基本とし、ショ糖濃度は0.1と0.2Mとした。また、2,4-Dを0.5または1mg/l加え、これらの組み合わせの中からエンブリオジーニックカルスと不定胚の形成に有効な培地条件を選定した。カルスから不定胚への誘導には2,4-Dを含まない固形培地を用いた。

2. 細胞塊の大きさと培養密度

2,4-Dを含む固形培地で得られたカルスのうち、遊離

細胞塊の見られるものを同組織の液体培地に移し、回転振とう培養(80rpm)によって1~数カ月間増殖した。増殖後、2,4-Dを除いた液体培地に交換し、回転振とう培養により不定胚を形成させた。この場合の細胞塊の大きさや培養密度が不定胚形成に及ぼす影響を調べた。液体培地の滅菌方法による違いについても併せて調査した。

細胞塊の大きさの選別については435、190 μ mの目間のナイロンメッシュを用い、435 μ m以上、435~190 μ m、190 μ m以下の3区分とした。

培養密度は、液体培地30ml当り細胞塊量を50、100、200、400 μ lとした。細胞塊量の計算は、液体培地とともに800rpm、5分間の遠心処理を行い、沈殿した細胞塊量を目安に行った。

培地の滅菌方法はオートクレーブによる蒸気加圧滅菌法と濾過滅菌法を用いた。

なお、供試品種は「北系10」及び「都」である。

3. 裏ごし操作と不定胚形成

カルスの液体培養において、メッシュ等を用いて細胞塊を物理的に細かくする「裏ごし操作」は、細分化能の高い細胞の選別・増殖に効果のあることが知られている¹¹⁾。そこで、ウド細胞塊の増殖時に裏ごし操作を加えた場合の効果について調べた。

裏ごし操作は、2,4-Dを含む液体培地で回転振とう培養を行っている細胞塊を435 μ mのナイロンメッシュの上で押しつぶす方法により行った。435~108 μ mの大きさの細胞塊を集め、新しい液体培地に継代した。裏ごし操作から次の裏ごし操作までの期間(継代周期)として7、10、20日間の3区を設けた。不定胚の形成状況は細胞塊の大きさと培養密度を調整した後に2,4-Dを含まない固形培地に継代して調査した。

次に、裏ごし後の細胞塊を20日間2,4-Dを含む液体培地で培養し、2,4-Dを含まない液体培地での不定胚形成の状況を調べた。この際の培養密度は培地20mlに対し細胞塊の量を10、20、30 μ lとした。

さらに、不定胚形成における固形と液体培地との違い、回転と静止培養法との違いの影響についても観察を行った。

4. 幼苗の育成

不定胚から幼苗を育成する方法について以下の3つを検討した。

①2,4-Dフリーの1/2MS液体培地で形成された不

定胚を15%ショ糖と0.2%寒天を含む溶液に混ぜて、1/4MS液体培地を含んだロックウール床に無菌的に液体蒔きした。不定胚を混ぜた溶液とロックウールに含まれる液体培地との比を1:10とし、液体蒔後の最終的なショ糖濃度が1.5%程度になるようにした。本葉が展開した後にロックウールごと流水にさらして糖分を洗い流し、ポットに移植した。

②細胞塊の大きさと密度を調整した後に、2,4-Dフリーの1/4MS固定培地に移植し、不定胚形成後、そのまま半順化させた。半順化は培養容器をサージカルテープで封をする方法に依った。

③2,4-Dフリーの1/2MS液体培地で形成された不定胚を、1/4MS固形培地に移植し幼苗へ生育させた。発根し本葉が展開した後にポットに移植した。

III 結果および考察

1. 初期培養条件

葉片から誘導されたカルスを継代して数カ月後には、高い分裂活性を有すると考えられる遊離細胞塊が生じた(第1図a、b、c)。遊離細胞塊を含むエンブリオジーニックカルスを2,4-Dを除いた培地に継代した場合には、速やかに成熟胚へと移行し、根の伸長や本葉展開が見られた。

エンブリオジーニックカルスや不定胚を誘導する際の培地の影響について第1表に示した。2,4-D濃度は0.5と1.0mg/lとでは不定胚形成率には大きな違いはみられなかったが、0.5mg/l添加の場合には段階の進んだ不定胚を形成する傾向にあった。基本培地は1/2MSが、ショ糖濃度は0.2Mが適していた。

なお、以下の試験では細胞塊増殖用の液体培地には0.5mg/lの2,4-Dと0.2Mのショ糖を添加した1/2MS培地を用いた。

2. 細胞塊の大きさと培養密度

細胞塊の大きさと培養密度が不定胚形成に及ぼす影響について第2表に示した。細胞塊が大きいほど細胞塊100μlあたりの不定胚形成数が多いものの、塊状や岐根状などの奇形状の不定胚が多くなった。190μm以下の細胞塊を用いた場合には不定胚形成数が著しく少なかった。一方、培養密度は低いほど細胞塊100μl当りの不定胚の形成数が増え、発育も進む傾向にあった。培養密度によって不定胚の成熟度が異なることから、密度の調整によって不定胚の発育速度または発育段階をある程度制御できると考えられた。

不定胚の形成率や形態から判断すると、与えられた条件の中では培地30mlあたり435~190μmの細胞塊を100~50μl培養することがよいと考えられた。

次に培地の滅菌方法についてみると(第3表)、いずれの培養密度の場合にも濾過滅菌法の方が多くの不定胚が得られ、効果のあることが明らかになった。

3. 裏ごし操作と不定胚形成

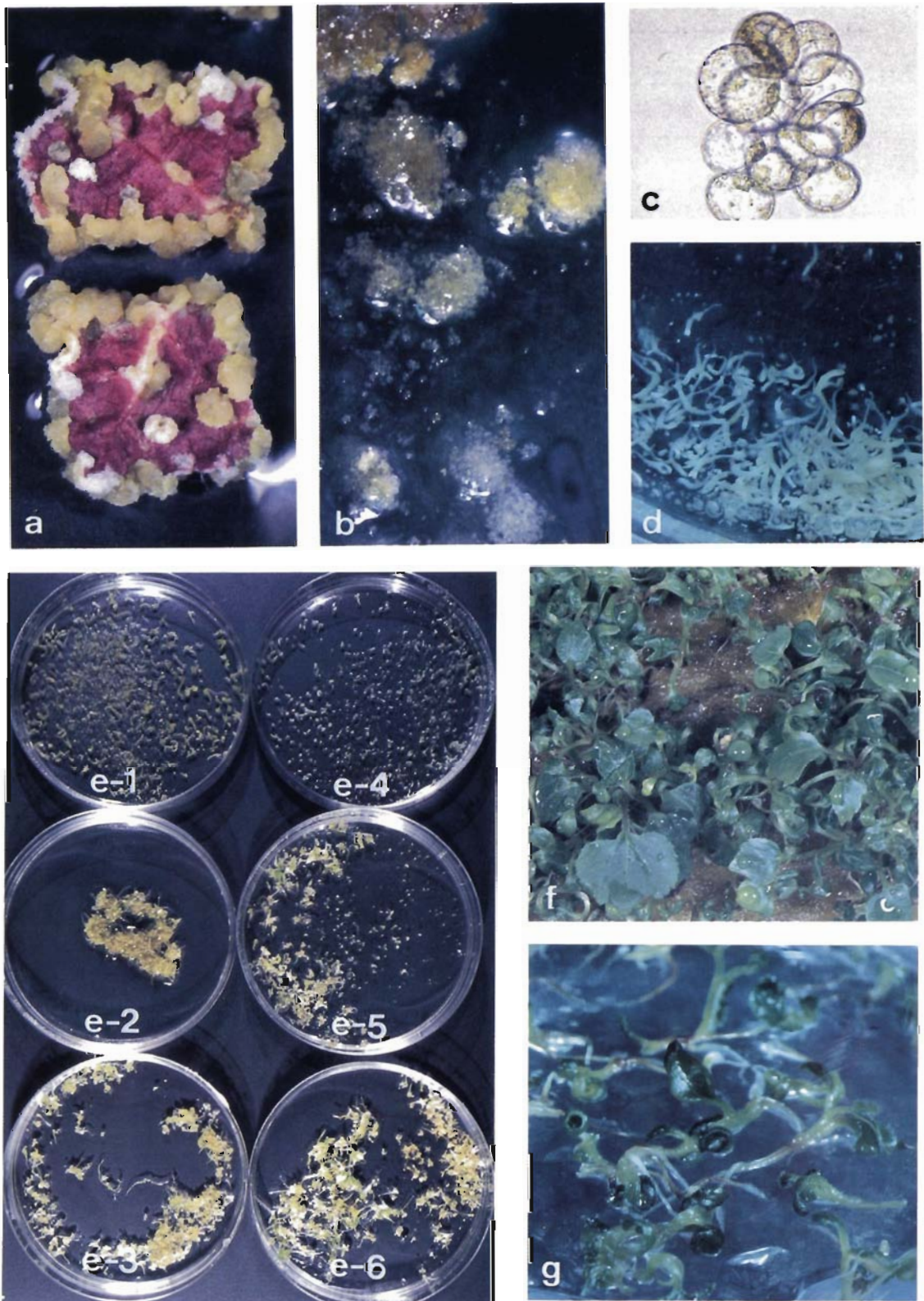
裏ごし操作を用いない場合の細胞塊は全体的に大きく、500~1000μm程度のもが多かった。それに対し、裏ごし操作を用いた場合、細胞塊は細くなり、500μm以下のものが相対的に増えた。その結果、100~200μm程度の細胞塊も収集でき、実験に供試できるようになった。

裏ごし操作を行った細胞塊を7、10、20日間培養し、その後、大きさと培養密度を調節して2,4-Dフリーの固形培地で不定胚形成させた場合の結果を第4表に示した。裏ごし操作から2,4-Dフリーの培地に継代するまでの期間の影響についてみると、期間が短い方が不定胚形成数が増える傾向にあった。細胞塊の大きさについては、108~190μmと190~435μmとでは、違いが明らかにならなかったが、培養密度は低いほど不定胚形成数が増えた。

第1表 不定胚形成に及ぼす初期培養培地組成の影響

培地組成			不定胚形成率(%)	不定胚の形状
MS	ショ糖(M)	2,4-D(mg/l)		
1/2	0.1	0.5	22.2	球状
1/2	0.1	1.0	11.1	球状
1/2	0.2	0.5	44.4	魚雷型
1/2	0.2	1.0	57.7	球状
1/4	0.1	0.5	0.0	
1/4	0.1	1.0	0.0	
1/4	0.2	0.5	19.2	球状・心臓型
1/4	0.2	1.0	11.5	球状

品種「北系10」、不定胚形成数は不定胚形成した葉片の割合



第1図. エンブリオジニックカルスと不定胚の形成

a: ウド葉片からのカルス形成

b: エンブリオジニックカルスの形成

c: 遊離細胞塊

d: 不定胚形成

e: 種々の条件での不定胚形成. e-1: 液体培地/回転培養. e-2: 液体培地+固形培地/回転培養. e-3: 固形培地/回転培養. e-4: 液体培地/静止培養. e-5: 液体+固形培地/静止培養. e-6: 固形培地/静止培養.

f: 不定胚の流体蒔によるロックウール上での幼苗形成.

g: 固形培地上での不定胚の発芽.

第2表 不定胚形成に及ぼす細胞塊の大きさと培養密度の影響

細胞塊の 大きさ	培養密度 細胞塊量/培地	不定胚形成数 (細胞塊100 μ l当たり)			特徴
		発根不定胚	稈状・魚雷状	球状~心臓型	
435 μ m以上	400 μ l/300ml	0 (0)	0 (0)	>300	
	200	0 (0)	>500	>300	塊状の球状胚
	100	52 (52)	604 (604)	>500	塊状の魚雷状胚
	50	112 (224)	162 (324)	>500	岐根状胚の発生
435-190 μ m	200	16 (8)	168 (83)	>300	
	100	71 (71)	158 (158)	>300	
	50	109 (218)	82 (164)	>300	根分化が早く大きい
190 μ m以下	200	27 (13)	32 (16)	-	
	100	39 (39)	60 (60)	-	
	50	9 (18)	16 (32)	-	

品種「都」

第3表 不定胚形成に及ぼす培地の滅菌方法の影響

培養密度	不定胚(3mm以上) 形成数 (細胞塊100 μ l当たり)	
	蒸気滅菌 (オートクレーブ)	濾過滅菌
800 μ l/20ml	-	0 (0)
600 μ l/20ml	15 (2)	-
400 μ l/20ml	-	49 (12)
200 μ l/20ml	49 (24)	144 (72)
100 μ l/30ml	83 (83)	145 (145)
75 μ l/30ml	61 (81)	124 (165)
50 μ l/30ml	25 (50)	102 (204)

品種「北系10」

第4表 裏ごし操作後の固形培地での不定胚形成

裏ごし操作から 継代培養までの 期間	細胞塊の大きさ	培養密度	不定胚形成数 (細胞塊100 μ l当たり)			
			子葉形成	魚雷状(3mm)以上	心臓型(3mm)以下	異常根型
7	108-435	10 μ l/20ml	23(230)	61(610)	200(2000)	29 (290)
10	108-190	10 μ l/20ml	1 (10)	10(100)	79 (785)	95 (950)
10	190-435	10 μ l/20ml	4 (40)	60(595)	117(1165)	108(1080)
10	108-190	20 μ l/20ml	5 (25)	87(435)	180 (900)	27 (135)
10	190-435	20 μ l/20ml	0 (0)	36(180)	282(1410)	1 (5)
10	108-190	30 μ l/20ml	5 (17)	36(120)	196 (653)	31 (103)
20	108-435	10 μ l/20ml	10(100)	48(480)	132(1320)	61 (610)

435 μ mの目間のナイロンメッシュで裏ごし操作を行い、液体培地で回転振とう培養し、細胞塊の大きさと培養密度を調整し、2, 4-Dフリーの固形培地で不定胚を形成させた(調査30日後、4反復平均値、品種「都」)

第 5 表 裏ごし操作後の液体培地での不定胚形成

培養密度	不定胚形成数 (細胞塊100 μ l当たり)				
	子葉形成	魚雷状(3mm)以上	心臓型	球状	異常根型
10 μ l/20ml	0	63(630)	504(5040)		2(20)
20 μ l/20ml	0	7(35)	276(1380)	>500(2500)	0
30 μ l/20ml	0	0	91(300)	>500(1650)	0

裏ごし操作後20日間液体培地で回転振とう培養し、190-435 μ mの大きさの細胞塊を2,4-Dフリーの液体培地で回転振とう培養(60rpm)し不定胚を形成させた(調査15日後、3反復平均値、品種「都」)

次に、液体培地での不定胚形成の状況を第5表に示した。この場合も培養密度が低いほど不定胚形成数が増え発育が進む傾向にあった。

第1図eには、培地や培養法を変えた場合の不定胚形成の状況を示した。固形培地では不定胚の形成が早かったが生育差や根部長さが異常に長いものが観察された。この傾向は第4表からも伺える。なお、固形培地を回転培養すると根部長さが絡む傾向にあった。一方、液体培地では、固形培地に比較して発育が遅いが揃っていた。液体培地では静止よりも回転培養の方が発育が早かった。

裏ごし操作を行わなかった場合(第2表)との比較を試みると、裏ごし操作によって不定胚形成率は明らかに向上していることが認められる。

以上から、裏ごし操作を行うとともに次のように培養

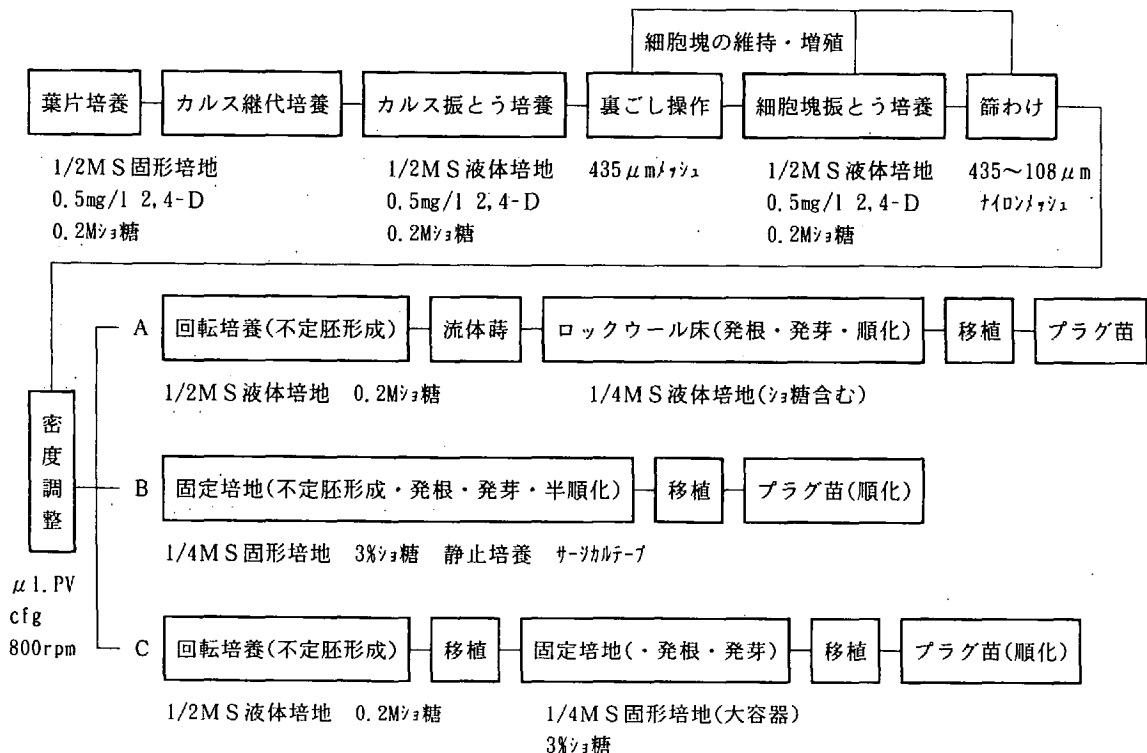
条件を設定すれば高率に不定胚が得られる。①細胞塊を裏ごした後7日間程度、同組成の培地で培養し、②108~435 μ m程度の細胞塊を集め、③20mlの液体培地に対して細胞塊を10 μ l加えた培養密度で回転振とう培養することである。

最適な条件下(第5表)での不定胚形成数は細胞塊1ml当たり5万個以上と試算された。

4. 幼苗の育成

これまでの試験を踏まえ、ウドのカルス誘導から幼苗の育成までのフローを考えた。不定胚から幼苗を育成する方法として3つの方法(第2図A、B、C)を試行した。

Aは液体培地で誘導された不定胚を流体蒔する方法である。不定胚を一つひとつ移植する手間がいらぬため



第 2 図 ウド大量増殖のフロー

省力的である。第1図fのようにロックウール床で幼苗に至ることが確認できたが、生育がばらついていた。

Bは固形培地上で不定胚を形成させ、発根や発芽、半順化まで行う方法である。Aと同じく移植の回数が少ないので省力的である。前述の試験で示されたように不定胚形成率は液体培養法による場合に比べて劣っていた。しかし、不定胚形成後の生育はAの方法に比べて早い傾向を示した。

Cの方法は、移植のための労力を要するが、不定胚形成率や幼苗へ生育する割合が比較的高いので確実な方法であると思われた。

これらの中では、確実性の点でCの方法が適当と思われたが、今後の検討次第でAの方法も活用できると考えられる。

IV 総合考察

高率的に不定胚を誘導するためには、①エンブリオジーニクカサの一次誘導、②分化能の高い細胞集団のスクリーニング、③不定胚形成の同調化、が重要であると考えられる。

エンブリオジーニクカサの誘導には、一般にオーキシンとして2,4-Dが多用されている。ニンジンなどでは0.5~1.0mg/l¹⁾、セリ、セルリー、アシタバなどでは0.1~1.0mg/l²⁾程度が添加され、既に報告されているウドの例でも0.5~1.0mg/lが有効とされている³⁾。エンブリオジーニクカサは二次的に出現するため、誘導に長期間かかるとされるが⁴⁾、本試験でも誘導に数カ月要した。しかし、一度誘導すれば増殖可能なので、実用上は問題にならないと考えられる。

一度エンブリオジーニクカサを誘導しても増殖する過程で様々な細胞が生じてくるため、再分化能の高い細胞集団をスクリーニングする必要がある。本試験の裏ごし操作を行っていない細胞塊の場合、不定胚を形成したのは表面の一部の細胞のようであった。これに対し、細胞塊を裏ごし操作することで淘汰圧が働き、再生力のあるコンパクトな細胞が急速に増えたと考えられる。

培養密度の調整によって、不定胚形成の同調化をある程度図ることが可能となった。既に、培地当りの細胞塊数をかえ魚雷型胚の誘導を同調化した報告も見られる¹²⁾。また、同調化に影響する他の要因として、ショ糖濃度や浸透圧の影響も指摘されているが¹³⁾、本実験や既に報告されているウドの例¹⁾でも同様な結果が得られた。

以上のように、不定胚形成の各段階の条件を検討することで不定胚形成が効率的になったが、今後の検討課題

として培養変異の問題が挙げられる。この場合問題となるのは軟化栽培に於ける形質である。また、葉片の培養から幼苗の育成までのフローを第2図に示したが、実際の育苗技術の体系化に当たっては環境条件や資材の活用方法などの詳細な検討が必要となろう。

V 摘要

効率的なウドの不定胚形成法を開発した。ウドの葉片を0.5mg/lの2,4-Dと0.2Mのショ糖を添加した1/2MS固形培地で培養し、エンブリオジーニクカサを誘導した。エンブリオジーニクカサを液体培養により増殖し、2,4-Dを含まない培地に継代したところ不定胚が形成された。エンブリオジーニクカサの増殖時における裏ごし操作は不定胚形成率を高めた。不定胚誘導に於ける細胞塊の大きさや培養密度は不定胚形成率に大きく影響し、最適な条件は細胞塊の大きさを108~435 μ mとし、培養密度を液体培地20ml当り細胞塊量を10 μ lとすることであった。この場合、細胞塊100 μ l当り5000個の不定胚を誘導できると推察された。これらをもとに葉片培養から幼苗育成までの体系化について考察した。

引用文献

- 井田昭典 (1989). ウド栽培の基礎- 野菜園芸大百科11. 農文協編, 367-385.
- 森研史 (1993). ウドの品種と軟化生産. 施設園芸10, 1-13.
- 西村繁夫・斉藤猛雄・山口真美子 (1991). 不定胚形成の現状と誘導技術. 農耕と園芸 (別) バイオホルティ5. 誠文堂新光社, 8-15.
- Bhojwani, S. S. and Razdan, M. K. (1983). Somatic embryogenesis. Plant tissue culture. Elsevier, Amsterdam, 91-112.
- 遠藤柳子・庄子孝一 (1994). セリ, セルリー及びアシタバの体細胞不定胚形成. 宮城農報60, 65-75.
- 池田洋・木村康夫・亀谷寿昭 (1987). ウドの不定胚利用による大量増殖法の開発 (第1報) 葉片由来カサからの不定胚形成と植物体分化. 園学要旨, 昭62秋, 262-263.
- 池田洋 (1988). ウドの不定胚利用による大量増殖法の開発 (第2報) 不定胚形成に及ぼす培地条件の影響. 園学要旨, 昭63秋, 256-257.
- 池田洋・山田文典 (1990). ウドの不定胚形成に及ぼす温度と光条件の影響. 園学雑59別2, 298-299.

9. 山田文典・池田洋 (1990). ロックウール及び底面給水を用いたウド不定胚の簡易順化法. 園学雑59別2, 300-301.
10. Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bilassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473-497.
11. 小田文明・金治龍・吉田康二・大槻義昭 (1989). イネ液体細胞培養系の早期安定化・大量増殖及び効率的再分化. 育雑39別2, 58-59.
12. 大菅康一・駒嶺穆 (1991). 不定胚分化の同調化. 第12回植物組織培養学会シンポ要旨, 53.
13. Kamada, H., Ishikawa, K., Saga, H. and Harada, H. (1993). Induction of somatic embryogenesis in carrot by osmotic stress. *Plant Tissue Culture Letters.* 10(1), 38-44.

An efficient somatic embryogenesis in Udo (*Aralia cordata* Thumb.)

Takashi NOGUCHI

S u m m a r y

An efficient method for somatic embryogenesis was established in Udo (*Aralia cordata* Thumb.). Embryogenic calli were induced from the leaf explants on a half-strength Murashige & Skoog solid medium containig 0.2M sucrose and 0.5mg/l 2,4-D. The embryogenic cell-clusters were proliferated via suspension culture. Somatic embryos were induced by culture of the cell-clusters in auxin-free medium. It was effective for embryogenesis to strain the cell-cluster through a nylon sieve at subculture. Embryogenesis was also influenced by the cell-cluster size and culture density. The largest number of embryogenesis was obtained by culturing 10 μ l of cell-clusters between the size of 108 and 435 μ m in 20ml liquid medium. In that case, more than 5000 embryos could be obtained from the 100 μ l of cell-clusters. Seedling production system via embryogenesis is proposed in Udo.