

アスパラガスの不定胚形成による大量増殖

第2報 メリーワシントン500W実生からの不定胚形成と植物体再生及び馴化条件の検討

甲村 浩之・長久 逸・池田 好伸

キーワード: アスパラガス, 不定胚, 胚様体, 大量増殖, 馴化

アスパラガス (*Asparagus officinalis* L.) の品種ポートムからの不定胚形成及び植物体再生については前報¹⁾で報告した。しかし、不定胚を形成する **embryogenic callus** の誘導率が20%前後と低いことや不定胚からの効率的な植物体再生条件の解明など未解決の問題が多く残されている。不定胚利用技術を安定的な大量増殖系として開発し、広島農試で育成した収量性の高い四倍体セトグリーン・三倍体ヒロシマグリーン^{2,3)}の普及に利用するためには、不定胚を形成する **embryogenic callus** の効率的誘導条件をはじめ、不定胚からの植物体再生条件、馴化条件の検討及び培養変異の確認を行なう必要がある。このため、本実験では育成品種の親品種であるメリーワシントン500Wの実生を用いて **embryogenic callus** 誘導、効率的な植物体再生、馴化の諸条件について検討するとともに培養変異及び不定胚の形態についても観察し若干の知見を得たので報告する^{4,5)}。

まず、実験1として **embryogenic callus** 誘導について植物ホルモンの1)オーキシンの添加濃度、2)サイトカイニンの添加濃度、3)糖の添加濃度、4)その他の条件等について検討した。また、5)として不定胚からの植物体再生培地の条件を検討した。

embryogenic callus の誘導には、前報でMS培地にオーキシンの2, 4-Dを 10^{-5} M添加することが適当であった。しかし、誘導率は10~20%と低く安定しないため、1)ではその他オーキシン類を含めた **embryogenic callus** 誘導条件について再検討した。2)では、予備実験で2, 4-Dを 10^{-5} M添加したMS培地にBA(ベンジルアミノプリン) 10^{-6} Mを添加して培養するとカルスの誘導率は高まったが、**embryogenic callus** は誘導できなかった。そのため、天然サイトカイニンのゼアチン(Zea)やイソペンテニルアデニン(2ip)が生体内で代謝される⁶⁾ことから、処理直後に高いサイトカイニン生

理活性を与え、**embryogenic callus** 誘導率の向上を目的としてこの実験を行なった。3)は、**embryogenic callus** 誘導に適当な糖の種類と濃度について検討した。4)は、**embryogenic callus** 誘導におけるその他の条件として、有機微量要素や光条件について検討した。さらに、5)については、不定胚から植物体が全く再生しないもの、発根するだけに留まるものなどがあり、植物体再生の効率化を目的に実験を行なった。

次に実験2として、不定胚を用いた苗化技術を開発するためには、再生植物の馴化技術の確立と変異性の確認が重要であり、また正常な不定胚の形態を把握する必要があると判断した。そのため、まず1)として、試験管内で不定胚から再生した幼植物を定植苗として圃場に出すための馴化養成条件について検討した。次に2)として不定胚から再生した植物の遺伝的安定性を調べるために染色体数の変異について調査した。また、3)として、不定胚は外観的な形状の差が大きく、単離は容易だが茎頂分裂組織と根端の分裂組織を備えた不定胚と呼べる組織かどうか不明確であった。そのため著者らは、Reuther⁷⁾が行っているような組織学的研究が必要と考え、約3mmに生長した不定胚の組織切片をグリコールメタクリレート樹脂包埋⁸⁾により作製し観察した。

材料及び方法

1. **材料:** 品種メリーワシントン 500W (井谷種苗・昭和61年採種)を用いた。以下の実験1の1)~4)のカルス誘導は、前報と同様に無菌播種し、発芽した実生第1次茎の草丈が2~4cm、根長が約3cmの時点で材料とし、頂芽から2cm以内の約5mm長の茎切片を供試した。その他の材料については適宜記す。
2. **培地の調整及び培養条件:** 基本培地は前報と同様に

MS 培地あるいは LS 培地を用い、特に断らない限り、 pH 5.8、寒天 0.8% に調整しオートクレープで滅菌した。

カルスの誘導には茎切片を 1 試験管当たり 2 本または 3 本置床し、 25°C ・暗黒下で培養した。誘導したカルスは径 2 mm 以上のものを計数した。また、ホルモン無添加培地移植後のカルスは 25°C ・ $1500\sim 3000\text{lx}$ ・12 時間照明下に移して培養を続けた。

3. 実験方法

実験 1. Embryogenic callus 誘導と不定胚形成および植物体再生における培地条件の検討

1) Embryogenic callus 誘導とオーキシシン

MS 培地を基本として、 $2, 4\text{-D}$ を 10^{-5}M または 10^{-6}M 、ナフタレン酢酸 (NAA)、インドール酢酸 (IAA) 及びインドール酪酸 (IBA) を 10^{-4}M または 10^{-5}M 添加し培養した。

2) Embryogenic callus 誘導とサイトカイニン

$2, 4\text{-D}$ 10^{-5}M または 10^{-6}M を添加した MS 培地を基本とし、BA、ゼアチン、2ip の 3 種類のサイトカイニンを 10^{-5} 、 10^{-6}M 添加して培養した。

3) Embryogenic callus 誘導及び不定胚の形成と糖添加

$2, 4\text{-D}$ 10^{-5}M 添加の LS 培地を基本とし、 D 糖 2, 3, 5, 10%, フラクトース 3%, グルコース 3%, ガラクトース 3%, D 糖 2% とフラクトース、グルコースを 1% ずつの組合せ 10 水準で培養した。また、誘導した embryogenic callus は切片移植 80 日目に、 $2, 4\text{-D}$ 無添加で前培養と同じ糖濃度の MS 培地に移植し、不定胚形成と添加した糖の種類と濃度の関係について 30 日後に調査した。また、これらの培地で得られた不定胚および不定胚様の組織は、さらに $2, 4\text{-D}$ 無添加の MS 培地 (D 糖 3%) に移植し、40 日目に植物体の再生状況について調査した。

4) その他の embryogenic callus 誘導条件

有機微量要素の添加と embryogenic callus 誘導について検討するために、 $2, 4\text{-D}$ 10^{-5}M を添加した無機塩類のみの MS 培地を基本として、イノシトール (100 mg/l)、チアミン (0.4 mg/l)、ピリドキシン (0.5 mg/l)、ニコチン酸 (0.5 mg/l)、グリシン (2.0 mg/l) 及びビオチン (0.5 mg/l) の単用及びこれらを混合施用して培養した。また、光条件について、 $2, 4\text{-D}$ 10^{-5}M を添加した LS 培地を用い、 1500lx 前後の照明下と暗黒下で培養し embryogenic callus の誘導を試みた。

5) 不定胚からの植物体再生とホルモン濃度

$2, 4\text{-D}$ 10^{-5}M 添加の LS 培地で誘導した embry-

genic callus を $2, 4\text{-D}$ 無添加の LS 培地に移植して 60 日目の半分緑化した白色不定胚 (3~6 mm) をピリドキシン 0.5 mg/l、ニコチン酸 0.5 mg/l を添加した LS 培地に IAA とゼアチンを 12 水準添加して培養した。

実験 2. 再生植物の馴化条件の検討、培養変異の確認及び不定胚の形態観察

1) 再生植物の馴化条件の検討

$2, 4\text{-D}$ 10^{-5}M 添加の LS 培地で誘導した同じ embryogenic callus 由来の再生植物 (草丈約 64~67 mm 根長約 39~47 mm) を用い、バーミキュライトを入れた 4 号黒ポリ鉢に植え、透明蓋付きの食器入れの中のすのこ上に並べた (第 1 報¹⁾ 参照)。この際、すのこの上まで水が浸るようにして、A: 恒温恒湿槽 (日本医科製、 25°C 、湿度 70%, 4000lx ・12 時間照明)、B: 大型培養槽 (広島設備開発製、 $20\sim 23^{\circ}\text{C}$ 、加湿器無しで湿度 40~50%, 約 $1000\sim 1800\text{lx}$ 連続照明)、C: 馴化室 (広島設備開発製 $23^{\circ}\text{C}/15^{\circ}\text{C}$ 昼夜、湿度 60%, 自然光を 1/5 遮光し昼間で約 5000lx) の 3 条件で馴化した。馴化時期は 3 月中旬で、灌水は 10 日おきにすのこ上に水が浸るように加えた。

2) 再生植物の染色体数変異の確認

上記の馴化植物体、22 株の新しく伸長した茎の頂芽部を用い、酢酸オルセインで染色後、押しつぶし法で染色体を観察した。①前処理; 頂芽を 0.002 M ヒドロキシキノリンに 20°C ・6 時間浸漬した。②固定; エタノール: 酢酸 (3:1) 溶液に 5°C ・1 日以上浸漬。③解離; 1N 塩酸: 45% 酢酸 (1:1) 溶液に 60°C で約 15 秒間浸漬した。④観察; 茎頂組織を切りだして染色後、押しつぶし法にてプレパラートを作製し、1 株当たり 3~5 細胞観察した。

3) 不定胚の形態観察

約 3 mm に生長している不定胚の組織切片を作製した。

①固定; 不定胚を 10% ホルマリン液に 5°C ・14 時間浸漬した。②脱水; 5°C で 2-メトキシエタノールに 8 時間、100% エタノールに 13 時間浸漬後、 0°C で n -プロパノールに 24 時間、 n -ブタノールに 8 時間浸漬し脱水した。③モノマーの浸透; モノマーミクスチャー (イオン交換樹脂・Amberlyst A-21 を通して純化したグリコールメタクリレート・Metholate G 94.5%, 2, 2'-アゾビス 0.5%, PEG 400 5.0% 混合液) に試料を入れて浸透させ 5°C ・約 12 時間で 3 回交換した。④包埋; 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する。これを、オープンに入れ 40°C ・2 日、さらに 60°C で 1 日おいて重合した。⑤切片作成; ミクロトームで約 $2\mu\text{m}$ の切片を作製。⑥染色; トルイジンブルーで染色し、洗浄して乾燥後観察した。

結 果

実験1. Embryogenic callus 誘導と不定胚形成および植物体再生における培地条件の検討

1) Embryogenic callus 誘導とオーキシン濃度

移植60日後の結果 (table 1.) では、IAA と IBA 区は 10^{-4} M または 10^{-5} M 区のいずれも培養30日目から不定芽・不定根を分化した。NAA 区は 10^{-4} M または 10^{-5} M 区いずれも50日目頃に黄白色のカルスが誘導されたが、その後、不定根を多く分化した。2, 4-D 10^{-6} M 区では50日目頃には一部黄白色のフライアブルなカルスを得たが、それ以外の多くのカルスではその後不定根を多

く分化した。2, 4-D 10^{-5} M 区では、低率であるが embryogenic callus を誘導し、器官分化もないため、以後の培養にはこれを用いることにした(写真A)。なお表には示していないが照明下でも同様の結果を得た。

2) Embryogenic callus 誘導とサイトカイニン

移植60日後の結果 (table 2.) では、2ip 10^{-6} M 添加区で黄白色のフライアブルなカルスが得られ、形状的には embryogenic callus であったが、2, 4-D 無添加培地移植後に不定胚を形成しなかった。また、GA₃ を 1 mg/l 添加したゼアチン 10^{-6} M 区でも黄白色でフライアブルなカルスが得られ、このカルスでは2, 4-D 無添加培地に移植後、不定胚を形成し植物体に再生した。なお、対照の2, 4-D 10^{-5} M のみの添加区では、embryo-

Table 1 Effect of auxins on callus induction from young primary shoot.

auxin	(M)	Number of test	Number of induction			
			callus	embryogenic callus	organ differentiation	
					shoot	root
2,4-D	10^{-5}	20	13	1	—	—
	10^{-6}	20	13	1	—	11
NAA	10^{-4}	20	4	—	—	1
	10^{-5}	20	10	—	—	8
IBA	10^{-4}	20	11	—	—	9
	10^{-5}	20	18	—	1	18
IAA	10^{-4}	20	9	—	3	9
	10^{-5}	20	5	—	5	1

After 60 days culture.

Table 2 Effect of cytokinin on callus induction from young primary shoot.

2,4-D (M)	Cytokinin (M)	Number of test	Callus induction			Callus form ^{a)}			Organ differentiation ^{b)}	
			Number	(%)	Diameter (mm)	F	M	C	S	R(WR)
10^{-5}	—	20	12	60.0	3.1	3(2)*	1	9	1	—
	BA 10^{-6}	20	20	100.0	6.1	—	20	—	—	—
	Zea 10^{-5}	20	20	100.0	5.3	—	20	—	—	—
	Zea 10^{-6}	20	20	100.0	5.5	9(0)	20	—	—	1(3)
	2ip 10^{-5}	20	20	100.0	6.6	15(0)	—	—	—	3
	2ip 10^{-6}	20	19	95.0	5.5	23(3)	16	—	—	4
10^{-6}	BA 10^{-6}	20	20	100.0	6.6	—	—	20	—	—
10^{-5}	BA ^{c)} 10^{-6}	20	19	95.0	5.7	—	4	16	—	—
	Zea ^{c)} 10^{-6}	20	17	85.0	4.8	5(2)*	17	—	—	—
	2ip ^{c)} 10^{-6}	20	20	100.0	6.1	1(0)	20	—	—	—

a) Callus form; F: friable M: medium C: compact, (): like embryogenic callus.

*: Confirmed embryogenic callus by replacing LS hormone free basic medium.

b) S: shoot, R: root, (WR): white root

c) GA₃ 1mg/l added

Table 3 Effect of sugars on embryogenic callus induction from young primary shoot.

Sugars	Concentration (%)	Number of culture	Number of callus induction	Embryogenic callus induction				Somatic embryo formation
				Number	(%)	Diameter ^{a)} (mm)	Area ^{b)} (mm ²)	
Sucrose	2	62	19	3	4.8	6.3	121	1
	3	63	20	2	2.9	12.2	300	1
	5	60	20	6	10.0	3.6	80	4
	10	63	2	1	1.6	2.0	4	2
Fructose	3	60	1	1	1.7	14.1	200	1
Glucose	3	59	23	6	10.2	6.8	276	2
Galactose	3	24	0	0	0	0	0	0
Suc 2% + Fru 1%		61	15	4	6.6	2.7	29	0
Suc 2% + Glu 1%		61	28	3	4.9	7.3	160	2
Suc 2% + Fru, Glu 1%		61	14	2	3.2	9.1	165	0

After 60 days culture. a) Average diameter b) The total area

Table 4 Effect of sugars on somatic embryo formation from embryogenic callus.

Preculture ^{a)}		Hormone free medium		Somatic embryo formation ^{b)}			Plant regeneration ^{c)}
Sugars	Concentration (%)	Sugars	Concentration (%)	Number of embryo	Color	Form	
Sucrose	2	Sucrose	2	+++	GW	thin banana	little
	3		3	++	W, GW	banana or spindle	good
	5		5	+	W	spindle(hard)	good
	10		10	+	WB	shrank spindle	good
Fructose	3	Sucrose	3	++	GW	spindle	—
		Fructose	3	++	GW	spindle	—
Glucose	3	Sucrose	3	+++	GW	banana or spindle	good
		Glucose	3	+	W	spindle	—

a) Added sugars for callus induction.

b) 30 days culture in MS hormone free medium after embryogenic callus planted.

Intensity graded +(a little) to +++(many). Embryo color; G: green W: white B: brown

c) 40 days culture in MS hormone free medium after somatic embryo isolated.

—: no examination

genic callus を誘導したが、この対照区で embryogenic callus が簡単に区別できるのに対し、サイトカイニンを添加した区では他の形状のカルスの表面や中に混在し、区別するのが困難であった(写真B)。

3) Embryogenic callus 誘導及び不定胚の形成と糖添加

移植60日後の結果 (table 3.) では、しょ糖濃度5% 区で embryogenic callus 誘導率は10%と最も高く、カルス径でみた増殖率は同3%区で高かった。他の糖類では、グルコース添加区が、embryogenic callus の誘導率・増殖率ともに高かった。しかし、フラクトース、ガラクトースではカルス形成が抑制され、特にガラクトースは全く誘導しなかった。しょ糖と他の糖との組合せ

では、3~6%の embryogenic callus が誘導されたが、特に糖の組合せによる効果は認められなかった。

また、得られた embryogenic callus を2,4-D無添加の前培養と同糖濃度の培地に移植して30日後に調査した結果 (table 4.) では、しょ糖濃度2%区では長さ3~4mmの上半部が緑化した白色不透明の細いバナナ型の組織が多く得られ、ほとんどのものは植物体に再生しなかった(写真C)。また、しょ糖濃度3%以上の高濃度培地で得られた紡錘型やバナナ型の組織 (写真D) は植物体再生率が高かった。特に、しょ糖10%区では萎縮した細い白色の不定胚が得られ、しかも多くの不定胚の表面が一部褐変化していた (写真E) が、ほとんどが植物体に再生した。

4) その他の Embryogenic callus 誘導条件

有機微量要素無添加区やイノシトールのみの添加区では、移植60日後には embryogenic callus は誘導されなかったが、これにチアミンを添加 (LS 培地と同組成) すると誘導された。イノシトールとチアミンに加え、ニコチン酸を添加した区では25%と誘導率は高くなった。しかし、MS 培地に通常含まれるグリシンの添加区では、低率あるいは全く誘導されなかった。また上記6種類の有機微量要素を全て添加した区では全く誘導されなかった。

また、embryogenic callus 誘導と光条件について検討した結果、照明下、暗黒下のいずれでも誘導された。しかし、暗黒下で誘導した embryogenic callus は明

らかに黄白色を呈し判別が容易であった。さらに、2, 4-D 無添加培地移植後の不定胚の形成は、照明下では半分緑化した白色不透明な不定胚を生じ、そのまま植物体に再生した。しかし、暗黒下では白色不透明な不定胚を生じ白色根の発生までみられたが植物体は再生しなかった。なお、この不定胚は別の2, 4-D 無添加培地に移植し、照明下で培養することで植物体に再生した。

5) 不定胚からの植物体再生とホルモン濃度

不定胚からの植物体再生条件を検討した結果(table 5.) IAA, ゼアチン無添加区でも50%は植物体に再生した。しかし、IAA を無添加または低濃度 (10^{-7} M, 10^{-8} M) でゼアチンを 10^{-7} M添加した区では、約77%の高率で植物体に再生した。多くの不定胚では、移植10日目までは

Table 5 Effect of hormones on plant regeneration from somatic embryo.

Medium No.	hormones(M)		Number of test	Plant regeneration		White root formation ^{a)}
	IAA	Zea		Number	(%)	
1	0	0	18	9	50.0	7
2	0	10^{-8}	18	9	50.0	7
3	0	10^{-7}	18	13	76.5	4
4	10^{-8}	0	18	10	55.5	6
5	10^{-8}	10^{-8}	18	10	55.5	6
6	10^{-8}	10^{-7}	18	14	77.7	3
7	10^{-7}	0	18	9	50.0	9
8	10^{-7}	10^{-8}	18	12	66.6	5
9	10^{-7}	10^{-7}	18	14	77.7	5
10	10^{-6}	0	18	12	66.6	7
11	10^{-6}	10^{-8}	18	7	38.8	11
12	10^{-6}	10^{-7}	18	8	44.4	4

After 60 days culture. ^{a)} Non plant regeneration.

Table 6 Habituation of plantlets regenerated from somatic embryo.

Habit-Number uation type	of test	Average		Number of thick white root	Average root length (mm)	Shoot viabi- lity after 20days	After 60 days culture					
		Plant height (mm)	Number of shoot				Number of viable shoot	Plant height (mm)	Number of shoot	Number of thick white root	Average root length (mm)	Average number of root
A ^{a)}	20	67	4.9	13	39	17	20	141	2.4	19	78	2.7
		±2.2	±0.56		±3.1			±13.3	±0.29		±9.2	±0.30
B ^{b)}	20	64	4.9	14	47	7	13	227	1.2	9	64	2.5
		±2.7	±0.47		±3.5			±31.0	±0.12		±5.2	±0.44
C ^{c)}	20	67	4.5	14	41	10	13	83	1.6	12	62	1.7
		±1.8	±0.59		±2.2			±11.1	±0.27		±5.2	±0.26

^{a)} Room temperature: 25°C, humidity: 70%, Light: 4000lx, Period 12h/day

^{b)} Room temperature: 20-23°C, humidity: 40-50%, Light: 1000-1800lx, Period 24h/day

^{c)} Room temperature: 23°C/15°C, Period 12h/day, humidity: 60%, Light: 1/5natural light(max 5000lx)
±: standard error

白色根を発生しただけであったが、25日目にはほぼ完全な植物体を再生し、そのまま放置すると、二次的に不定胚を形成し植物体に再生するものも認められた。

実験2. 再生植物の馴化条件の検討、培養変異の確認及び不定胚の形態観察

1) 再生植物の馴化条件の検討

再生植物の馴化結果 (table 6.) は、パーミキュライト移植から2カ月後に、素焼き鉢へ移植する時点で調査した。Aの恒温恒湿槽では、供試した20株全てが生存し、その草丈は平均141mmであった。この中には根径2mm程度の太い白色根保有株も19株みられた。Bの大型培養槽では草丈が平均227mmと最も高く伸長していたが、徒長気味であった。生存株が13株、白色根保有株は9株と少なかった。Cの馴化室では草丈は平均83mmと最も低く、生存株も13株、白色根保有株も12株と少なかった。この結果、湿度が70%と常に高い恒温恒湿槽が馴化率100%で最も高く、パーミキュライト移植時に太い白色根を有しないものも、馴化中に太い白色根を形成した。また、馴化後の草丈が150mm程度で、茎数も2.4本/株で他条件に比較して良好であった。なお、試験管から移植した時点で有していた茎は、恒温恒湿槽で馴化してもほとんど乾燥して枯れたが、新たに出た若茎はこの湿度70%の環境に順応して旺盛に生育した。

2) 再生植物の染色体数変異の確認

不定胚から再生した植物の染色体数について調査した結果、21株の染色体数は $2n=20$ を示していた。1個体だけ倍数化して、 $2n=40$ の4倍体のものがみられたが異数体は確認されなかった。

3) 不定胚の形態観察

不定胚の組織切片をグリコールメタクリレート樹脂包埋により作成し観察した結果 (写真G, 再生植物写真Fを参照) では、茎頂分裂組織(a)と根端の分裂組織(b)の2極を備え、維管束様の組織(c)を有していた。また、通常の発芽では種子の中から外に出て来ない子葉に当たると考えられる部分(d)も認められた。

考 察

不定胚利用技術を安定した大量増殖系として開発するためには、不定胚を形成する embryogenic callus の効率的誘導条件、不定胚の形成と植物体再生条件、作出した植物体の馴化条件および培養変異の確認を行なうことが重要である。

実験1では、品種メリーワシントン500Wの embryo-

genic callus 誘導と不定胚形成および植物体再生条件を確立するため、前報の品種ポルトムで検討した条件を参考にして添加するオーキシン、サイトカイニン、糖などの条件について検討した。

1. Embryogenic callus の誘導条件

まず、embryogenic callus 誘導の効率化の検討のために前報に続き再度オーキシンの添加について検討した。その結果、不定胚形成による大量増殖では、不定芽・不定根が早期に分化し embryogenic callus と混在させることは、液体振盪培養による増殖や将来的な同調化手法を組込む際に障害となると考えられたため、NAA, IAA および IBA など器官分化力の強いオーキシンを使用することは不適当であり、2, 4-D が最も適当と考えられた。また、2, 4-D濃度も 10^{-6} M では根分化が起きやすいため、 10^{-5} M程度が最も適当と考えられた。

しかし、これまでのアスパラガスの不定胚形成の報告のうち、Bui dan ha⁹⁾は、プロトプラストからの不定胚形成による植物体再生を初めて報告しているがNAA, BA を用い、2, 4-D は用いられていない。また、Reuther⁷⁾も2, 4-Dを用いず、NAA とサイトカイニンの組合せでカルスを誘導し苗条や根、不定胚の分化を観察しているが、特に大量増殖が目的ではなく形態学的・組織学的な分化研究を目的としているためと考えられる。なお、アスパラガスの不定胚形成を大量増殖に結びつける研究を最初に行なった Harada¹⁰⁾は、2, 4-D と NAA の比較を行なっているが、NAAの方が球状胚 (embryogenic callus はいわゆる embryogenic cell 集塊から球状胚にかけてのステージのものが混在) の誘導に極めて効果的と報告している。しかし、同程度の濃度ではカルス増殖、根の分化も多いなど問題もある。また、西沢ら¹¹⁾は、NAA と BA で embryogenic callus を誘導しているが、その中で継代培養にNAAを用いると根などの器官分化が激しいため、2, 4-Dを添加した培地に継代することで embryogenic callus の増殖に成功している。これらのことから、2, 4-Dを用いるのが適当と考えられ、以下の培地条件の検討にはオーキシンとしては2, 4-Dだけを用い、 10^{-5} Mの濃度を基本として添加した。

次に、サイトカイニンの添加については、添加することでカルス誘導率は高まったが、embryogenic callus の誘導は高濃度の 10^{-5} M添加では全くみられず阻害的であった。また、2ipの 10^{-6} Mなど形状的には embryogenic callus に類似していても、ホルモン無添加培地移植後に不定胚を形成しない場合もあった。このため、

サイトカイニンはカルス誘導は促進するが、カルスに残留するなどして細胞分裂活性を維持するため不定胚形成を阻害するのではないかと考えられた。また、ジベレリン GA_3 の添加では不定胚を形成した **embryogenic callus** を誘導したが、 GA_3 添加後にオートクレーブをかけているために分解していることも考えられる。これらのことを含めて現在、ゼアチンをさらに $10^{-7}M$ に濃度を下げて添加すると、Harada¹⁰⁾ のいう球状胚と考えられる組織が緑色のコンパクトカルス表面に多く形成されており、この集塊をホルモン無添加培地に移植すると正常な不定胚に発達するものがみられ、この結果として組織片あたりの誘導率向上を認めている。また、ニンジンではゼアチン $10^{-7}M$ 添加により不定胚形成が促進されるという報告¹²⁾があることなどから、アスパラガスでも同様に低濃度のゼアチンが **embryogenic callus** の誘導と不定胚形成に関与しているのではないかと考えられる。

糖の添加については、メリーワシントン500W からの **embryogenic callus** 誘導には、前報の品種ポールトムよりしょ糖濃度は少し高めの5%が適当と考えられた。他の糖としてグルコースはしょ糖と置き換えても特に差はないが、しょ糖を上回る効果は認められなかった。フラクトースでは1つだけ **embryogenic callus** を誘導していたが、これ以外はカルスも誘導できず、細胞分裂の初期には利用しにくいと考えられた。なお、ガラクトースでは組織片が褐変するだけでカルス形成は皆無であり、全く利用できないと考えられる。

2. 不定胚の形成と不定胚からの植物体再生

不定胚の形成には、高いしょ糖濃度(5~10%)で誘導した **embryogenic callus** を、同糖濃度のホルモン無添加培地に移植したものが、低い濃度(2%)で誘導し移植したものより植物体再生のよい不定胚を多く形成した。特に10%の高いしょ糖濃度で得られた不定胚は、多くは白色で萎縮し、しかも形成した不定胚の一部が褐変化したものも多かったが、ほとんど植物体に再生した。糖添加と不定胚形成の関係については、これまで平田¹³⁾がしょ糖濃度を高めることでアスパラガスの不定胚が正常に発達することを報告しており、高い糖濃度は高い浸透圧を与えることから、糖は炭素源としてだけでなくその浸透圧が正常な不定胚の発達に関与しているものと推測された¹⁾。なお、Masuda¹⁴⁾はニンジンの懸濁細胞培養を用い、多くの糖類を添加して不定胚の形成を検討しており、しょ糖で最も多くの不定胚が形成していることから、アスパラガスの場合も同様に特に他の糖類を添加す

る必要はないと考えられる。

さらに、ホルモン無添加培地に移植して不定胚を形成させた場合、多くの不定胚はそのまゝの状態では植物体に再生せず、再移植による植物体再生のための植物ホルモンの添加について検討した。その結果、成熟した不定胚を移植したのであれば、Bui dan ha⁹⁾が行なったように IAA やゼアチンなどのホルモンを培地に添加しなくても約半数は植物体に再生したが、特にゼアチン $10^{-7}M$ の添加は、再生率向上の効果があると考えられた。

3. その他の **embryogenic callus** 誘導、不定胚形成条件

基本培地を検討するための有機微量要素の添加では、無添加やイノシトールだけを添加した場合には **embryogenic callus** 誘導は認められなかったが、チアミン、ニコチン酸を添加すると誘導された。しかし、グリシンを添加すると誘導が困難となった。多くの研究者は培地にグリシン、ビオチン、葉酸などを添加しているが特に効果的であるとは考えられず、むしろ阻害的に働く場合も考えられる。

また、光条件を検討した結果では、**embryogenic callus** の誘導にはニンジンの場合¹⁵⁾と同様に特に光を必要としないと考えられた。また、暗黒下で誘導した **embryogenic callus** は、他の黄色透明なカルスに比べて黄白色となり、暗黒下で誘導する方が判別に都合がよいと考えられた。なお、不定胚からの植物体再生には種子発芽の場合と異なり光の必要性が考えられた。

4. **Embryogenic callus** の誘導における諸問題

一般にカルスの継代培養を繰り返すと変異が生じ易いと考えられており、短期間に大量増殖を行なうためには **embryogenic callus** の誘導率を高めてやることが重要である。実験1の結果、LS培地に2, 4-Dを $10^{-5}M$ 、しょ糖を5%、 $10^{-7}M$ 程度の低濃度のゼアチンを添加することが誘導率向上に効果的と考えられた。

しかし、これまで検討した結果、誘導率は10~20%程度と低く実用的な系とは認められない。この理由としては、培地条件の他にアスパラガスの種子が極めてヘテロな集団であることも一因と考えられる。同品種の圃場栽培でもその萌芽時期や草型は様々で、無菌播種でも発芽がかなり不揃いであった。本実験では種子から発芽したばかりの実生を材料としているため、それぞれの遺伝的性質の違いが **embryogenic callus** の誘導率を下げていると推測される。また、種皮の内部が雑菌に汚染されている種子も多いと考えられ、徐々に汚染が発生し供試数が少なくなったのも条件を決定できなかった一因であ

る。特に本実験に用いたメリーワシントン500Wの種子では、ポルトムと比較して雑菌汚染が多く、これまでの多くの無菌播種において雑菌汚染・発芽停止・茎が透明化するガラス化・未発芽を除くと約5割弱が正常に発芽したが、発芽時期の問題で実験に供試可能な個体数はかなり限定され、健全とみえてもカルス形成を全く示さずに褐変枯死する個体もみられた。

これら2つの理由から **embryogenic callus** の誘導率を向上させることができず、一定した細胞生理活性の高い材料を大量に得られる苗条原基様体¹⁶⁾あるいは多芽体¹⁷⁾の利用が効果的と考えられる。なお、**embryogenic callus** の効率化とともに誘導にも長期間(約40~80日)を要することから、西沢ら¹¹⁾が **embryogenic callus** を誘導後、2, 4-D高濃度添加培地に移植して増殖を図ることも検討しているように、継代培養による増殖が重要であると考えられる。しかし、先にも述べたように変異の拡大は否めず、前報の液体振盪培養を用いた増殖では、不定胚様組織は形成するが植物体に再生しにくく、継代増殖はこれからの課題である。

5. 馴化条件

苗化に向けての馴化条件の検討は、アスパラガスの場合、側芽培養法で得られた苗の馴化の方法が既に Yang ら¹⁸⁾によって報告され、温室内にジフィーポットを置きプラスチックシートで覆ったものでは90%相対湿度の間断ミスト下の方が70%相対湿度下よりよく馴化できたとしている。著者らは、培養槽および馴化室を利用して馴化条件を検討した。その結果、室温25℃・相対湿度70%に保たれた恒温恒湿槽では、再生植物を100%馴化することが可能であった。また、試験管内において、不定胚から正常に植物体に生育していれば、当初は細い白色根が発生した程度のもので太さ2mm程度の貯蔵根に発達しており、馴化に移した場合も高湿度条件を与えることで同様に貯蔵根を発達させることが可能であることが示された。アスパラガスでは、貯蔵根の形成が最も重要¹⁹⁾であり、地上部が枯れても地下部の貯蔵根となる白色根と鱗芽群が生存していれば容易に馴化可能である。しかし、低湿度下では地下部まで乾燥するために枯れる場合もあり、馴化時にはある程度高湿度を保つのがよいと考えられる。

6. 不定胚利用技術の遺伝的安定性

不定胚利用技術の遺伝的安定性の確認の一端として茎頂分裂組織細胞の染色体数を調査したが、22株中21株は2倍体 ($2n=20$) を示し、ほぼ安定的といえる。しかし、

4倍体を1個体得るなどの変異性は認められ、さらに多くの株の染色体数について調査する必要があると考えられた。

なお、アスパラガスの不定胚再生株の染色体数調査については具体的報告が見当たらないが、その他の作物では培養期間が長くなるにつれ増加するとか、カルス培養中に変異が起きやすいと一般にいわれている。しかし、不定胚再生植物の場合、正常な胚発達をしていく過程で異常細胞は脱落していくと考えられており²⁰⁾、観察したほとんどの植物体は2倍体で正常に生育しており、現在得られている1株の4倍体も今のところ生育に特に異常は認められない。今後、圃場栽培を行ない、開花による雌雄性の判断、萌芽時期、草型等の生理生態特性の調査も合わせ、変異性について検討する必要がある。

7. 不定胚の形態観察

アスパラガスの不定胚の形態観察については、器官分化の研究を目的として Reuther⁷⁾が既に行なっているが、著者らも不定胚の形態について観察することにより培地への置床の方法とか発育ステージについての判断に利用できるため、不定胚の組織切片を作成した。この結果、約3mmの不定胚には茎頂及び根端分裂組織が両方形成されており復極構造²¹⁾を示していた。また、形態的に同じ単子葉植物のコムギやイネの胚の形態に類似しており^{22,23)}、単離できる独立した組織であることから不定胚と確認した。また、この発育ステージまで発達した不定胚は、適当な培地・環境条件で容易に発芽・発根し完全な植物体に生長すると考えられる。

摘 要

アスパラガスのメリーワシントン500W 実生を用い、**embryogenic callus** 誘導の効率化、不定胚形成と不定胚からの植物体再生および馴化などの諸条件ならびに染色体数の変異について検討した。

1. **embryogenic callus** 誘導における添加オーキシンは、2, 4-D 10^{-5} M のみで効果があり、NAA, IBA, IAA では器官分化が多く不適当であった。このため、以後の実験では2, 4-D 10^{-5} M 添加を基本とした。

サイトカイニンの添加は、カルスの形成率は向上するが **embryogenic callus** 誘導には阻害的であった。しかし、特にゼアチン 10^{-7} Mの添加では、誘導率向上の効果が認められた。

糖添加では、しよ糖濃度5%あるいはグルコース3%

で **embryogenic callus** を効率よく誘導できた。不定胚の形成における糖添加では，5%と10%の高いしょ糖濃度で形成した不定胚では植物体に多く再生したが，2%で形成したものでは少なかった。

その他，有機微量元素ではチアミンとニコチン酸の添加が効果的であった。光は，**embryogenic callus** 誘導には特に関係ないが植物体再生には必要と考えられた。

2. 不定胚からの植物体再生は，ホルモン無添加のMS培地でも50%再生したが，ゼアチンを 10^{-7} M添加すると再生率が77%と高くなった。

3. 再生した幼植物は，パーミキュライトに移植し， 25°C ・湿度70%・4000 lx・12時間照明の恒温恒湿槽で生育させるとほぼ100%馴化できた。

4. 再生植物22個体のうち，21個体の染色体数は $2n=20$ であったが，1個体は $2n=40$ と変異性が認められた。

5. 寒天培地で得られた約3mmの不定胚は，茎頂と根端分裂組織を合わせもつ複雑構造を示し，このステージまで発達させれば容易に植物体に再生すると考えられた。

謝 辞

本研究を進めるにあたり，広島大学総合科学部倉石晉教授，同理学部谷口研至講師及び大学院生・岡田昌久氏（現高知県園芸試験場）から有益な御指導とご助言をいただいた。また当農業試験場の生物資源開発部及び園芸部諸氏にも御助言，御協力をいただいた。ここに深く感謝の意を表する。

引用文献

- 1) 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
- 2) 沖森 當・寛 三男・長谷川 繁樹・谷口義彦：1984. 倍数性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育成. 広島農試報告 **48**: 75-82.
- 3) 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**: 75-79
- 4) 甲村浩之・長久 逸・池田好伸：1988. アスパラガスの体細胞不定胚形成による大量増殖. 第2報. 不定胚形成における培養条件の検討と形態観察. 園学雑 **57**別1: 232-233.
- 5) ————：1988. アスパラガスの胚様体利用によ

る大量増殖. 農業技術 **43**(3): 115-119.

- 6) 倉石 晉：1988. 植物ホルモン. 東京大学出版会
- 7) REUTHER, G: 1984. In *Handbook of Plant Cell Culture* (W.R.Sharp et al ed) Section IV Vegetables: 8. Asparagus. Macmillian, New York. 2:211-242
- 8) STANLEY, B.H., W. A. DEAN, W. L. SARAH, H. M. JOHN: 1976. Science and art in preparing tissues embedded in plastic for light microscopy, with special reference to glycol methacrylate, grass knives and simple stains. *Stain Technol.* **51**: 71-97
- 9) BUI DAN HA: 1975. Regeneation of Asparagus officinalis L. throughr Callus Cultures Derived from Protoplasts. *J. Exp. Bot.* **26**(91):263-270
- 10) HARADA, H: 1973. Differentiation of Shoots, Roots and Somatic Embryos in Asparagus Tissue Culture. *Proc of 4th EUCARPIA Cong. on Asparagus Breeding held at CNRA, INRA, Versailles, France*: 163-170
- 11) 西沢秀治・斉藤猛雄・西村繁夫：1987. アスパラガスの不定胚誘導. 育学雑 **37**別2: 100-101.
- 12) FUJIMURA, T., A.KOMAMINE: 1979. Synchronization of somatic embryogenesis in a carrot suspension culture. *Plant Physiol.* **64**:1162-1164
- 13) 平田行正・荒木 肇・八嶽利郎：1988. アスパラガスの不定胚形成とその生長. 園学雑 **57**別1: 230-231.
- 14) MASUDA, K., Y.KIKUTA, Y. OKAZAWA: 1981. A Revision of the Medium for Somatic Embryogenesis in Carrot Suspension Culture. *J. Fac. Agr. Hokkaido Univ.* **60**(3): 183-192
- 15) 鎌田 博：1980. 高等植物における不定胚形成の制御. 植物の化学調節 **15**:62-78.
- 16) 高柳謙治・西尾 剛・田中正美・藤沢 修：1986. 茎頂組織の液体回転培養による大量増殖. 園学雑 **55**別1: 208-209.
- 17) 長久 逸・甲村浩之・池田好伸：1990. アスパラガスの液体回転培養による多芽体形成. 育学雑 **40**別1:56-57
- 18) YANG, H. J and CLORE, W. J: 1974b. Improving the survival of aseptically-cultured asparagus plants in transplanting. *HortScience.* **9**: 235-236
- 19) 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.

24:174—186.

20) AMMIRATO, P. V. : 1989. Recent Progress in Somatic Embryogenesis. News letter. Interanational Association for Plant Tissue Culture. 57:2-16

21) 大山勝夫 : 1984. 農林水産試験研究におけるバイ

オテクノロジー技術 : 116—127.

22) 星川清親・北條良夫 : 1976. 作物その形態と機能 (上). 農業技術協会 : 14—16.

23) ——— : 1975 イネの生長. 農文協 : 266—267.

Micropropagation of *Asparagus* through Somatic Embryogenesis

2. Condition of somatic embryogenesis, plant regeneration and habituation from Marry Washington 500W seedling

Hiroyuki KOMURA, Suguru CHOKYU and Yoshinobu IKEDA

Summary

In order to develop micropropagation of *Asparagus officinalis* cv. Marry Washington 500W, conditions of embryogenic callus induction, somatic embryo formation, habituation and variations of regenerated plants were investigated.

Embryogenic callus was obtained in MS medium supplemented with 2, 4-D. Other auxins, NAA, IBA and IAA were not effective. In the presence of 10^{-5} M 2, 4-D, optimum concentration of sucrose and glucose for embryogenic callus induction was 5 and 3%, respectively. Concentration of 5-10% sucrose effective for the growth of embryo.

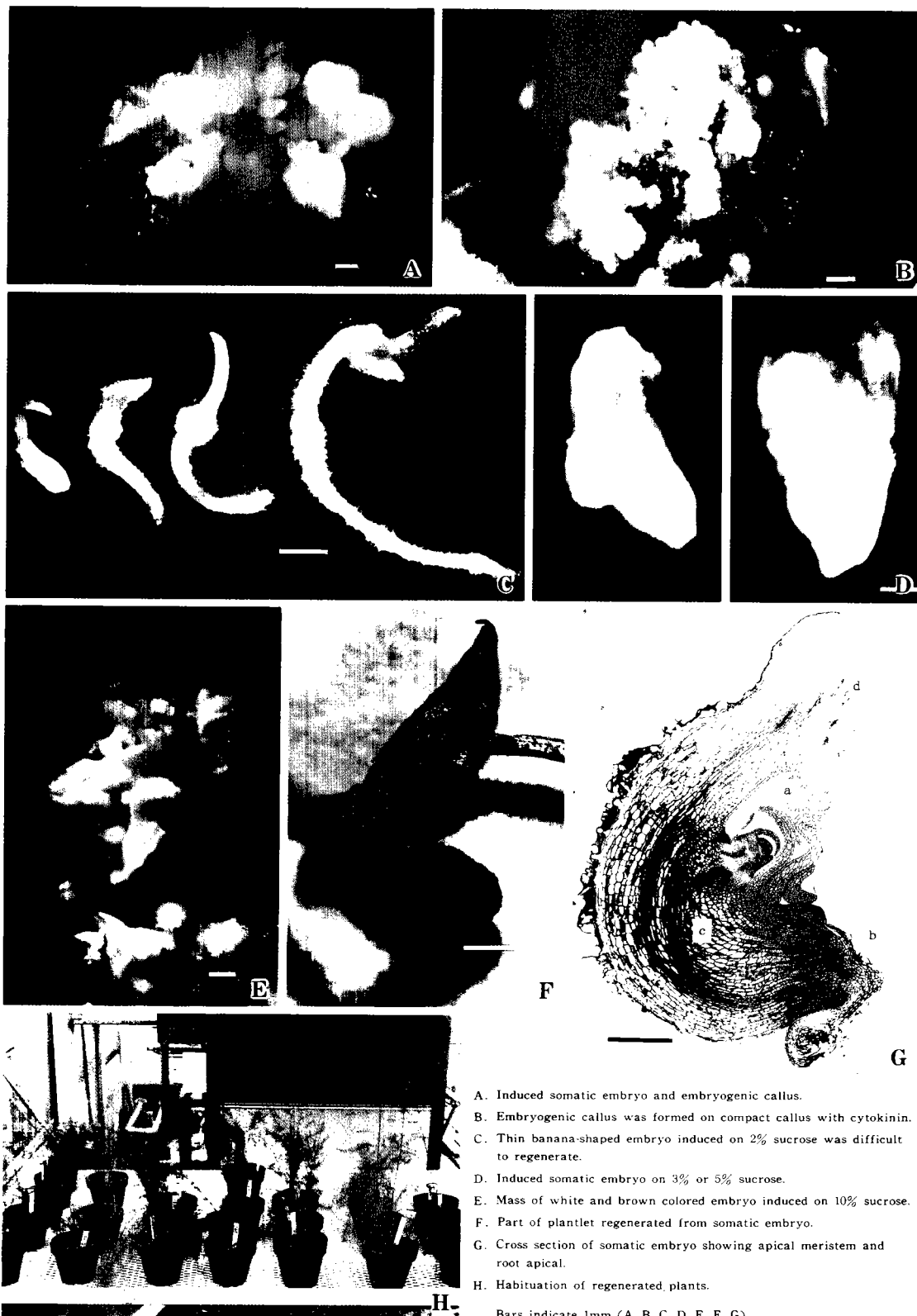
Addition of 10^{-5} M cytokinin accelerted the induction of callus, but not of embryogenic callus. Addition of 10^{-7} M zeatin accelerated embryogenic callus.

About 50% of plantlets regenerated from embryo 3-5 mm in length in absence of hormone. Furthermore, 77% of plantlets regenerated at the addition of 10^{-7} M zeatin.

After transplantation of plantlet in polyethylene pot containing vermiculite at 25°C, 70% humidity under 4000 lx for 12 hour illumination, almost 100% plants were habituated.

Twenty-one regenerated plants had chromosome numbers of $2n=20$ and only one had that of $2n=40$, suggesting that the method causes less mutation.

Key words : *Asparagus*, somatic embryogenesis, embryoid, micropropagation, habituation



- A. Induced somatic embryo and embryogenic callus.
- B. Embryogenic callus was formed on compact callus with cytokinin.
- C. Thin banana-shaped embryo induced on 2% sucrose was difficult to regenerate.
- D. Induced somatic embryo on 3% or 5% sucrose.
- E. Mass of white and brown colored embryo induced on 10% sucrose.
- F. Part of plantlet regenerated from somatic embryo.
- G. Cross section of somatic embryo showing apical meristem and root apical.
- H. Habituation of regenerated plants.

Bars indicate 1mm (A, B, C, D, E, F, G)

