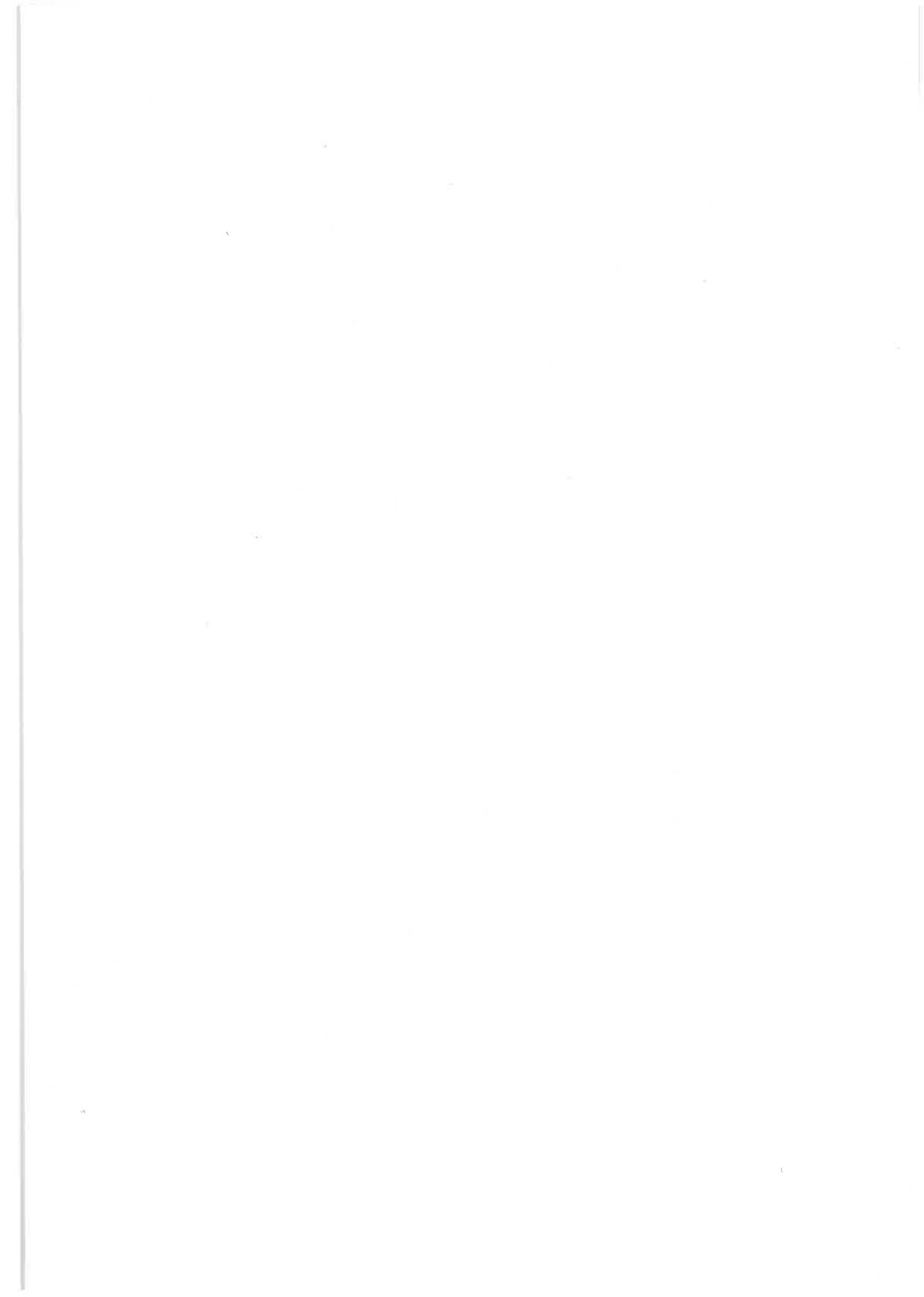


# 栄養繁殖性作物の組織培養による種苗生産システムの開発 —アスパラガス，ヤマノイモ，ワケギを例にして—

キーワード：アスパラガス，ヤマノイモ，ワケギ，組織培養，大量増殖，苗生産システム，  
クローン苗，品種育成，超低温保存，不定胚，苗条原基，茎頂培養，ウイルスフリー

甲 村 浩 之

—2002—



# 目 次

序 論 .....	1
第 1 章 アスパラガスの超低温保存技術の開発 .....	5
実験材料と方法 .....	5
結果 .....	6
考察 .....	9
参考文献 .....	10
第 2 章 アスパラガスの培養苗生産システムの開発 .....	13
実験材料と方法 .....	13
結果 .....	14
考察 .....	18
参考文献 .....	22
第 3 章 アスパラガスの不定胚培養苗の栽培特性 .....	27
実験材料と方法 .....	27
結果 .....	28
考察 .....	31
参考文献 .....	33
第 4 章 ヤマノイモの培養苗を利用した新生産技術の開発 .....	35
実験材料と方法 .....	35
結果 .....	36
考察 .....	40
参考文献 .....	43
第 5 章 ワケギウイルスフリー株茎頂の超低温保存と効率的苗生産 .....	45
実験材料と方法 .....	45
結果 .....	46
考察 .....	47
参考文献 .....	48
総合考察 .....	51
参考文献 .....	58
摘 要 .....	61
Summary .....	63
謝 辞 .....	66
写 真 .....	69

## 略語集

ABA	アブシジン酸 (abscisic acid)
BA	ベンジルアデニン (6-benzyladenine)
2,4-D	2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-dichlorophenoxyacetic acid)
DMSO	ジメチルスルホキシド(dimethyl sulfoxide)
DSC	示差熱分析計(differential scanning calorimeter)
EC	不定胚形成カルス (embryogenic callus)
FC	フライアブルなカルス (friable callus)
FDA	フルオルセインジアセテート (fluorescein diacetate)
IBA	インドール酪酸 (3-indolbutyric acid)
LN	液体窒素 (liquid nitrogen)
MS	ムラシゲスクーグ (1962) 培地 (Murashige and Skoog medium)
NAA	ナフタレン酢酸 ( $\alpha$ -naphthalen acetic acid)
PCP	植物培養袋 (plant culture pack)
PVS 2	植物ガラス化溶液 No. 2 (plant vitrification solution 2)

## 序 論

ジャガイモやサツマイモのような栄養繁殖性作物は、一般的に交配による種子繁殖が可能であるものが多い。しかし、種子が採取できても遺伝的な均質性が低く、形質のばらつきが大きいことから、農業利用上の栽培管理、収量や市場出荷における品質の均一性に問題が生じることが多い。そのため、農業生産上の目標である多収性、高品質、耐病性などの特徴的形質を有する優良株を、その作物集団内に自然に出現する遺伝子型突然変異、あるいは人為的に誘発した変異（交雑を含む）により得られた遺伝子型の中から、栄養系分離育種法により選抜し、増殖が行われてきた。これらの栄養繁殖法として具体的には、種球や芽の分割による株分け、りん片、挿し木、ランナー、むかご等による繁殖がある。

しかし、これら従来の栄養繁殖方法は一般に非効率的であり、苗作りのための時間・労力にかかるコストは極めて高くなり、零細な栽培規模を脱することは困難である。一方、市販の優良な苗を購入して用いる場合、高価な販売収益を期待できるものの、高額な投資を必要とするため、種苗費の生産費に占める割合が高くなり、農業経営を圧迫する等の問題が生じる。

これらを改善するためには、①収益性が高く、均質な特性をもつ培養苗を効率的に大量生産できる優良株の選抜育成法、②生産効率のよい栄養繁殖方法を開発し、低価格で優良な苗を安定供給できるシステムの構築、の双方を研究開発することが必要となる。そこで著者は、広島県立農業技術センター・生物工学研究所において、近年注目されているバイオテクノロジー技術の柱のひとつである組織培養を利用した種苗生産システムの開発と優良品種育成を行ってきた。植物の組織培養は、一般に「植物体の一部を母体から分離し、これを適当な条件下で無菌的に培養し生育させる技術」と White<sup>23)</sup>により定義されている。

現在、農業面における組織培養の応用では、作物改良のための育種技術として蒴・花粉培養、胚培養は既に実用技術として定着してきており、細胞融合・遺伝子組換え作物の育成に至るまで広く利用されている。また、これらの手法に加え、交配や突然変異など古典的育種法で作出された優良株を、作物生産の効率化のために大量増殖する手法も広く検討されている。

植物の組織培養は、Haberlandt<sup>6)</sup>が1902年に植物の分化全能性に関する大きな仮説を提唱したことに始まるとさ

れている。全能性とは「植物の体細胞は、生きている限り、単独状態でも適当な条件下に置かれれば、最小単位の生き物として機能し、分裂と増殖を行い、1個の植物体に至るまでの発育能力を、潜在的にもつ」というもので、Haberlandtはこの仮説を実験的に証明しようとしたが、培養細胞の分裂までには至らなかった。その後、根の生長誘起<sup>29)</sup>、根の無限生長<sup>38)</sup>、タバコのカルス培養<sup>40)</sup>を経て、Stewardら<sup>34)</sup>やReinert<sup>28)</sup>が1958年にニンジン<sup>3)</sup>の遊離単細胞を用いて、胚発生的あるいは形態形成的な一定の方向に沿った細胞分裂を誘起し、寒天培地に移植してさらに培養すると1個の植物体に生育することが報告されるに至り、ここに、植物細胞の分化全能性が証明された。

一方、1個の細胞由来によらず、植物自体が本来有している既存の生長点(茎頂)等の組織を利用した培養は、細胞培養に先駆けて成功している。この最初の作物がアスパラガスであり、Loo<sup>15,16)</sup>が1945年に若茎の先端部(小側枝)を培養し発根させて小植物体を得た。その後、茎頂培養によるウイルスフリー化がMorel and Martin<sup>19)</sup>により、培地の改良がMurashige and Skoog<sup>22)</sup>、Linsmaier and Skoog<sup>14)</sup>およびGamborgら<sup>4)</sup>により加えられ、組織培養できる植物種が増加した。これと平行して、効率的な培養苗生産を目的としたカルス培養<sup>1)</sup>、多芽体<sup>20)</sup>や不定胚形成<sup>28,34)</sup>による増殖法の研究開発が盛んに行われるようになり、ランではMorel<sup>20,21)</sup>やWimber<sup>41)</sup>の研究を背景にメリクロン(メリステム・クローンの略)という用語がDillon<sup>9)</sup>によって提唱され広く使用され始めた。

1980年代になると、組織培養による増殖技術を称してマイクロプロパゲーションという造語がKrikorian<sup>13)</sup>により提唱され、一般化されるに至り、さらなる展開が始まった。国内でも、多芽体誘導に類似し、さらに増殖率を向上する方法として、ランのプロトコム増殖法として既に利用されていた液体回転培養法を用い、従来の静置培地より効率的に、しかも遺伝的変異をほとんど発生すること無く増殖できる苗条原基法がTanaka and Ikeda<sup>36)</sup>により1983年に報告された。また、不定胚形成でもFujimura and Komamine<sup>5)</sup>やKamada and Harada<sup>11)</sup>がナイロンメッシュやアブジジン酸処理を利用してニンジンの生育ステージを同調化し、不定胚形成の利用に関する方向性が示されるに至った<sup>9,10)</sup>。

培養系の構築が進んでくると、馴化過程を簡易化し、

馴化率を向上するための培養技術が開発された。Grout and Aston<sup>5)</sup>や Sutter and Langhans<sup>26)</sup>は、培養器内の湿度を下げ植物体の水浸状化を抑制する通気培養を報告した。古在ら<sup>12)</sup>は、培養植物の生育を促進するための炭酸ガス施用を行い、それぞれが培養苗の活着率向上に結びつくことを明らかにした。さらに、セル成型育苗箱を用いた均一苗生産が種苗の主流となりつつあり、それらを含めた効率的な苗生産に取り組む必要が生じた。

培養苗生産法の開発がさらに進むと苗生産システムの一環として、優良母株や培養組織の保存の必要性が生じ、長期保存法として超低温保存が、短期保存法として遅生長の研究が始まった。超低温保存技術は、1960年に Sakai<sup>30)</sup>が、ヤナギの枝を緩速予備凍結法を用いて液体窒素に保存し再生芽を得たことに始まる。その後、Nag and Street<sup>29)</sup>が、植物の培養細胞(ニンジン)を用いて、超低温保存後の植物体再生に初めて成功した。続いてカーネーションの茎頂組織の保存が Seibert<sup>31)</sup>により、また、Uemura and Sakai<sup>32)</sup>が同植物を用いて100%の茎頂組織の生存と幼植物への生育を報告した。その後、Rall and Fahy<sup>27)</sup>が1985年に、動物のマウスの細胞を用いてガラス化保存技術を開発するなど方法の多様化と簡易化が進み、国内でも Sakai ら<sup>33)</sup>を中心に精力的な取り組みが始まり、適応植物種の拡大が進められた<sup>32)</sup>。

また、短期保存に関する研究目的は、「低温貯蔵や生育調節剤等を用いて培養細胞、茎頂、不定胚や多芽体を保存し、必要時にいつでも使えるようにすること」と Nitzsche<sup>24)</sup>により定義され、これらの方法により植物の生長速度を抑え、培養組織の継代にかかる労力・コストの低減を図ることも目的とされている。この方法では、Lundergun and Janick<sup>17)</sup>が、試験管内でリンゴの茎頂を1~4℃で1年保存し、Mix<sup>18)</sup>がジャガイモ茎頂に生長調節物質であるB-9を処理し、10℃で2年保存できたと報告している。また、国内では細木と浅平<sup>8)</sup>が、カーネーション、キク、ユリ、イチゴ等を0~-2℃で1年間、野口ら<sup>25)</sup>もイチゴ株を4年間保存できたと報告した。

以上のような研究を背景に、広島県の特産としてアスパラガス、ヤマノイモ、ワケギの優良株の培養苗生産にかかる保存、培養方法の開発や培養苗を栽培する有効性についても評価する必要性が生じた。これまで、農業生産のために多くの作物でマイクロプロパゲーション法の適用が試みられてきたが、実用化に至った例はラン、オイルヤシやウド等に限られていた。アスパラガス、ヤマノイモ、ワケギでは、これまで低コストで効率的な大量苗生産法が確立されていなかったため、これらのマイクロプロパゲーション技術の効率化・システム化に着手した。

アスパラガスでは、多収の四倍体品種‘セトグリーン’<sup>26)</sup>や圃場の雑草となる種子を散布しない不稔性の三倍体品種‘ヒロシマグリーン’<sup>7)</sup>が育成されており、既に腋芽培養法<sup>42)</sup>の適用に着手されていた。しかし、腋芽培養法では苗の発根率が約30%と低く、実用的な苗生産法としては問題が大きかった。

そこで、著者は腋芽培養に比べて増殖効率がよいと考えられた不定胚による大量増殖法の開発に着手した。また、不定胚による培養苗生産法をさらに効率化、システム化する目的で、1) 遺伝資源保存に有効な多芽集塊の誘導、長期保存のための超低温保存技術の開発と多芽集塊からECを効率的に誘導する技術の開発、2) 簡易殺菌やフィルム容器の活用による省力・低コスト培養法や培養苗への通気培養・炭酸ガス施用による生育促進技術の開発に着手した。また、培養苗栽培の有効性についての報告は殆ど見当らなかったため、栽培管理の省力化や収益性などの解析を行う必要があった。

ヤマノイモでは、カルス、節部切片培養や不定胚形成による増殖法が報告されていたが、培養組織の褐変や植物体再生率が低いなどの問題により実用化が困難な状況にあった。そこで未熟葉から多芽体を誘導し大量増殖する方法の開発に着手した。また、従来、ヤマノイモ苗の馴化は水を霧状に噴霧できるミスト装置の設置されたガラス温室で行われていたが、一般のハウスや露地で直接栽培できるむかごを培養容器内で形成させる方法の開発にも着手し、その効率化についても検討した。

ワケギでは、収穫物が葉を主とする作物であるため葉に病徴が出現するウイルス罹病は商品価値に大きく影響する。イメージアップと品質保持期間が長いことによりフリー苗の栽培が既に定着しているが、数年に1度は種球(りん茎)更新の必要があり、簡易な原種の維持保存法の確立が期待されていた。そこで、ウイルスフリー苗茎頂の超低温保存技術の適用について検討し、長期保存と優良種球生産の効率化を進めた。

## 引用文献

- 1) Caplin S. M. and F. C. Steward: 1948. Effect of coconut milk on the growth of explants from carrot root. *Science* **108**: 655-657.
- 2) Dillon G. W.: 1964. The meristem Merry-go-round. *Amer. Orchid. Soc. Bull.* **33**: 1023-1024.
- 3) Fujimura, T. and A. Komamine: 1979. Synchronization of somatic embryogenesis in a carrot suspension culture. *Plant. Physiol.* **64**: 162.
- 4) Gamborg, O. L., R. A. Miller and K. Ojima: 1968.

- Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell. Res.* **50** : 151 — 158.
- 5) Grout, B. W. W. and M. J. Aston : 1977. Transplanting of cauliflower plants regenerated from meristem culture. I. Water loss and water transfer related to changes in leaf wax and to xylen regeneration. *Hort. Res.* **17**(1) : 1 — 7.
- 6) Haberlandt, G. : 1902. Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. *S. B. Akad. Wiss. Wien.* **111** : 69 — 92.
- 7) 長谷川繁樹・谷口義彦・沖森富・笈三男 : 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.
- 8) 細木高志・浅平端 : 1978. キク, ユリ, カーネーションおよびイチゴの無菌組織の冷蔵による長期保存. *園学雑* **53** : 370 — 371.
- 9) 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**(2) : 62 — 78.
- 10) ———・原田 宏 : 1982. 不定胚形成. *細胞工学* **1**(3) : 29 — 34.
- 11) Kamada, H. and H. Harada : 1981. Changes in the endogenous level and effect of abscisic acid during somatic embryogenesis of *Daucus carota* L. *Plant cell physiol.* **22**(8) : 1423 — 1429.
- 12) 古在豊樹・岩浪好恵・富士原和宏 : 1987. 炭酸ガス施用が増殖培養時におけるスターチス(Limonium Hybrid)の小植物体の生長に及ぼす影響. *植物組織培養* **4**(1) : 22 — 26.
- 13) Krikorian, A. D. : 1982. Cloning higher plants from aseptically cultured tissues and cells. *Biol. Rev.* **57** : 151 — 218.
- 14) Linsmaier, E. M., F. Skoog : 1965. Organic growth factor requirements of Tobacco tissue cultures. *Physiol. plant.* **18** : 100 — 127.
- 15) Loo, S. W. : 1945. Cultivation of excised stem tips of asparagus *in vitro*. *Amer. J. Bot.* **32** : 13 — 17.
- 16) ——— : 1946. Further experiments on the culture of excised asparagus stem tips *in vitro*. *Amer. J. Bot.* **33** : 156 — 159.
- 17) Lundergun, C. and J. Janick : 1979. Low temperature storage of *in vitro* apple shoot (*Malus domestica* cv. Golden Delicious). *HortScience.* **14** : 514.
- 18) Mix, G. : 1981. Kartoffelsorten aus dem Reagenzglas Bedingungen zur Langzeitlagerung. *Der Kartoffelbau.* **32** : 198 — 199.
- 19) Morel, G. and C. Martin : 1952. Guérison de dahlias atteints d'une maladie à virus. *Compt. Rend.* **235** : 1324 — 1325.
- 20) ——— : 1960. Producing virus-free cymbidiums. *Amer. Orchid. Soc. Bull.* **29** : 495 — 497.
- 21) ——— : 1964. Tissue culture — A new means of clonal propagation in orchid. *Amer. Orchid. Soc. Bull.* **33** : 473 — 478.
- 22) Murashige, T., F. Skoog : 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with Tobacco tissue cultures. *Physiol. plant.* **15** : 473 — 497.
- 23) Nag, K. K. and H. E. Street : 1973. Carrot embryogenesis from frozen cultured cells. *Nature.* **245** : 270 — 272.
- 24) Nitzsche, W. : 1983. Germplasm preservation. *Hand book of plant cell culture, techniques for propagation and breeding.* : 782 — 805.
- 25) 野口裕司・山川理・望月龍也 : 1991. 低温培養によるイチゴ植物体の長期保存. *園学雑* **60**(2) : 218 — 219.
- 26) 沖森富・笈三男・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.
- 27) Rall, W. F. and G. M. Fahy : 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at  $-196^{\circ}\text{C}$  by vitrification. *Nature.* **313** : 573 — 575.
- 28) Reinert, J. : 1958. Untersuchungen über die Morphogenese an Gewebekulturen. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* **71** : 15.
- 29) Robbins, W. J. : 1922. Cultivation of excised root tips and stem tips under sterile conditions. *Bot. Gaz.* **73** : 376 — 390.
- 30) Sakai, A. : 1960. Survival of the twigs of woody plants at  $-196^{\circ}\text{C}$ . *Nature* **185** : 393 — 396.
- 31) ———, S. Kobayashi and I. Oiyama : 1991. Survival by vitrification of nucellar cells of Navel Orange. *J. Plant. Physiol.* **137** : 465 — 470.
- 32) 酒井 昭 : 1991. 植物の培養細胞, 組織, 胚の超低温保存に関する研究の現状と動向. *農業及び園芸.* **66**(11) : 1223 — 1229.
- 33) Seibert, M. : 1976. Shoot initiation from carnation shoot apices frozen to  $-196^{\circ}\text{C}$ . *Science* **191** : 1178 — 1179.
- 34) Steward F. C., S. M. Caplin and K. Mears : 1958. Growth and Organized development of culture cells. II. Organization in cultures grown from freely suspended cells. *Amer. J. Bot.* **45** : 705 — 708.
- 35) Sutter, E. and R. W. Langhans : 1979. Epicuticular wax formation on carnation plantlets regenerated from shoot

- tip culture. J. Amer. Soc. Hort. Sci. **104**(4):493—496.
- 36) Tanaka, R. and H. Ikeda : 1983. Perennial maintenance of annual *Haplopappus gracilis* ( $2n=4$ ) by shoot tip cloning. Jpn. J. Genet. **58** : 65—70.
- 37) Uemura, M and A. Sakai : 1980. Survival of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) shoot apices frozen to the temperature of liquid nitrogen. Plant and Cell Physiol. **21**(1):85—94.
- 38) White, P. R. : 1934. Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in a liquid medium. Plant Physiol. **9** : 585—600.
- 39) ——— : 1936. Plant tissue cultures. Bot. Rev. **2** : 419.
- 40) ——— : 1939. Potentially unlimited growth of excised plant callus in an artificial nutrient. Amer. J. Bot. **26**: 59—64.
- 41) Winber, D. E. : 1963. Clonal multiplication of cymbidiums through tissue culture of the shoot meristems. Amer. Orchid Soc. Bull. **32** : 105—107.
- 42) Yang, H. J. and W. J. Clore : 1973. Rapid vegetative propagation of asparagus through lateral bud culture. HortScience **8** : 141—143.

## 第1章 アスパラガス培養組織の超低温保存技術の開発

アスパラガスでは、茎頂の液体回転培養により、多数の芽の集塊状組織である多芽集塊が誘導でき、継代培養により約2年間、植物体再生能および集塊状の形態を維持している。多芽集塊は急速な増殖が可能で、再生植物にも遺伝的な変異が認められなかった<sup>2)</sup>。培養組織から完全な植物体が再生することは、組織培養技術を農業に利用するために不可欠の現象であり、作物改良のための分子・細胞遺伝学研究への応用や効率的な遺伝子資源の保存にも利用が期待できる。

超低温保存技術は、継代培養に伴う遺伝的な変異や再分化能を消失すること無しに、また、労力や時間をかけずに遺伝子資源や実験材料を長期間保存するのに有用な方法と考えられている。この中で最も一般的な緩速予備凍結法は、温度制御付きのプログラムフリーザー等の高価な凍結装置を必要とし、凍害防御剤の添加、予備凍結(植氷による凍結脱水)して数時間経過後に液体窒素に保存するという複雑な過程を必要としていた<sup>20)</sup>。これに対し、Rall and Fahy<sup>19)</sup>により、動物細胞であるマウス胚を用いて最初に報告されたガラス化法は、これらの高価な装置を使用せず、細胞や茎頂組織をガラス化溶液に一定時間浸漬した後、液体窒素中に直接投入し保存する方法である<sup>8,9,21,22,23,28)</sup>。アスパラガスでは、葉状組織から誘導されたカルスが、既にガラス化法により超低温保存されている<sup>29)</sup>。しかしながら、この方法では、3段階の複雑な過程を必要とし、生存率も低かった。本研究では、アスパラガス多芽集塊の簡易で効率的な超低温保存法の確立を目的として、3つの異なる超低温保存法である緩速予備凍結法、簡易凍結法<sup>24)</sup>と1段階ガラス化法<sup>22,23)</sup>を比較し、本法の有効性を明らかにした。また、この方法を不定胚形成カルス(EC)や不定胚の保存に適用する条件についても検討した。

### 実験材料と方法

#### 1. 多芽集塊の誘導と植物体再生法

圃場で栽培しているアスパラガス(*Asparagus officinalis* L.) 'ヒロシマグリーン'(2n=30)の15~20cm長の若茎頭部を2cmの長さに切り、表面を70%エタノール溶液に数秒、Tween20を0.1%添加した次亜塩素酸ナトリウム溶液(有効塩素1%)に15分間浸漬して殺菌し、その後滅菌水で3回洗浄した。小側枝(伸長する前の側枝)から茎頂

組織(1~2mm長)を無菌的に摘出した。これらは、10mg/lのアンシミドール、3%(w/v)シヨ糖を添加したMurashige and Skoog<sup>12)</sup>(以下MS培地と略)の液体培地(径30mm長さ200mmの試験管、培地量30ml, pH5.8)に移植した。これを直径1mの回転培養器(1分間2回転)で垂直方向に回転培養した。培養室内の温度は22℃、照明はハロゲン陽光ランプを用い、80 $\mu$ molm<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>で24時間連続照明とした。茎頂培養から1ヶ月後に緑色で球状の多芽集塊を形成した(図1-1A)。これらは、直径5~8mmの小さな芽の集塊組織であり、分裂組織表面に新しい腋芽を次々に形成した(図1-1B)。多芽集塊は芽の集塊部分を含む径約3~5mmの集塊に分割し、その後も同組成の培地で1ヶ月毎に継代培養した。

多芽集塊切片からの苗条の伸長培地は、MS培地を基本として用い、0.02mg/lのベンジルアデニン(6-benzyl aminopurine, 以下BAとする)、3%(w/v)シヨ糖、0.8%(w/v)寒天(Nakarai tesque(株), 京都)を添加し、pH5.8に調整した。約3~5mm径の芽の集塊部分を含む小切片を苗条伸長培地に置床し、25℃で60 $\mu$ molm<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>、16時間の蛍光灯照明下で培養した。苗条伸長後の発根には、ビタミン類を除く栄養素を1/2濃度とし、0.5mg/lインドール酪酸(以下IBA)、0.8%(w/v)寒天と3%(w/v)シヨ糖を添加したMS培地を用いた。再生植物はパーミキュライトを入れた黒色のポリエチレン製の鉢(以下、黒ポリ鉢とする)に移植して馴化養成した。

#### 2. 各種超低温保存の方法と生存率調査

**緩速予備凍結法及び簡易凍結法による保存法:**多芽集塊は、芽の集塊部分を含む1辺約2mmの小切片に分割し、超低温保存実験に使用した。緩速予備凍結法では、Kumu<sup>7)</sup>の方法に従い、小切片をストロー容器に入れ、8%または16%DMSOと0.2Mのソルビトール溶液に約60分間浸漬後、プログラムフリーザーを用いて0.5℃/分の速度で-40℃まで予備凍結し、液体窒素に投入した。

簡易凍結法<sup>24)</sup>では、小切片は1.8mlの凍結チューブ(Costar社, Cambridge USA)に入れ、2Mまたは3Mのグリセロールと0.4Mのシヨ糖を添加した培地に、25℃あるいは0℃で異なる時間で浸漬した後、-30℃フリーザーで60分間予備凍結後、液体窒素に投入した。急速解凍後、凍結チューブ中の小切片は、2mlの1.2Mシヨ糖濃

度のMS培地に25℃で10分間浸漬した後、苗条伸長培地に移植した。

**ガラス化による保存法：**本法では、植物ガラス化液であるPVS 2液<sup>22,23)</sup>に小切片を直接浸漬する処理を行った。PVS 2液は、MS培地に30% (w/v) グリセリン、15% (w/v) エチレングリコール、15% (w/v) DMSOと0.4 M ショ糖を添加し、pH5.8に調整した。10個の小切片を容量2 mlの凍結チューブに入れ、1.8 mlのPVS 2液を加えた。これを25℃、または0℃で異なる時間浸漬する処理を行った。PVS 2液は、液体窒素に保存する約20分前にピペットを用いて1 mlの新しいPVS 2液に交換した。一定時間処理後、凍結チューブを液体窒素に直接投入し、1時間保存した。冷却速度は約170℃/分であった。

ガラス化液の種類を検討では、PVS 2液を対照としてPVS 1液<sup>23)</sup>、Dereuddreら<sup>3)</sup>、Langis and Steponkus<sup>9)</sup>、Towill<sup>24)</sup>およびMassipら<sup>11)</sup>の液を供試した。

**生存率の調査と植物体再生：**凍結チューブは38℃のウォーターバスで急速に加温(昇温速度約160℃/分)した。各種保存用溶液は凍結チューブから排出し、1.2 M ショ糖を含むMS液体培地に10分間浸漬した(途中で液を1回交換)。その後、小切片を先の苗条伸長培地に移植し、同様に培養した。ガラス化あるいは凍結保存後の小切片からの苗条形成の程度は、苗条伸長培地に移植した後の培養30日目に正常な苗条を形成した小切片数の総供試数に対する百分率により示した。ガラス化液に浸漬した処理と無処理区では総苗条本数も同様に調査した。また、Widholm (1972)の方法により、FDA蛍光による組織の生存状態の観察も行った。

**示差熱分析計(DSC)によるガラス化の確認：**DSC測定のために多芽集塊の小切片を0℃で120分間、PVS 2液に浸漬処理した。その後、濾紙で小切片表面の液を拭き取り、18mgをDSC (DSC3200, Mac Science, 大阪)のsealable aluminum panに入れ、80~100℃/分の速度で水のガラス転移点以下の-135℃まで冷却し、その後10℃/分の速度で0℃まで加温し、示差熱の測定を行った。

### 3. 不定胚形成カルス(EC)及び不定胚の超低温保存

EC、不定胚の形成法は2章で詳細に記述する。本実験に用いたECは、10<sup>-5</sup>M 2,4-Dを添加したMS寒天培地で継代し、培養2週間目のものを供試した。凍結チューブ1本当たり15~20mgとした。不定胚は液体振盪培養で得られた球状胚を含む細胞集塊を2.5%寒天濃度のMS培地に移植して1カ月間培養し、3~5mm長に発達した緑色のものを供試し、凍結チューブ1本当たり8個体とした。ECや不定胚は、多芽集塊と同様に凍結チューブ内でPVS 2液に異なる時間浸漬処理し、液体窒素に

保存した。不定胚ではPVS 2液に浸漬処理する前にABA (0, 1, 10mg/l)、プロリン(0, 1, 10mM)、高濃度のショ糖(0.4, 0.8, 1.2, 1.6M)を含んだ液により前培養する方法、またはPVS 2液より浸透圧が低く薄い2 M グリセリン液(+0.4Mショ糖)等の超低温保存保護液により20分間前処理する方法<sup>14)</sup>についても検討した。超低温保存後は、いずれも多芽集塊と同様に保存容器からPVS 2液を排出後、1.2Mのショ糖液を加えて10分間浸漬し、細胞内のPVS 2液を排出した。その後、ECは継代培養培地に直接移植して増殖を、不定胚は0.02mg/lのABAを添加したMS培地(0.2%ゲランガム)に移植して植物体再生を検討した。培養条件は多芽集塊小切片からの再生と同様とした。また、不定胚については、Dereuddreら<sup>4)</sup>の報告したビーズ乾燥法についても検討した。同法では2%のアルギン酸に混入した不定胚を塩化カルシウム液に滴下し、直径約5mmの球状のビーズを形成後、そのまま1時間浸漬してビーズを硬化させた。ビーズは、径9cmの無菌シャーレの下部に無水シリカゲルを敷きつめ、ろ紙を敷き、その上にビーズを5個ずつ置き、シャーレを密封して、徐々に脱水を行った後に凍結チューブに入れて、液体窒素に保存した。保存後は、ガラス化法と同様に温湯で加温し、苗化培地上に直接移植して発芽や植物体再生を検討した。

## 結 果

### 1. 多芽集塊の超低温保存

ガラス化法による多芽集塊の超低温保存では、小切片を液体窒素保存前に25℃および0℃で異なる時間、PVS 2液への浸漬処理を行った。その結果、苗条形成率はPVS 2液への浸漬時間が大きく影響した(図1-2)。苗条形成率が最も高かったのは、25℃では45分、0℃では120分処理であった(約90%)。PVS 2液に浸漬処理し、液体窒素で冷却保存しなかった小切片(処理対照区: Treated control)は、25℃では60分まで、0℃では120分まで90~100%の高い苗条形成率を維持した。しかし、PVS 2液への浸漬時間がそれ以上長くなると苗条形成率は低下した(図1-2)。多芽集塊小切片当りの正常に伸長した苗条形成数を計数した結果、無処理区が平均5.2本であるのに対し、超低温保存でガラス化させた区では、最多であった0℃・120分処理でも3.5本であった(図1-3)。ガラス化保存後の小切片は、苗条伸長培地に移植後3日のうちに緑色に戻り、生長を開始した。この小切片からの苗条伸長(草丈)は、無処理区より遅れていたが約2週間後にはほぼ同程度となった。

FDA染色による茎頂組織縦断面の蛍光顕微鏡観察に

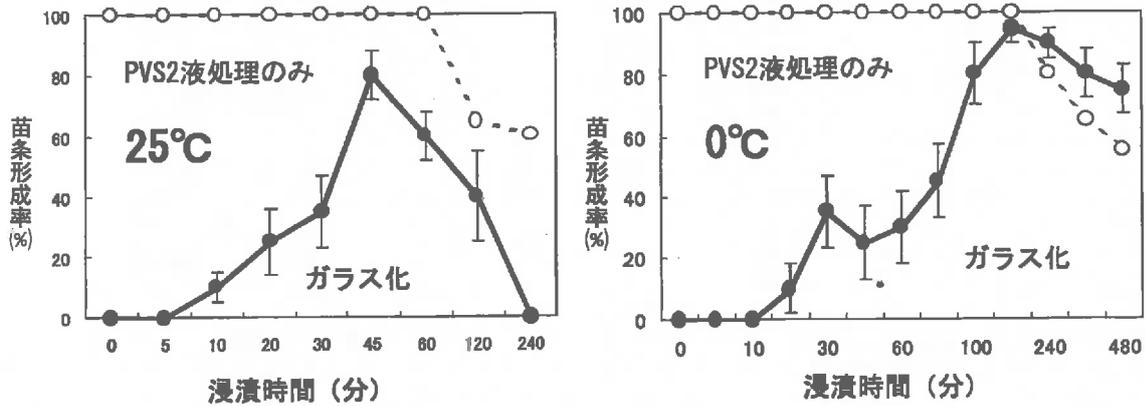


図1-2 PVS 2液(25°Cおよび0°C)への浸漬時間が、ガラス化法により-196°C低温下に保存された後の多芽集塊小切片の苗条形成率に及ぼす影響

1.8mlの凍結チューブに入れた多芽集塊小切片は、25°Cおよび0°Cの条件下においてPVS 2液に異なる時間浸漬処理した。その後、直接液体窒素に1時間浸漬し、ガラス化保存した小切片(●)は、38°Cのウォータースバスで急速加温した。苗条形成は、各処理区の小切片を苗条形成培地へ置床し、30日以内に苗条を形成した小切片の割合をカウントして百分率で示した。各処理はいずれも10個の小切片を用い、4~6反復行った。Treated control(○)：超低温保存材料と同様にPVS 2液処理し、超低温保存を行わなかった対照区。

より、正常にガラス化保存処理後、培養2~4日後の小切片の多くの茎頂ドーム組織が生存していることが明らかであった(図1-4 A)。しかし、小切片の基部組織と葉原基の細胞の多くは枯死していた。ガラス化法により液体窒素に保存した小切片から伸長した苗条(図1-4 B, C, D)は、発根培地移植すると、その多くが発根した。

そこでこれらの苗を鉢に移植し、ガラス室で養成した。その結果、超低温保存した多芽集塊の小切片から再生した植物体の形態的な異常は観察されなかった(図1-4 E)。0°Cで120分間PVS 2液に浸漬処理した多芽集塊の温度に対する反応(thermal behavior)を観察するため、

DSCで示差熱分析を行った。その結果、ガラス転移点(Tg)約-100°C、脱ガラス化点(氷晶生成開始温度)(Td)約-52°C、氷の融点(Tm)約-32°Cと観察された。

加温中の氷晶生成が苗条形成に及ぼす影響を調査するために、液体窒素へ浸漬し、ガラス化したと考えられる試料を、38°Cのウォータースバスで急速加温する前に-70°Cあるいは-40°Cの90%アルコール中に5分間浸漬した。-70°Cで処理した試料では70%の苗条形成率が認められたが、-40°Cでは30%と大きく低下した。また、0°Cの空气中でゆっくりと加温したものも約30%の苗条形成率であった。

液体窒素保存後の多芽集塊小切片からの苗条形成につ

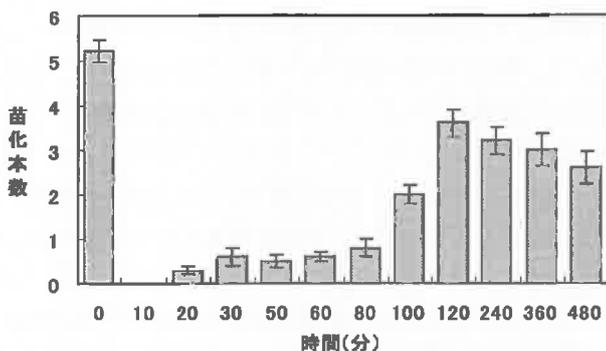


図1-3 ガラス化法により-196°Cの液体窒素に超低温保存した多芽集塊小切片のPVS 2液浸漬処理時間別の苗条形成数  
多芽集塊小切片は液体窒素保存前に、0°CのPVS 2液に異なる時間浸漬処理。各10切片をそれぞれ4反復で供試。

表1-1 超低温保存の種類と処方が液体窒素保存後の多芽集塊小切片からの苗条形成に及ぼす影響

超低温保存法	苗条形成率 (%±S.E.)
1. 緩速予備凍結法 (A)	0
(B)	10±6
2. 簡易凍結法 (A)	3±3
(B)	0
3. ガラス化法 (0°C・120分)	95±5
(25°C・45分)	85±11

- 0.5°C/分の速度で-40°Cまで冷却後液体窒素に保存  
(A)8% DMSO+0.2Mソルビトール添加,  
(B)16%DMSO+0.2 Mソルビトール添加
- 2M (A) or 3M (B)グリセリンと0.4Mシロ糖液に25°Cで1時間浸漬後、-30°C冷凍庫に1時間置き、液体窒素保存

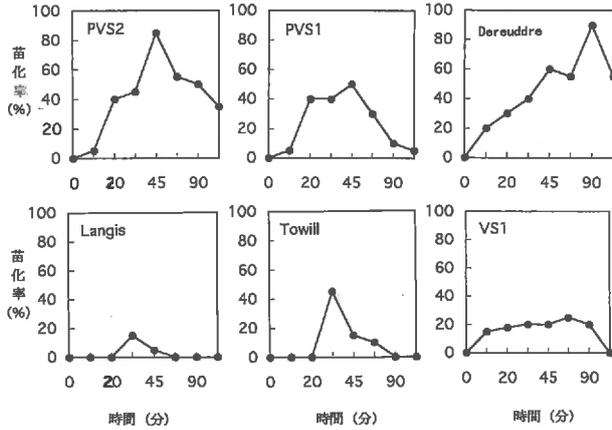


図1-5 超低温保存溶液の種類が保存後の多芽集塊小切片からの苗条形成に及ぼす影響

(供試した保存溶液の組成)

- A: PVS2 (Sakai 1990): 30% (w/v) グリセリン+15%エチレングリコール+15%DMSO+0.4M ショ糖  
 B: PVS 1 (Uragami 1989): 22%グリセリン+15%エチレングリコール+7%DMSO+0.5M ソルビトール  
 C: Dereudde (1988): 6g エチレングリコール+6g ショ糖+4g 水  
 D: Langis & Steponkus (1990): 40%エチレングリコール+15%ソルビトール+5.5%牛血清アルブミン (BSA)  
 E: Towill (1990): 35%エチレングリコール+1M DMSO+10%ポリエチレングリコール8000  
 F: VS 1 (Massip 1986): 20.5%DMSO+15.5%アセトイミド+10%プロピレングリコール+10%ポリエチレングリコール8000

(各溶液の浸透圧)

- A; 25.2MPa, B; 24.6MPa, C; 25.5MPa, D; 21.4MPa, E; 20.1MPa, F; 19.3MPa オズモメーターにより10倍希釈液を測定後、換算。

いて、3つの異なる超低温保存法を検討した結果では、ガラス化法でのみ高い苗条形成率が認められた(表1-1)。ガラス化保存液の比較では、PVS2液に浸漬処理後に超低温保存した場合に最も短時間で高い苗条形成率が得られた(図1-5)。Dereuddeら<sup>3)</sup>の液では浸漬時間の経過とともに苗条形成率が上昇し、25℃・90分処理で90%の苗条形成が認められた。

## 2. 不定胚形成カルス(EC)及び不定胚の超低温保存

ECの超低温保存では、PVS2液に25℃で約30分間浸漬した後に保存したものが保存後の増殖率が高く(図1-6)、これらのECから健全な再生植物が得られた。また、同処理は供試したEC細胞の6系統にも適用でき、6ヶ月間保存できた。保存後のECの増殖量は2週間後に無処理区の1/4程度であったが4週間後には無処理区と同程度となった。最適条件で保存処理したECはFDA染色による蛍光顕微鏡観察で黄緑色に発光しており、高率で生存していることが明らかであった(図1-7A)。なお、これらをEC継代培地に直接置床して培養すると、一部に白色の枯死細胞が認められたものの正常な継代増殖を続けることができた(図1-7B)。

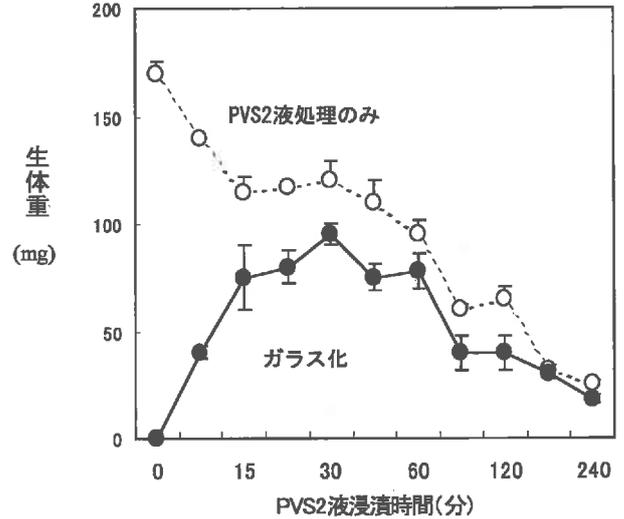


図1-6 ECのPVS2液浸漬時間が超低温保存後の増殖に及ぼす影響

EC: 寒天培地を用い、25℃継代2週間目に移植し、4週間後の重量を測定、各4反復  
 (○) 処理対照: TC, (●) ガラス化保存  
 バー: 標準誤差

不定胚の保存では、予備実験でPVS2液に25℃・45分間浸漬する処理において最も高い植物体再生率が得られた。しかし、材料の状態の差異により結果がばらつくため、前処理について検討した。その結果、1mg/lのABAを添加した培地で前培養すると保存後の苗条形成や植物体再生率が高まった(植物体再生率22%、無処理区3%)。植物体再生の状況を図1-7C, Dに示す。プロリンは1mg/lのABA, 1.2Mのショ糖と組合せて供試した結果、1mM添加で植物体再生率が最も高かった(60%)。糖では予備実験でショ糖, ソルビトール, トレハロースを供試したが、ショ糖のみが一定の傾向がみられたため、ABA, プロリンと組合せて追試した。その結果、1.6Mショ糖液による前培養で、2か月齢の不定胚の保存後の苗条形成率78%、植物体再生率60%となり、0.4Mショ糖区より再生率が大きく向上した(表1-2)。2Mグリセリン液に20分間予備浸漬する前処理法(Loading処理)では、2週間齢の若い不定胚の保存後の苗条形成率を4%から34%に向上したが、ABA前培養(42%)との有意差はなかった。1.6Mの高濃度ショ糖による前培養は2か月齢の不定胚(含水率85%)では、60%の再生率を得たが、1か月以下の不定胚(含水率90%)では再生率

表1—2 ガラス化法による不定胚の超低温保存後の植物体再生に及ぼす前培養時のショ糖濃度の影響

ショ糖 (M)	苗条形成 (%±SE)	植物体再生 (%±SE)
0.4	22± 5	10± 3
0.8	10± 3	10± 3
1.2	60± 7	60± 7
1.6	78± 3	60± 5

前培養：MS+1mg/l ABA+1mM7'ロソ(4℃・5日間)

供試材料：HG17不定胚，成熟培地2カ月齢

各8個体4反復，培養40日後調査

PVS2処理時間：25℃・45分

が34%と低く，再生してもその多くが水浸状であった。

ビーズ乾燥法による不定胚の超低温保存では，6～8時間の乾燥処理によりビーズの生体重を乾燥前生体重の22%とした時点での液体窒素保存により，保存後の生存率が100%，苗化率が60%となり，植物体再生も認められた(図1—7E)。乾燥前生体重の25%以上の生体重では，保存後の苗化が認められなかった。

## 考 察

### 1. 多芽集塊の超低温保存

本研究では，アスパラガス多芽集塊の超低温保存のために，3つの異なる保存法：緩速予備凍結法，簡易凍結法<sup>24)</sup>と1段階ガラス化法<sup>22,23)</sup>を比較検討した。その結果，1段階ガラス化法のみで高率の苗条形成が認められた。このガラス化法はプログラムフリーザーのような高価で複雑な設備の必要がない。ガラス化法の手法は簡易であり，多くの茎頂や培養細胞等に適用可能である<sup>6,13,23,25,28,30)</sup>。

ガラス化による超低温保存成功の鍵は，脱水とガラス化保存溶液への浸漬過程の時間的制御と処理中の化学毒性による傷害や過度の浸透圧ストレスを避けることにある<sup>17)</sup>。多芽集塊では，PVS2液に25℃で45分，または0℃で120分間浸漬処理を行った後に直接液体窒素に投入することにより，最高の苗条形成率(約90%)が得られた。

ガラス化細胞や組織の生存は，加温過程のガラス化組織の状態にも関係がある。組織内の氷晶生成に十分なほど加温速度が極めて緩やかな場合，低い生存率となることが本研究や他者の研究により示されている<sup>23,29,30)</sup>。

ガラス化の証明には，物理学的な方法が必要とされる<sup>17)</sup>。一般的な方法の1つが，示差熱分析計(DSC)により，冷却および加温中の氷晶生成により放出される潜

熱を測定することである<sup>20,22)</sup>。本実験では，PVS2液に浸漬処理した細胞のガラス転移点，氷晶生成開始温度と融点等のガラス化固形状態の温度反応による一連の変化が観察された。この結果，多芽集塊の小切片は，急速冷却中にPVS2液でガラス化していたことが示された。

超低温保存された細胞や茎頂が，無処理区と同様な植物の再生能力を持つことは極めて重要なことである。超低温保存した茎頂の回復生長の様式は，保存方法と再生培地の種類により様々である<sup>36)</sup>。本研究では，ガラス化法により超低温保存した多芽集塊小切片は，培地移植3日後には緑色に戻り，生長を回復し，カルスを形成することなく苗条を形成した。超低温保存から再生した植物は，供試した三倍体品種の無処理株との形態的な差が認められなかった。しかしながら，超低温保存による変異発生については細胞学的，生化学的，形態学的な分析による現象の解明が将来的に必要である。

一般に，*in vitro*で生長中の植物茎頂の超低温保存の成功には，低温馴化や高濃度のショ糖やソルビトールを用いた前培養が大きく寄与している<sup>3,4,15,19,30)</sup>。しかしながら，ガラス化法により超低温保存したアスパラガスの多芽集塊は，前培養や低温馴化無しに90%が生存し苗条を形成した。バナナ<sup>1)</sup>，ショウガ<sup>12)</sup>やシコクピエ<sup>31)</sup>等幾らかの種では，1つの茎頂から多芽集塊と同様な組織が誘導され増殖に利用されている。*in vitro*で増殖できる多芽集塊は，超低温保存材料として極めて望ましい特性を持っていることが本研究で明らかになった。今後はこれらの多芽集塊にも1段階ガラス化法による長期超低温保存を適用し，遺伝子資源として育種に利用できるシステムの構築が期待できる。

### 2. 不定胚形成カルス(EC)及び不定胚の超低温保存

アスパラガスの培養苗の特性検定には約5年の長期間を必要とするため，10数系統にわたる細胞系統を変異や雑菌による汚染を生じること無く数週間ごとに継代培養することは大変な労力となる。そこで，超低温保存技術を利用したECの長期保存について検討した。その結果，再生率が高く変異が少ない寒天培地での継代細胞の保存が可能となった。ECの保存は，アスパラガスでもUragamiら<sup>29)</sup>とNishizawaら<sup>14)</sup>の報告がある。前者はPVS1液を用いた多段階ガラス化法であり，後者は簡易凍結法，ガラス法を用いて液体振盪培養中のECを保存した基礎的実験である。本実験ではPVS2液を用いた1段階ガラス化法を検討した結果，多くの細胞系統に対し，PVS2液への浸漬処理時間を変えることなく適用できることから育種を目的とした培養細胞の保存に有効であると考えられた。

次に、不定胚による培養苗生産を実施する際、苗配布後に形態や生育異常が明らかになる場合が考えられる。そこで系統や継代培養期間の異なる EC から形成した不定胚の一部を保存しておけば、遺伝的な異常を解析でき、適切な継代培養法の評価も可能となるため、不定胚の超低温保存について検討した。その結果、成熟した2か月齢の不定胚を用い、アブシジン酸、プロリンおよび高濃度(1.6M)シヨ糖による前培養を行った後にPVS2液に浸漬し、超低温保存することにより、保存後に約60%が植物体に再生する方法を確立した。

不定胚の保存は、Withers<sup>3)</sup>がニンジン不定胚を用い、10% DMSOを保護剤として緩速予備凍結法により保存を行ったのが最初である。同報では、供試胚は全て発達を停止し、二次胚形成により再生植物が得られている。その後、スイートオレンジ<sup>10)</sup>でも同様な保存が行われたが、再生率は数パーセントと低かった。本実験ではアスパラガス不定胚の保存液としてPVS2液を用いた方法を検討したが、前処理なしでは植物体再生率が数パーセントと低かった。そこで、Nitzsche<sup>15)</sup>がニンジンのカルスで行ったアブシジン酸と高濃度シヨ糖(1.6M)を用いて前培養処理する方法を適用し、超低温保存後の再生率を高めた。プロリン処理については、Withers and King<sup>34)</sup>がトウモロコシの培養細胞の保存率を高めたとし、Hansen<sup>5)</sup>も乾燥ストレス時に植物に蓄積され耐性向上に役立つとしている。本実験でもプロリン1mMの添加により保存した不定胚からの植物体再生率が向上する傾向が認められ、アブシジン酸、高濃度シヨ糖とともに組合せて前処理することが、超低温保存した不定胚からの植物体再生率の向上に有効であると考えられた。なお、不定胚を超低温保存する場合、保存処理時の胚の生育ステージが耐凍性に大きく影響するとされており<sup>23)</sup>、本実験でも2ヶ月齢の胚の方が1ヶ月齢の若い胚より植物体再生率が高い傾向が認められた。不定胚の発達では成熟による含水率の低下を認めており、この現象は、今後、不定胚の超低温保存技術の適用範囲を拡大するための重要な鍵と考えられる。

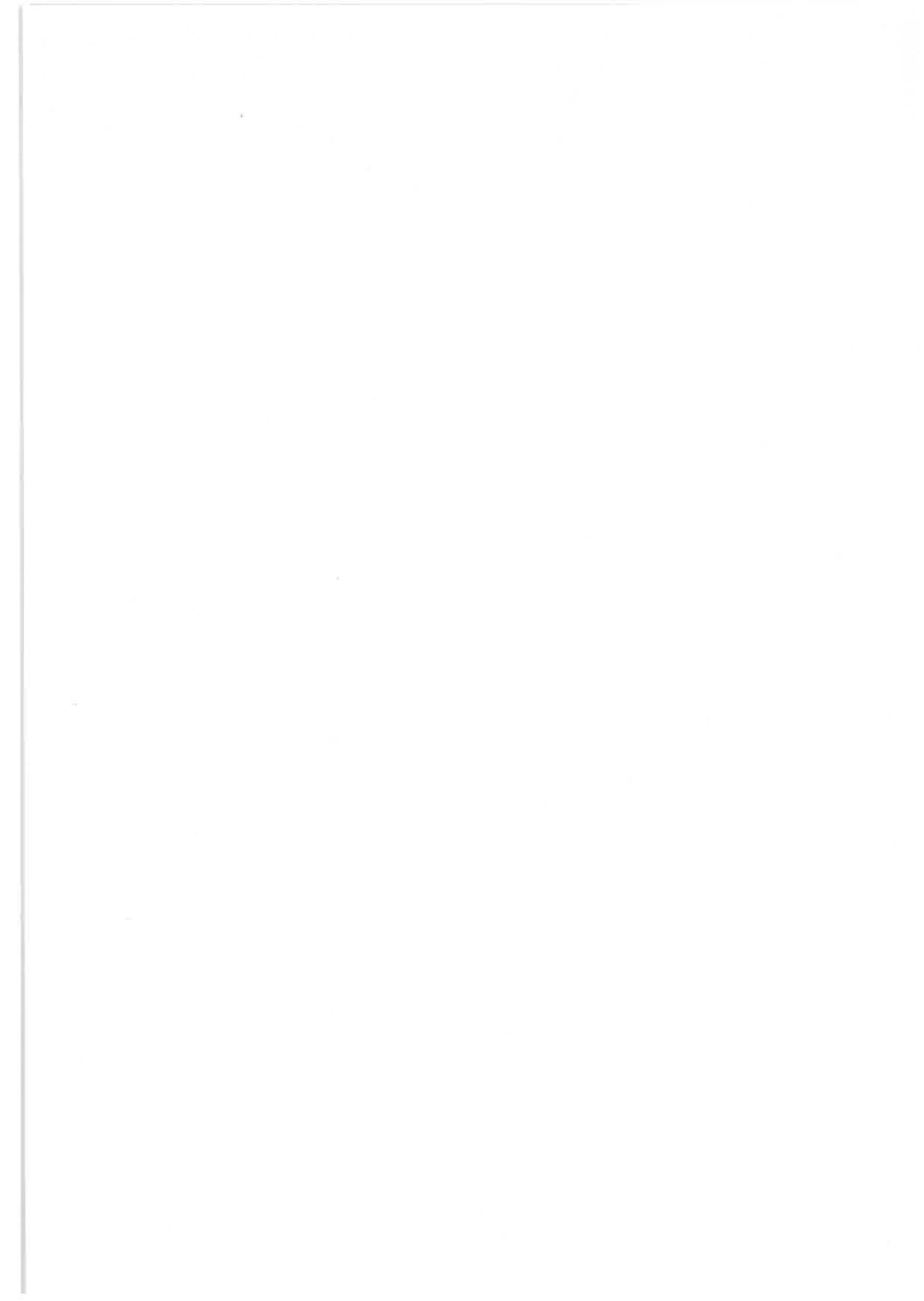
なお、不定胚による超低温保存法として、Dereuddre<sup>4)</sup>がピーズ乾燥法を報告している。これは、胚を含むピーズ中に高濃度のシヨ糖(0.3M)を取り込み、これを緩速で乾燥させることにより、シヨ糖の飽和状態で組織からの脱水が徐々に進み、細胞内に氷晶を形成しない程度に脱水した後に超低温保存する方法である。本実験でも含水率を徐々に低下させていくことにより不定胚が超低温保存でき、再生植物も得られたが、再生率を高めるためにはさらに条件の検討を進める必要がある。不定胚の超低温保存では、近年この乾燥法による成功例しか見当

たらない<sup>27)</sup>。今後は本法による不定胚の長期保存法の確立が必要と考える。

## 引用文献

- 1) Banerjee, N., D. Vuylsteke and E. A. L. Delanghe : 1991. In plant tissue culture and its agricultural applications. (L. A. Withers and P.G. Alderson, eds.), Butterworths, London : 139-146.
- 2) 長久 逸・甲村浩之・池田好伸 : 1991. アスパラガスの高密度多芽状集塊の誘導と植物体再生. 広島農試報告 54 : 25-31.
- 3) Dereuddre, J., J. Fabre and C. Bassaglia : 1988. Resistance to freezing in liquid nitrogen of carnation (*Dianthus caryophyllus* L. var Eolo) apical and axially shoot tips excised from different aged in vitro plantlet. Plant Cell Rep. 7 : 170-173.
- 4) —, S. Blandin and N. Hassen : 1991. Resistance of alginate-coated somatic embryos of carrot (*Daucus carota* L.) to desiccation and freezing in liquid nitrogen. 1. Effect of preculture. Cryo-letters 12 : 125-134.
- 5) Hansen, A. D. : 1985. In "Cell mol. biol. pl. stress" Key, J. L. and T. Kosuge (eds), Alan R. Liss. Inc. N. Y. : 71-92.
- 6) Hatanaka, T., T. Yasuda, T. Yamaguchi and A. Sakai : 1994. Direct regrowth of encapsulated somatic embryos of coffee (*Coffea Canephora*) after cooling in liquid nitrogen. Cryo-letters 15 : 47-52.
- 7) Kumu, Y., T. Harada and T. Yakuwa : 1983. Development of a whole plant from a shoot tip of asparagus officinalis L. frozen down to -196°C. J. Faculty Agr. Hokkaido Univ. 61 : 285-294.
- 8) Langis, R., B. J. Shnabel - Preikstas, E. D. Earle, E.D. and P. L. Steponkus : 1990. Cryopreservation of carnation shoot tips by vitrification. Cryobiology 27 : 657-658.
- 9) — and P. L. Steponkus : 1990. Cryopreservation of rye protoplasts by vitrification. Plant Physiol. 92 : 666-671.
- 10) Marin, M. L. and L. Duran - vila : 1988. Survival of somatic embryos and recovery of plants of sweet orange (*Citrus sinensis* L. Dsb.) after immersion in liquid nitrogen. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 14 : 51-57.
- 11) Massip, A., V. D. P. Zwalmen, B. Scheffen and F. Ectors : 1986. Pregnancies following transfer of cattle

- embryos preserved by vitrification. *Cryo-letters* **7** : 270—273.
- 12) Murashige, T. and F. Skoog : 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with Tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **15** : 473—497
- 13) Niino, T., A. Sakai, H. Yakuwa and K. Nojiri : 1992. Cryopreservation of *in vitro* - grown shoot tips of apple and pear by vitrification. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **28** : 261—266.
- 14) Nishizawa, S, A. Sakai, Y. Amano and T. Matsuzawa : 1993. Cryopreservation of asparagus embryogenic suspension cells and subsequent plant regeneration by vitrification. *Plant Sci.* **91** : 67—73.
- 15) Nitzsche, W : 1980. One year storage of dried carrot callus. *Z. Pflanzenphysiol.* **100** : 269—271.
- 16) Noguchi, Y. and O. Yamakawa : 1988. Rapid clonal propagation of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) by roller tube culture. *Japan J. Breed.* **38** : 437—442.
- 17) Rall, W. F. : 1987. Factors affecting the survival of mouse embryo cryopreserved by vitrification. *Cryobiology* **24** : 387—402.
- 18) — and G. M. Fahy : 1985. Ice - free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature* **313** : 573—575.
- 19) Reed, B. M. : 1990. Survival of *in vitro* - grown apical meristems of pyrus following cryopreservation. *HortScience* **25** : 111 - 113.
- 20) Roos, Y. and M. Karel : 1991. Nonequilibrium ice formation in carbohydrate. *Cryo-letters* **12** : 367—376.
- 21) Sakai, A. : 1985. In K.K. Kartha(ed) Cryopreservation of plant cells and organs. CRC Press, Boca Raton, Florida. : 136—158.
- 22) — S. Kobayashi and I. Oiyama : 1990. A simple and efficient procedure for cryopreservation of nucellar cells of navel orange by vitrification. *Cryobiology.* **28** : 657.
- 23) —, — and —, : 1991a. Survival by vitrification of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* var. *brasiliensis* Tanaka) *J. Plant physiol.* **137** : 465—470.
- 24) —, — and — : 1991 b. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb.) by a simple freezing method. *Plant Sci* **74** : 243—248.
- 25) Schnabel — Preikstas, B., E. D. Earle and P. L. Stepon -kus:1991. Cryopreservation of sweet potato shoot tips by vitrification. *Cryobiology* **29** : 738—739.
- 26) Senaratna, T., B. D. Mekersie and S. R. Bowley : 1990. Artificial seed of alfalfa (*Medicago sativa* L.) in induction of desiccation tolerance in somatic embryos. *In vitro cell dev. Biol.* **28** : 85—90.
- 27) Shimonishi, K., M. Ishikawa, S. Suzuki and K. Oosawa : 1991. Cryopreservation of melon somatic embryos by desiccation method. *Japan J. Breed.* **41** : 347—351.
- 28) Towill, L. E. : 1990. Cryopreservation of isolated mint shoot tips by vitrification. *Plant Cell Rep.* **9** : 178—180.
- 29) Uragami, A., A. Sakai, A. Nagai and T. Takahashi : 1989. Survival of cultured cells and somatic embryos of *Asparagus officinalis* L. cryopreserved by vitrification. *Plant Cell Rep.* **8** : 418—421.
- 30) Yamada, T., A. Sakai, T. Matsumura and S. Higuchi : 1991. Cryopreservation of apical meristems of white clover (*Trifolium repens* L.) by vitrification. *Plant Sci.* **78** : 81—87.
- 31) 脇塚 巧 : 1986. シコクピエの“Giant dome culture”について. *植物組織培養* **3** (1) : 42—44.
- 32) Widholm, L. M. : 1972. The use of fluorescein diacetate and phenosafranine for determining viability of cultured plant cell. *Stain Technol.* **47** : 189—194.
- 33) Withers, L. A. : 1979. Freeze preservation of somatic embryos and clonal plantlets of carrot (*Daucus carota* L.). *Plant Physiol.* **63** : 460—467.
- 34) — and D. J. King : 1982. Proline : A novel cryoprotectant for the freeze preservation of cultured cells of *Zea mays*. *Plant Physiol.* **64** : 675—678.
- 35) — : 1985. In K. K. Kartha(ed.) Cryopreservation of plant cell and organs. CRC Press, Boca Raton, Florida. : 243—263.
- 36) —, E. E. Bensen and m. Martin : 1988. Cooling rate/culture medium interactions in the survival and structural stability of cryopreserved shoot - tips of *Brassica napus*. *Cryo-Letters* **9** : 114—119.



## 第2章 アスパラガスの培養苗生産システムの開発

アスパラガス (*Asparagus officinalis* L.) は雌雄異株の作物である。ほぼ完全な他殖性であり、ヘテロ性が集団、個体ともに高いため<sup>57)</sup>、形質の揃ったF<sub>1</sub>品種を育成することは困難である。収量や品質が個体間で大きくばらつき、雌株は結実種子の落下に伴う実生の雑草化や茎枯病の温床となる問題がある。また、雄株は収量も多く、優良な雄株だけを栽培する利点は高いとされている<sup>57,58,74)</sup>。そこで、これまでも組織培養で増殖することを前提とした多収品種‘セトグリーン’<sup>49)</sup>や‘ヒロシマグリーン’<sup>18)</sup>が育成され、有効な培養系の開発が要望されていた。

アスパラガスのマイクロプロパゲーション法としては、茎頂部組織<sup>17,36)</sup>や Yang and Clore<sup>80)</sup>を初めとする腋芽培養法<sup>7,35,81,82,83)</sup>が報告されている。

腋芽培養法は、若茎頂芽部を培養して得た苗条から腋芽切片を採取し、これから伸長した苗条の腋芽を切り出すことを繰り返すことにより増殖し、これを発根培地に移植して植物体を得る方法である。試験管内で繁茂した大量の苗条から腋芽を含む節部切片を1本ずつ切り出して移植する手間と労力、植物体再生のための培養期間が2~3ヶ月の長期間必要であることに加え、再生植物における健全な貯蔵根の形成率が60%以下と低いという問題があった<sup>60,78)</sup>。そのため、1苗当りの生産コストが高く、実用上の問題があった。

そこで、ニンジン組織の培養中に受精胚と同様な形態変化を経て植物体を再生する系として見いだされ<sup>53,64)</sup>、植物の発生分化や大量増殖で基礎的研究<sup>12,24,25,26,34)</sup>が進められていた不定胚(胚様体)利用技術の開発に取り組んだ。本研究では、アスパラガスの培養苗生産システムの確立のために実生組織からの不定胚形成カルス(embryogenic callus, 以下ECとする)を誘導する培養系の確立と多芽集塊(第1章)を利用したEC誘導の効率化を中心に検討した。

### 実験材料と方法

#### 1. ECの誘導材料

供試品種：培養系の確立には品種‘ポールトム’ (サカタ種苗・米国産昭和60年採種) または‘メリーワシントン500W’ (以下MW500Wとする、井谷種苗・米国産昭和61年採種) の種子発芽実生組織をEC誘導材料として用いた。また、圃場株の若茎頂部組織や多芽集塊<sup>9)</sup>の利用では

品種‘セトグリーン’ (四倍体,  $2n=40$ )、‘ヒロシマグリーン’ (三倍体,  $2n=30$ ) を供試した。

**無菌種子実生の養成：**種子を水洗後、70%エタノールに数秒、有効塩素1%の次亜塩素酸ナトリウム溶液に15分間浸漬し振盪殺菌した。これを殺菌水で洗浄した後、Murashige and Skoog<sup>39)</sup>の培地(以後MS培地とする)に播種し、25℃・光量子束 $30\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ ・12時間照明下で生育させ、播種後約25~30日後の実生第1次茎が2~4cm、根長3cmの時点で供試材料とした。

**若茎頂部組織：**広島県立農業技術センター圃場(東広島市八本松町原)に栽植されている選抜株の若茎(約25cm長)を5~7月に採取し、頭部から2cm以内の小側枝(伸長する前の側枝)を含む部分をよく洗浄し、種子と同様に殺菌した。りん片葉を除いた後、実体顕微鏡下で約2mm長の茎頂を含む組織を採取し供試材料とした。

**多芽集塊：**先と同様に圃場株茎頂を無菌的に採取し、10mg/lのアンシミドール、3%ショ糖を添加したMS液体培地(pH5.8)に移植した。1ヶ月毎に集塊部分のみを残して同組成培地に継代し、3ヶ月後に得られた球状の集塊(径10mm)を供試材料とした。

#### 2. 培地の調整および培養条件

**EC誘導と継代培養：**MS培地に各種植物生長調節物質として、2,4-ジクロロフェノキシ酢酸(2,4-D)、ナフトレン酢酸(NAA)等のオーキシニン類とショ糖を添加し、HClまたはKOHを用いてpH5.8に調整した。培地固化剤として寒天0.8%または、ゲランガム0.2%を添加した。これらは加熱溶解およびオートクレーブ(120℃・1kg/cm<sup>2</sup>・15分間)殺菌後に試験管(口径20mm、長さ100mm、培地量6ml)またはディスポーザブルシャーレ(径9cm、高さ2cm、培地量30ml)に分注した。また、液体培地の場合には100ml三角フラスコを用い、培地を各30ml分注した。試験管・フラスコは、アルミホイルで二重栓し、シャーレはパラフィルムを用いて二重に密封した。

ECの誘導は、実生組織、茎頂、多芽集塊等の組織切片を培地表面に置床して行った。誘導したECは、誘導培地と同組成の継代用培地に移植して2~3週間毎に継代した。

**不定胚形成：**植物生長調節物質を含まない以外は先と同じ組成のMS培地を基本として用いた。ECは特に断らない限り継代培養2~3週間目のものを材料とした。このECを同液体培地に移植(カルス30mg/培地量30ml)

し、 $25^{\circ}\text{C} \cdot 100\text{rpm} \cdot 10\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$  照明下で巡回式振盪培養器 (Model G 33, New Brunswick Scientific 株) により 2 週間培養した。その後、寒天濃度が 0.8~3% と異なる以外は同組成の培地に、培養後の細胞集塊 (球状胚を含む) を 1 シャーレ当り 1g 移植し、約 1 ヶ月培養した。

**植物体再生:** 不定胚は、植物生長調節物質無添加の同組成の培地 (ゲランガム 0.2% を基本) に移植して植物体再生を検討した。培養条件は、特に断らない限り  $25^{\circ}\text{C}$ 、 $60\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ 、12 時間照明とした。

### 3. 馴化方法

再生した幼植物は、パーミキュライトを入れたポリエチレン製の鉢 (黒ポリ鉢) に移植し、鉢の底が水に浸るように透明蓋付きの容器内に並べた。これを  $25^{\circ}\text{C}$ ・湿度 60% に保った馴化室 (自然光を 1/5 に遮光) 内に置き 1~3 週間養成後、床土を入れた 4 号素焼鉢に移植した。

### 4. 染色体数、組織形態の観察

**染色体観察法:** 馴化活着した苗を鉢移植後に伸長した若茎の頂芽部の茎頂組織を供試し、酢酸オルセインで染色し、以下の押しつぶし法<sup>20)</sup>で染色体を観察した。①前処理; 頂芽を 0.002M の 8-ヒドロキシキノリンに  $20^{\circ}\text{C}$ ・6 時間浸漬。②固定; エタノール: 酢酸 (3: 1) 溶液に  $5^{\circ}\text{C}$ ・1 日以上浸漬。③解離; 1N 塩酸: 45% 酢酸 (1: 1) 溶液に  $60^{\circ}\text{C}$  で約 15~17 秒間浸漬。④観察; 茎頂組織を切りだして 1% の酢酸オルセインで染色後、押しつぶして倍率 400 倍で観察した。1 株当たり 3~5 個の細胞を観察した。

**組織の形態観察:** 不定胚組織切片を Stanley ら<sup>21)</sup> のグリコールメタクリレート樹脂包埋法により以下のように作成した。①固定; 不定胚を 10% ホルマリン液に  $5^{\circ}\text{C}$ ・14 時間浸漬。②脱水;  $5^{\circ}\text{C}$  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、 $0^{\circ}\text{C}$  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。③モノマーの浸透; モノマーミクスチャー (グリコールメタクリレート 94.5%, 2,2'-アゾビス 0.5%, PEG 400 5.0% 混合液をイオン交換樹脂を通したものに) 試料を入れて浸透させ  $5^{\circ}\text{C}$ ・12 時間で 3 回交換処理。④包埋; モノマーミクスチャーを満したゼラチンカプセルに試料を入れて包埋。これをオープンに入れ、 $40^{\circ}\text{C}$ ・2 日、さらに  $60^{\circ}\text{C}$  で 1 日おいて重合。⑤切片作成; ミクロトームを用いて作成。厚さ  $5\mu\text{m}$ 。⑥染色; 0.05% のトルイジンブルーで染色し、水洗・乾燥後光学顕微鏡で観察。

**走査型電子顕微鏡による形態観察:** 多芽集塊や EC は、FAA (ホルマリン: 酢酸: 50% エタノール = 1: 1: 18 混合液) 液に  $4^{\circ}\text{C}$  で 1 時間浸漬し固定。脱水は、50%, 70%, 90%, 99%, 100% (2 回) の異なる濃度のエタノールに 20 分ずつ浸漬処理した (50~90% は  $4^{\circ}\text{C}$ 、以後は室温)。

乾燥は、臨界点乾燥装置 (HCP-2 型, 日立工機株) を用い、二酸化炭素で置換した。金パラジウム合金コーティングは、イオンスパッタ (E-102 型, 日立那珂精機株) を用いて、約 2~4 分行った。観察には、走査型電子顕微鏡 (S-510, 日立工機株) を用い、400~1000 倍で観察した。

### 形質転換体における各種培養組織の GUS 遺伝子の発現

**観察:** EC にパーティクルガン法を用いて、プラスミド pBN 24 (CaMV 35 S pro-npt II-NOS ter, CaMV 35 S pro-gus-NOS ter) を導入した。3 日後の培養細胞を  $50\text{mg}/\ell$  ジェネティシンを含む不定胚誘導培地に移植し耐性のある 1 個体を選抜した。この再生植物を Jefferson の方法<sup>22)</sup> により X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-glucuronid acid) を基質として  $36^{\circ}\text{C}$  暗所で 8 時間処理し、青色スポットの観察により GUS 遺伝子の導入を確認した (重本ら 未発表)。この再生植物の茎頂から多芽集塊を誘導し、同集塊からさらに EC や不定胚を誘導した。これらの組織切片をマイクロスライサー (DTK-2000, 堂阪イーエム株) を用いて作成し、先の Jefferson の方法<sup>22)</sup> により GUS 活性を観察した。

## 結果

### 1. 不定胚形成による培養系の開発

節部切片を異なる濃度の 2,4-D を添加した寒天培地に移植し、60 日間培養した結果、 $10^{-5}\text{M}$  区では、カルス形成率が 40% と低かったが、不定胚様組織と黄白色でフライアブル (もろい) カルス (以後、FC と略す) の形成が 1 切片のみで認められた。同切片では、培養 30 日後に白色透明で紡錘型の不定胚様組織が放射状に形成し (図 2-1 A)、40 日後にその基部より FC が形成し、90 日目には径 15mm に成長した (図 2-1 B)。このカルスはニンジン EC と形状がよく似ていた。同 FC は培養 90 日目に 2,4-D 無添加の培地に移植した結果、同形状のカルスを増殖し、一部は球状胚、半分緑化した白色の紡錘型やバナナ型の不定胚様の組織を形成した (図 2-1 C, D)。これらは白色の根を発生後、苗条を伸長し植物体に再生し (図 2-1 F)、鉢上げして養成できた (図 2-1 G)。なお、他のコンパクトな形状のカルスからは、不定芽・不定根の分化のみが認められた。

グリコールメタクリレート樹脂包埋した不定胚様組織切片の観察では、同組織は茎頂分裂組織 (M) と根端の分裂組織 (R) の 2 極を備え、維管束様の組織 (V) を有していた (図 2-1 H)。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部分 (L) も認められ、不定胚であることを確認し、これを形成した FC は EC である

と認めた。

先のECの一部は、 $10^{-5}M$ の2,4-Dを添加した液体培地に移植し、30日間振盪培養した。その結果、ECは細胞集塊の分離とともに増殖がよく、30日後には生体重が300mgに増殖した。これを2,4-D無添加の寒天培地に移植するとさらに増殖し、一部は不定胚を形成し、100株以上の植物体に再生した。

不定胚から再生した植物は、培養60日で径2mm・長さ3cmの白色の貯蔵根を数本有した株も認められ、馴化開始後も順調に生育した。これらはガラス室内で栽培し、冬期には地上部が枯れたが翌春には再び萌芽し、正常に生育した。

## 2. EC誘導条件の検討による不定胚培養系の改良

### ア) 実生組織を用いたEC誘導条件の検討と成株への応用

各種オーキシンを培地に添加し、茎の節部切片からのEC誘導を検討した。その結果、ECは $10^{-5}M$ あるいは $10^{-6}M$ の2,4-D添加区のみで約60日後に誘導した。 $10^{-5}M$ 区では器官分化がなく、ECのみ誘導できることから、以後の培養には $10^{-5}M$ の2,4-D添加を基本とした。IAA, IBAの添加では不定芽・不定根の分化が多く、NAAでは黄白色で透明なカルスが誘導され、不定根のみが分化した。サイトカニンの添加では、目的とする形状のECは得られなかった。

培地シヨ糖濃度の検討では、EC誘導率は3%区で最も高く(16%)、カルス径によって測定したEC増殖率も同3%区で高かった。5%区ではカルス形成なしに不定胚の形成が認められた。他の糖類では、同じ3%ではグルコース区が、誘導率・増殖率ともに高かった。しかし、フラクトースではカルス形成率が低く(2%)、ガラクトースではカルス形成が認められなかった。その他、EC誘導について供試部位、ビタミン類の添加、照明の有無について検討したが、明確な結果は得られなかった。な

お、EC誘導の際、暗黒下の方がECの黄白色が目立ち判別が容易であった。

次に成株の若茎頂組織からのEC誘導について検討した。その結果、供試した2系統とも、 $10^{-5}M$ の2,4-Dを単独に添加した培地ではいずれもEC誘導が認められなかった。2,4-Dに加え、 $10^{-7}M$ あるいは $10^{-8}M$ のゼアチンを添加すると培養90日目に10%の切片からECを誘導できた。

### イ) 多芽集塊を用いたEC誘導法の改良と継代培養

多芽集塊からのEC誘導を検討した。その結果、 $10^{-5}M$ の2,4-D単独添加培地上で培養60日目に11%の切片からECが誘導できた。また、2,4-Dと $10^{-7}M$ のゼアチンの混合添加でも15%の切片から誘導できた(表2-1)。Otakeら<sup>47)</sup>のNAAとKinetinの組合せでは器官分化のみ観察された。

同濃度の2,4-Dを添加して供試材料の種類がEC誘導に及ぼす影響について検討した。その結果、多芽集塊および多芽集塊上に形成した球状胚からのEC誘導率が高く、所要日数も15~30日と短かった(表2-2)。多芽集塊上に形成したECを図2-2Aに、特に6ヶ月間継代を行わなかった多芽集塊の表面に多数形成した球状胚の集塊を図2-2Bに示した。ECは、初代培養では全ての多芽集塊上に均一に形成されず(図2-2C)、 $10^{-5}M$ の2,4-Dを単独に添加した培地を用いて2週間ごとに継代培養し、優良な不定胚形成細胞系統を得ることができた(図2-2D)。

多芽集塊とECを走査電子顕微鏡で観察した結果、多芽集塊は数個の茎頂ドームを取り囲むような幾層もの葉原基(図2-2E)が認められた。また、ECは径約20 $\mu m$ の球状胚の集塊である(図2-2F)ことが認められた。

誘導したECや不定胚の系統間差の検討では、系統による形状の差異が認められ、EC誘導率も0から約20%と差があり、継代培養の安定性にも差が認められた。

表2-1 植物生長調節物質の添加が多芽集塊切片からのECおよび不定胚形成細胞系統の誘導に及ぼす影響

添加した植物生長調節物質	各種培養体を形成した外植体			不定胚形成細胞系統数
	カルス	組織	EC	
2,4-D $10^{-5}M$	86.4	0	11.4	2
2,4-D $10^{-5}M$ , zeatin $10^{-7}M$	86.4	2.2	15.9	4
NAA $1.6 \times 10^{-5}M$ , kinetin $4.7 \times 10^{-5}M$	18.2	100.0	0	0

各区40切片を初期カルス誘導に供試。培養55日後、得られたカルスは $10^{-5}M$  2,4-Dを添加したMS寒天培地で2週間毎に継代培養。EC系統は3ヶ月間の継代培養で、2,4-D無添加のMS培地上で不定胚形成が認められたもののみ計数。

表2-2 外植体の種類が初代培養でのEC誘導に及ぼす影響

外植体	EC誘導 (%)	誘導に要した日数
腋芽培養茎 (節部切片)	0	—
若茎茎頂 (圃場株)	5.0	90-150
多芽集塊	22.2	30-60
体細胞胚	32.2	15-30

供試品種：ヒロシマグリーン，培養150日後調査  
 培地：MS培地+ $10^{-5}$ M 2,4-D，3%ショ糖，0.8%寒天  
 各20~40切片または集塊を供試。体細胞胚は6ヶ月間継代無しで培養した多芽集塊上に形成した球状胚の集塊を供試  
 誘導に要した日数：150日後までに誘導したEC (径2mm以上) のうち、半数のECが形成した日数 (15日毎に調査)

### 3. ECの継代・保存とECからの不定胚形成条件の検討

#### 1) ECの継代培養

ECは、2週間毎の継代培養を行った場合、継代後図2-3Aのような増殖を示した。また、ECは継代培養期間により増殖量が大きく変動し、2,4,6週間の継代期間の比較では、2週間での継代細胞が最も増殖量が多かった(図2-3B)。継代期間が4週間または6週間後の細胞ではEC増殖量が低下するとともに、その後2,4-D無添加の液体培地へ移植し、不定胚に発達させる際に、細胞集塊の分離や球状胚への発達が極めて不良となった。2週間毎に継代したECはこの中から増殖のよい細胞系統を選抜して継代培養することにより1年間継代(26代)しても増殖率が低下することがなく、植物体再生率の低下も認められなかった。

#### 2) ECの低温培養による短期保存

ECの継代培養細胞は、15℃の低温で培養することに

より増殖が抑制され、5℃、10℃ではほぼ増殖を停止した(図2-4A)。38日間各温度で培養した後のECの増殖は、10℃、15℃で培養したECが、同25℃で培養したECより増殖量が多かった(図2-4B)。5℃で培養していたECでは、カルス表面の一部に白化が認められ増殖量は少なかった。次に、25℃で2週間継代培養して増殖したEC各50mgを材料とし、異なる温度で数ヶ月間保存した場合の増殖量を検討した。その結果、10℃、7℃区では25℃区より緩やかに増殖した(図2-4C)。また、この保存しているECを1ヶ月毎に採取し、継代培地での増殖量から生存率を検討した結果、25℃で保存したECでは、生存率が2ヶ月後に大きく低下するのに対し、10℃では4ヶ月、7℃では6ヶ月間生存率100%を維持した(図2-4D)。なお、7℃で6ヶ月保存したECでは球状胚に発達し、径約0.5mmの胚も認められたが、25℃で継代培養しているECでは、培養2週間後でも各細胞径が0.05mm以下の集塊として維持していた。

#### 3) 液体振盪培養による不定胚形成の効率化

ECから不定胚に発達させるための効率的な方法として、液体振盪培養を用い、ECの移植量や培地に添加するショ糖濃度、各種生長調節物質について検討した。ECの液体培地への移植量(細胞密度)が不定胚の発達に及ぼす影響について検討した結果、0.015gまたは0.03g/30mlのECを移植した場合に細胞塊の収量は高くなり、球状胚の径も1mm以上に発達したものが80%以上となった(表2-3)。また、2週間の培養で30mgのECが2.9gの細胞集塊となり、約100倍量に増加した。液体振盪培養時のショ糖濃度の検討では、3%区で培養後の細胞集塊重が2.4gと最も多くなり、乾物重も大きかった。また、ショ糖濃度が高いほど乾物率が高くなる傾向

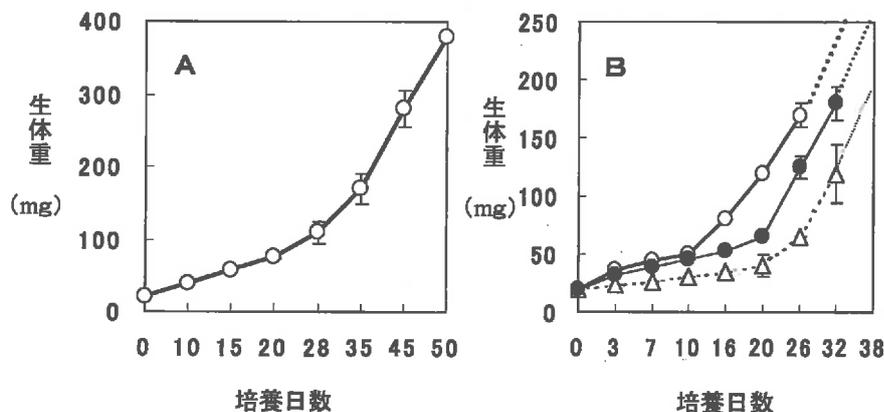


図2-3 継代培養(25℃)におけるECの増殖(品種：ヒロシマグリーン)

A：2週間毎に継代培養を行っているECの増殖

B：異なる前培養期間後のECの増殖

○：2週間；●：4週間；△：6週間

培地：前培養、継代培養ともMS培地+ $10^{-5}$ M 2,4-D

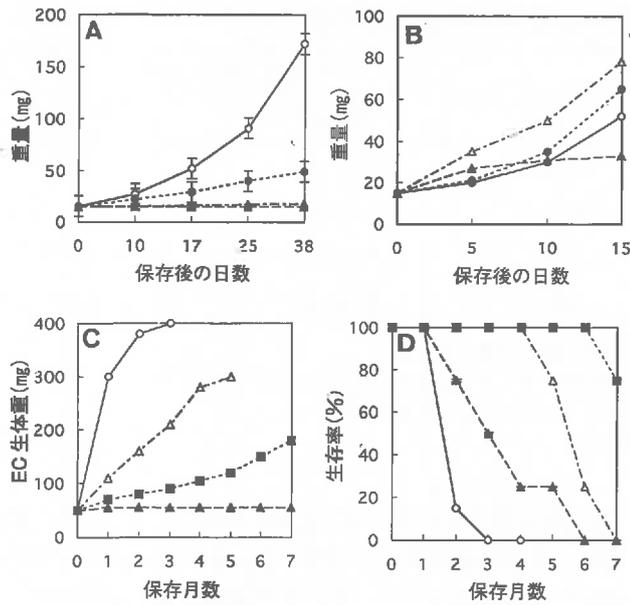


図2-4 ECの低温培養(遅生長)による短期保存  
○:25℃, ●:15℃, △:10℃, ■:7℃, ▲:5℃(いずれも±1℃)

A:培養温度別のECの増殖(38日間培養),各20mgのECを供試  
B:異なる温度で38日間培養後のECの増殖,各15mgのECを供試  
C:異なる温度で保存中のECの増殖(月別調査),25℃で2週間培養後の50mgのECを供試  
D:異なる温度で保存したECの保存期間(月)別生存率,各月間保存後に15mgのECを採取し,継代して増殖を確認。2週間後に径5mm以上あれば生存とした。  
供試系統:HG17,試験はいずれも4反復で実施

にあった。ABA添加の検討では、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$  Mの添加により細胞集塊重は減少したものの乾物重や乾物率が高い細胞集塊が多く得られた(細胞集塊重,乾物率は各2.2g, 8.9%, 2.4g, 7.0%無添加区2.7g, 6.6%)。細胞集塊中の球状胚はABA無添加区では黄色透明であった(図2-5 A)が,添加区では白色が濃く不透明なものが多かった。これらは,その後も正常な種子胚に近い形状の胚に発達した(図2-5 B,C)。なお,ECの細胞集塊を液

体培地移植前に軽く抑え,集塊をよく分離してから同培地( $10^{-5}$ M・ABA添加培地)に移植すると,集塊を分離しない場合は2週間後の重量が約1.4gなのに対し,同約2.2gとなり,59%の細胞集塊の収量増加が認められた。

#### 4) 液体振盪培養後の不定胚の成熟における寒天濃度の影響

発芽率の高い成熟した不定胚を多く得るための培養法を開発するため,液体振盪培養後に移植する培地の寒天濃度が不定胚の発達に及ぼす影響について検討した。その結果,振盪培養後に球状胚から2~5mm長の双極性の胚(茎頂と根端の両極をもつ胚,以後双極胚とする)と考えられる胚に発達した不定胚数は寒天濃度が2%区で最も多く,1容器当たり330個であった。長さ5mm以上に発達した胚も100個得られた(表2-4)。寒天濃度が2.5%及び3%区では,2%区より双極胚数は減少したが,水浸状の程度は低くなった。3%区では球状胚の褐変枯死により,また,0.8%区では,胚の水浸状化により,正常胚数が減少した。これらの胚を苗化培地に移植した結果,寒天濃度2~2.5%区で得られた双極胚からの苗化率は,80%以上であった。一方,未熟な球状胚からの苗化率は低かった。なお,液体振盪培養後に,2mmと1mm穴の篩による分画操作によって,小さい球状胚,カルス,残渣の除去ができ,不定胚の大きさを均一に揃えることができた。また,8%のFicoll-400中で15分間,3,000rpmの遠心分離を行った後,沈澱したECを再度,EC50mg/培地30mlの密度で液体振盪培養することによっても不定胚の大きさと形状を揃えることができた。これらは培養2週間後に2.5%の寒天培地に移植すると,約1ヶ月後には水浸状化の認められない緑色で正常な双極胚に発達した(図2-5 D)。球状胚から成熟胚(双極胚)に発達し,植物体に生育するまでの一連の系を図2-6(A, B, C)に示した。初期では,球状胚から双極胚に発達するにつれて色が黄色透明から白と緑色の不透明になり

表2-3 液体振盪培養におけるECの投入量が球状胚の発達に及ぼす影響

初期EC重 A(g)	収量 <sup>2)</sup> B(g±SE)	増殖量 B/A	球状胚径 B(mm±SE)	球状胚径の径別割合(%)			
				<1mm	1~2	2~3	3mm>
0.015	2.6±0.3	173	1.9±0.2	16	44	36	4
0.03	2.9±0.2	97	1.9±0.2	8	56	24	12
0.06	2.4±0.1	67	1.3±0.1	28	60	12	0
0.1	1.6±0.1	16	1.0±0.1	64	28	4	4

<sup>2)</sup>:培養14日後の細胞集塊の総生体重  
供試品種:ヒロシマグリーン,各区4反復,SE:標準誤差  
培養条件:100ml三角フラスコ(培地量30ml),旋回式振盪培養器100rpm・25℃・20μmolm<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>連続照明,  
収量の測定:フラスコ内の細胞集塊からパスツールによる水分除去が限界時の細胞集塊の生体重を測定  
球状胚の径別割合は,各区細胞集塊を0.1g採取し径0.5mm以上を計数し,割合を算出

表2-4 寒天濃度が不定胚の成熟と植物体再生に及ぼす影響

寒天濃度 (%)	双極性胚の個数 <sup>2</sup> (±SE)			植物体再生率 (%) <sup>3</sup>	
	2 - 5 mm	5 mm <	総数	胚状胚	双極性胚
0.8	55±13	77±19	77±19	0 (48)	3.1 (32)
2.0	232±63	332±87	332±87	22.7(22)	81.9(332)
2.5	140±14	224±37	224±37	54.4(24)	84.4(461)
3.0	68±4	86±6	86±6	45.8(24)	66.7 (84)

寒天培地で継代培養2週間後のEC30mgをホルモン無添加の液体培地で振盪培養。

培養2週間後、約1gの細胞集塊を各寒天濃度のMS培地に移植。培養条件：25℃，80 $\mu$ mol<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>，SE：標準誤差

<sup>2</sup>白色または緑色の双極性胚（長さ2mm以上）を培養2ヶ月後に計数。水浸状の胚は計数せず。

<sup>3</sup>不定胚移植1か月後の植物体再生率，( )内は供試した不定胚数。

(図2-6A)，根が先に伸長し，2～3cmに伸びてから幼茎の伸長が始まった(図2-6B)。その後，根が伸びるごとに新しい幼茎の伸長が認められ，最終的に苗として順化できる大きさのものに発達した(図2-6C，培養30～40日後)

#### 4. 培養変異の確認・除去と多芽集塊・EC培養系の安定性の確認

品種‘ヒロシマグリーン’（三倍体）の多芽集塊から誘導したECの3つの細胞系統から再生した2000株を調査したが，苗の形態的異常は認められず，染色体数を観察した15株も全て三倍体であった。他の系統では，変異株の発生が認められなかった系統があるものの二倍体の親株（多芽集塊）から四倍体のみの再生植物が出現したり，異数体や高次倍数体の出現も認められた(表2-5)。正常株では，茎葉や根などの外部形態に特に実生と異なる異常は認められず(図2-7A)，形態異常株の場合，苗条の水浸状化や根が極端に短く，細根が少なく(図2-7

B)，茎が硬くなる等の現象が観察された。また，再生植物の頂芽部の染色体数を観察した結果，正常株では親株と同じ(図2-7C)で，特に異常な数は認められなかった。しかし，形態異常株では染色体数が60～100本を示す株も認められた(図2-7D)。

パーティクルガンによりGUS遺伝子を導入して得た形質転換体を用いて多芽集塊・不定胚培養系の安定性について調査した。その結果，多芽集塊は得られた1個体の形質転換植物から容易に誘導でき，1～3ヶ月の継代培養により5年以上継代維持できた。この多芽集塊の切片は，X-glucを基質としてGUS活性を観察すると，茎頂部組織が濃紺色に染色され，GUS遺伝子が広く安定して維持されていた(図2-8A)。また，この多芽集塊から誘導したECでは，全体が濃紺色に(図2-8B)，また，不定胚も同様に染色され，全ての調査個体でgUS遺伝子の発現が観察された(図2-8C)。なお，対照の非形質転換体では濃紺色の発現が観察されなかった。

## 考 察

本章では，アスパラガスの不定胚形成による培養苗生産システムの確立を目的として，EC誘導や不定胚の成熟法を中心に，一連の培養系の構築について検討した。その結果，不定胚利用による優良株の大量増殖が可能であることを明らかにした。また，本技術で最も重要なECについて，遺伝的に安定で茎頂組織からの誘導が容易な多芽集塊から誘導する方法を考案した。

アスパラガスでは，Wilmar and Hellendoorn<sup>77)</sup>を初めとして，Harada<sup>16)</sup>，Bui Dang Ha<sup>5)</sup>，Reuther<sup>56)</sup>が，組織培養中の器官分化の他に不定胚形成が認められたことを報告している。しかし，不定胚による増殖を目的としたECの選抜と優良苗の増殖に関する方法についての報告は見当たらない。

表2-5 選抜したECから再生した植物の倍数性と形態

品種 系統	多芽集塊の 染色体数	ECの継代 回数	不定胚再生植物		
			倍数性	観察株数	形態 <sup>2</sup>
HG-17	2n=30(3X)	2-3	3X	15	N
HG-17	2n=30(3X)	70-80	3X	11	N,N*,V
HG-17	2n=30(3X)	50+18 <sup>3</sup>	3X	9	N
SG-M1	2n=40(4X)	5-15	4X	7	N,N*
MW-S6	2n=20(2X)	5-15	2X	9	N,N*
Y6	2n=20(2X)	4-10	2X	7	N,N*
W-N10	2n=20(2X)	5-15	4X	5	N
MW-M2	2n=20(2X)	8-16	6X	2	S <sup>4</sup>
MW-M2	2n=20(2X)	8-16	8-9X	3	V+S*
W-M1	2n=20(2X)	8-16	5-7X	5	V+S*

\*N：正常な植物体，V：苗条の水浸状化，S：根が短いまたは細根の発生無し。

<sup>3</sup>液体振盪培養で10日毎に8代継代

<sup>4</sup>試験管内の植物体を観察

## 1. 不定胚形成による培養系の開発

ECの誘導は、ニンジンの場合、オーキシン単独処理が有効であるとされ<sup>20)</sup>、中でも2,4-Dは最も効果的とされている<sup>25)</sup>。そこで、最初に2,4-Dを培地に添加し、実生茎切片を用いてEC誘導を検討した。その結果、 $10^{-5}$  M 2,4-Dを添加した培地で、培養30日目に透明で紡錘型の組織集塊が、40日目には黄白色のカルスの形成が一部で認められ、ニンジンのECと同様な形状であったため、不定胚形成が期待された。カルスがECかどうかを確認するには、カルスを2,4-D無添加の培地に移植することが有効である<sup>12,24)</sup>。そこで、誘導したカルスを同固形培地に移植して不定胚形成を観察した。その結果、増殖したカルスの表面上で球状組織が発達し、最終的に上半分が緑色の紡錘型の組織を形成した。この組織からは苗条の伸長と白色根の発生等、速やかな植物体再生が認められ、茎と根もカルスの經由なく、維管束が連絡していた。組織切片の観察により、本組織は茎頂および根端の分裂組織の双方をもつ複極構造<sup>20)</sup>を備えており、同じ単子葉植物のコムギやイネの胚の形態<sup>19,20)</sup>に類似し、単離できる独立した組織であった。不定胚は、1)発育の様態が接合子胚と類似、2)双極性の構造を有する、3)単細胞由来であり、起源組織とは維管束の連絡を持たないと Reinertら<sup>54)</sup>により定義されている。本組織は、この定義の要件を満たすことから不定胚であると確認した。

アスパラガスでこれまで行われてきた腋芽培養法の問題は、1つは茎と根の維管束が連絡した植物体の再生率が20~30%と低く、しかも根の多くは透明根であるために順化活着率が低いこと<sup>60,70)</sup>である。もう1つは苗条形成後、順化が可能な植物体に養成するのに20週間<sup>81)</sup>、培地にアンシミドールを添加する方法により発根率が向上しても8週間の長期間を要す<sup>7)</sup>ことである。本実験で得られた不定胚は、苗条の伸長や白色根の発生により、植物体が速やかに再生したことから、実用的な培養種苗の生産方法として利用できることが明らかになった。

また、ECの増殖には、ニンジンでは液体振盪培養が有効で同調化技術導入も可能とされている<sup>12,26,51)</sup>。アスパラガスでも Harada<sup>16)</sup>がカルスの液体培養について報告しており、本実験でもECが液体振盪培養で増殖でき、これらのカルスからも再生植物が得られることが明らかになった。Harada<sup>16)</sup>は、培養細胞をホルモン無添加の液体培養中で数週間培養すると、茎頂や根が形成され、半固形培地に移植することで植物体に再生したと報告している。しかし、本実験では水浸状の不定胚を形成する場合が多く、植物体の再生はわずかであったため、培地浸透圧が不定胚の発達に及ぼす影響など今後の検討が必要と考えられる。

## 2. EC誘導法の改良

不定胚を利用した大量増殖技術を確立するには、目的とする優良個体からECが確実に誘導されることが必要である。また、カルス經由の再分化には遺伝的変異が生じる場合があることも指摘されている<sup>9)</sup>ので、遺伝的変異の少ない大量培養系の確立が必須である。そこで本実験では、実生茎切片を材料としたEC誘導法について基礎的検討を行った。また、圃場で選抜した優良株(成株)からECを誘導するために、多芽集塊<sup>8)</sup>を材料とした新しいEC誘導系について検討した。

培地に、 $10^{-5}$  Mの2,4-Dを添加して実生茎切片を培養するとECを誘導できた。しかし、 $10^{-6}$  Mの2,4-Dや他のオーキシンであるNAA, IAAおよびIBA処理では、不定芽・不定根が分化し、ECの誘導率が低かった。また、ECが誘導されても器官分化カルスと混在するために、ECを選抜することが困難であった。Bui Dan Ha<sup>9)</sup>、や Reuther<sup>56)</sup>は、NAAとサイトカイニンの添加培地でアスパラガスの不定胚形成を観察しているが2,4-Dは利用していない。また、Harada<sup>16)</sup>はNAAの方が2,4-Dより球状胚を多く形成すると報告している。しかし、本実験では、ニンジン<sup>20)</sup>と同様に2,4-D単独処理のみで識別可能なECが得られたことから、以下の実験では、 $10^{-5}$  Mの2,4-Dを基本として培地に添加し、ECを誘導した。

サイトカイニンの添加では、不定胚形成能の無いカルスの形成率が高まるものの、ECがこれらのカルス中に混在し、EC様のカルスでも不定胚が形成しない場合が認められたことから、添加しない方がよいと考えられた。EC誘導に及ぼす糖の影響は、3%シヨ糖ではECを形成したが、5%では不定胚がカルスを經由せず茎切片上に直接形成するなどの現象が認められたことから、濃度により誘導形態が異なるものと推測された。嵯峨ら(未発表)はニンジンで植物生長調節物質を用いず、シヨ糖濃度を高めただけで不定胚を誘導している。これらのことから、シヨ糖は炭素源としての役割の他に、濃度による培地浸透圧の上昇が不定胚の形成やEC誘導に寄与していると考えられた。糖の種類では、Masudaら<sup>31)</sup>がニンジンの懸濁細胞培養を用いて不定胚形成を検討し、シヨ糖で最も多くの不定胚を形成している。本実験でもシヨ糖より優れた糖類の選定には至らず、したがって、以後の培養ではシヨ糖3%添加を基本とした。なお、その他にもビタミン類の添加や光の有無等を検討したが、EC誘導率を大きく向上する条件は見いだせず、これらの条件を解明するためには、より均一な材料の育成や安定した培養系の構築が必要と考えられた。

圃場選抜した優良株(成株)からのEC誘導について、若茎茎頂組織を材料とした結果、 $10^{-5}$  Mの2,4-D単独

添加でECが誘導できず、 $10^{-7}$  Mまたは $10^{-8}$  Mのゼアチン添加により、低率であるがECが誘導できた。ゼアチンの添加では、Harada<sup>65)</sup>と同様、コンパクトな緑色カルスの表面に球状胚様の組織を形成した。この球状胚の集塊を植物生長調節物質無添加の培地に移植するとカルス増殖後、不定胚を形成し植物体に再生した。ニンジンでは、 $10^{-7}$  Mのゼアチン添加により不定胚形成が促進される<sup>12)</sup>ことから、アスパラガスでも同様に低濃度のゼアチンがEC誘導と不定胚形成を促進したと考えられる。しかし、若茎頂組織からのEC誘導では、その誘導率が低い上に、材料の雑菌汚染や採取時期が限定される等の問題があった。

そこで、同条件の材料が大量に得られる多芽集塊<sup>9)</sup>を利用する方法について検討した。その結果、多芽集塊利用では若茎頂組織より高いEC誘導率が得られ、特に多芽集塊上に形成した球状胚を供試するとさらに高いEC誘導率を得た。

多芽集塊は、Tanaka and Ikeda<sup>7)</sup>がハプロパップスで開発した苗条原基法に従い、液体培地を用いた回転培養法で誘導増殖できる。しかし、苗条原基法に準じ、NAAとBAを用いて誘導した多芽状の集塊は、継代培養中にカルス化するなど形態の維持が困難であった<sup>42)</sup>。そこで、アンシミドールを添加して同様な組織を誘導した信森と内藤<sup>46)</sup>の方法により、多芽集塊の培養系を確立した。

EC誘導材料としての多芽集塊の利点は、1) 若茎頂組織から多芽集塊が容易に誘導できる、2) 供試組織の殺菌処理が不要、3) 時期に左右されず必要時にいつでも利用できる、4) 多芽集塊の培養中にカルス化せず遺伝的安定性が高いと考えられる、5) 細胞分裂活性の高い茎頂組織を多数もっている、6) 超低温保存や継代培養による維持保存が可能である、7) ゼアチンなどの高価な植物生長調節物質を添加せずにEC誘導ができる、8) 初代培養と継代培養で同じ組成の培地を利用できる点である。多芽集塊からECを誘導する培養系は、今後多くの作物に応用され育種に活用されることが期待される。

### 3. ECの継代・保存とECからの不定胚形成条件

正常に不定胚を形成するECは、継代培養等により長期間維持でき、必要時にいつでも不定胚に分化させ、苗生産に利用できることが望ましい。そこで、ECが不定胚形成能力を失わない継代培養期間について検討した。その結果、ECの継代培養期間は25℃室温条件下では約2週間が適当であった。継代期間が4週間以上となると、以後の培養中のEC増殖量が低下し、不定胚形成能力の消失も認められた。また、2週間毎の継代培養では、E

Cの高い細胞分裂活性は維持するものの、培地作成や移植に労力を要し、雑菌混入の機会も高くなる。そこで、低温培養により生長を抑制した*in vitro*保存法について検討した。その結果、通常25℃で継代しているECを10℃、7℃の低温で培養することにより、4~6か月の短期保存が可能となった。低温培養では、これまで多くの作物で茎頂などの保存が行われてきた<sup>15)</sup>。培養細胞では、ニンジンカルスが15℃・25%相対湿度下で2年間保存できた<sup>45)</sup>、メロンの苗条原基や不定胚はアブシジン酸の添加により約1ヶ月間保存できた<sup>67)</sup>等の報告がある。しかし、培養細胞では生長抑制による保存の報告例が極めて少ない。本実験では、ECの継代と保存法が確立でき、今後のこの分野の研究材料としても多に活用できると考える。

ECの液体振盪培養<sup>12)</sup>による効率的な不定胚の形成法について検討した。その結果、液体振盪培養で効率のよい球状胚形成が期待できるEC移植量と培地量の関係を明らかにした。また、液体振盪培養後の不定胚の水浸状化を回避する目的で、球状胚を寒天濃度が2.5~3%と高い培地に移植して一定期間成熟させることにより、不定胚からの植物体再生率を高める方法を開発した。培地浸透圧と不定胚発達の関係では、Deburghら<sup>10)</sup>が、アーティチョークの培養で培地浸透圧を高めることにより培養植物の水浸状化を回避できたと報告している。また、Saitoら<sup>39)</sup>も、培地への通気やゲランガム濃度を高くすることにより胚発達が促進されるとしている。本実験では培地固化剤である寒天濃度を高くすることにより胚発達が促進され、培地浸透圧を高めることが不定胚の成熟促進に寄与することが明らかになった。さらに、アブシジン酸の添加により不定胚の発達が促進される傾向が認められ、これはアブシジン酸添加により正常な種子胚に近い形状の胚が多く形成されるとするAmmirato<sup>1)</sup>の報告と一致した。なお、ECを液体振盪培養に移す際には、細胞塊を軽く押しつぶし、よく分離して移植する方が、球状胚の形成や発達がよくなった。このように、アスパラガス不定胚の発達や植物体再生の効率化条件が明らかとなり今後の活用が期待される。

### 4. 不定胚培養系の遺伝的安定性

これまでアスパラガスの腋芽培養系を用いて増殖した再生植物の根の染色体を観察した結果では、染色体数の異常や形態変異は報告されていない<sup>80,81)</sup>。また、カルス培養と茎頂培養によって増殖した超雄株と雌株を交配して次代の生育を調査した結果、有意差は認められなかったとしている<sup>14)</sup>。しかし、カルス経路による個体再生では、二倍体の親植物から四倍体のみが得られた例がある<sup>29)</sup>。

また、Arakiら<sup>3)</sup>は、NAA、BAを添加した培地でカルスを誘導し、そのカルス細胞の染色体数や核数等の変異を観察した結果、カルスによる培養変異には品種間差があり、カルス上で染色体数の変異が小さい系統では、再生植物で変異が認められず、継代培養が長期化するほど変異は拡大したとしている。さらに、不定胚形成では、Odakeら<sup>47)</sup>が、NAAとカイネチンを添加して誘導したECから再生した植物に染色体数の倍加が生じたと報告した。すなわち、起源植物は二倍体を供試したが、特に液体培地で誘導したカルス細胞から再生した6系統からの再生植物は全て四倍体になり、寒天培地で誘導した場合は半数の系統で二倍体株を再生したとしている。

これまでのアスパラガスの不定胚形成では、2,4-Dを添加した寒天培地上で誘導したECから再生した植物では、調査数が十数個体と少ないものの染色体数の変異は認められていない<sup>30,70)</sup>。しかし、培養系では変異が発生しないとは言えないため、本実験では、多芽集塊から誘導し、選抜したECから不定胚形成により再生した植物の染色体数を調査した。その結果、染色体数の異常の発生が殆どない系統とかなり高頻度で発生する系統が認められた。この染色体数異常の発生の系統間差があることと再生植物に異常株の発生が認められない系統が存在する点はArakiら<sup>3)</sup>の報告と一致した。また、‘ヒロシマグリーン’の三倍体系統では、約2000株の再生植物や液体振盪培養を18代繰り返した後に再生した植物でも異常株が認められなかった。同様に他の数系統にも4~15代の継代培養で再生植物中に異常株が認められなかった。一方、Odakeら<sup>47)</sup>と同様に親株が二倍体であるのに再生植物が全て四倍体となる系統の他、再生植物が全て水浸状や短根などの異常形態を示し、異数体が発生する系統が認められた。これらは、植物体が基からもつソマクロナル変異<sup>31)</sup>によるものか、ECを誘導あるいは継代培養中に生じた突然変異によるものか明らかでないが、不定胚形成により形態異常が認められることから、農業利用上は変異の少ない系統を選抜することが重要と考える。なお、染色体数に異常の認められる細胞系統では、苗条・根の水浸状化や主根が短く吸収根の発生が少ない等の形態異常が認められる場合が多いことから、再生植物の形態観察の結果からフィードバックして異常な細胞系統を除去するシステムも構築できると考える。Ammirato<sup>1)</sup>は、不定胚からの再生植物の場合、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し、Arakiら<sup>3)</sup>もカルス上で染色体数の異常がみられても、再生植物に異常がない場合があることを示している。本報でも、再生植物に染色体数異常の殆どない系統が認められることから、このようなECを選抜することにより、苗生産システムの構築

が可能であると考えられる。

しかし、組織培養による苗生産ではどのような安定した培養系でも変異が生じる場合があることを前提とし、培養細胞の核型変異<sup>72)</sup>、カルス染色体数<sup>3)</sup>等の細胞レベルの経時的調査を行ってさらなる安定した培養系を確立する必要がある。また、培養細胞や植物体の倍数性を簡易に迅速に解析できるフローサイトメトリー<sup>37,36,50)</sup>等の利用技術も開発され、アスパラガスでもOzakiら<sup>48)</sup>により倍数性が判別可能となっている。今後は、これらの手法を用いることにより、変異の少ないECの選抜による優れた培養系の確立が可能になると考える。

また、ニンニクの不定胚培養系では、薛ら<sup>61)</sup>が、培養の長期化により再分化能力が低下すると報じており、著者も同様な現象を観察している。これと培養変異の関係は明らかではないが、正常と推定されるECでも定期的に更新するシステムの構築も今後必要であろう。なお、本報ではGUS遺伝子を導入した形質転換体から誘導した多芽集塊からECを誘導し、導入した遺伝子がEC、不定胚にキメラになることなく安定して存続することを実証した。これは、形質転換体における遺伝子の動態や培養系の遺伝的安定性等の解析に本培養系が応用できる可能性を示している。

## 5. 培養苗生産システムの構築

以上、不定胚形成による一連の培養系を開発した。しかし、培養苗を効率的で実用的に生産するには以下のような課題が残されている。1) 培養した植物体の馴化後の乾燥に対する耐性の強化、2) 培養植物の生育促進および培養期間の短縮、3) 培地作成における高圧殺菌過程の省略と移植の効率化による省力及び低コスト化、4) 培養苗の周年馴化、均一な苗の育成と保存技術の開発。

1, 2)については、通気培養<sup>2,50,73)</sup>、炭酸ガス施用法<sup>5,11,13,23,28,29,43)</sup>が開発されている。3)については、簡易殺菌培養法<sup>66,79)</sup>やフッソ樹脂フィルム容器を利用した培養法<sup>40,41,68,69,70)</sup>など多くの報告があり、新素材や新薬品を活用した培養法の改良が日進月歩で進められている。また、4)は種子苗で播種作業の効率化や苗の均一性を図るため、小型の容器で育成された成型苗(根鉢の形状が一定である苗)を作成するセル成型育苗箱を用いた苗生産法の開発が進められている<sup>27,44)</sup>。そこで、アスパラガスの培養苗生産にも、これらの応用を検討した。

通気培養では、苗の順化開始後の乾燥耐性について検討し、強化できた。これは培養苗の苗条表面の走査電子顕微鏡による観察により、Grout and Aston<sup>15)</sup>やSutter and Langhans<sup>65,66)</sup>と同様にエピククラワックスの多量の形成(図2-9)と苗の気孔開閉の調節機能の維持による

ものと考えられた。

炭酸ガス施用では、苗の生体重が無施用の約1.4倍となり(図2-10)、特に地下部の生体重が顕著に増加するなど生育促進効果が認められた(図2-11)。これは、今後、稲垣ら<sup>24)</sup>が実生苗で行っている光強度、炭酸ガス濃度、温度などの相互関係の検討により、生育を促進できる培養系の確立が可能となると考える。

高圧殺菌過程を省略した培養苗生産の省力及び低コスト化では、次亜塩素酸ナトリウム溶液を培地に加用、あるいは噴霧により培養中の雑菌発生を抑制する簡易殺菌培養法を開発した(図2-12A)。本法は、高圧滅菌釜に入れて殺菌しにくい大型の容器にも適用できた(図2-12B)。なお、本法を用いても培養容器の洗浄のみでは十分な効果が得られない場合が認められたため、耐熱性をもち、1度に数百枚の高圧滅菌処理が可能な新素材のフッ素樹脂フィルム容器であるPCP容器の活用について検討した。その結果、簡易殺菌培養の効果が高まった。また、同容器における炭酸ガス施用効果も確認した(図2-12C, D)。この容器は、液体培地が利用できるロックウールが培地支持体として利用でき、発光ダイオードを用いた低電力・低コスト培養法も検討されており<sup>37)</sup>、今後の応用が期待される。

培養苗の馴化は、「環境変化に対して順応するための人為によって制御される過程」と Brainerd and Fuchigami<sup>3)</sup>により定義されている。この馴化の期間をできるだけ短縮し、種子と同様な育苗管理を可能とすることが、コスト低減の課題である。そこで、培養苗の効率的なセル成

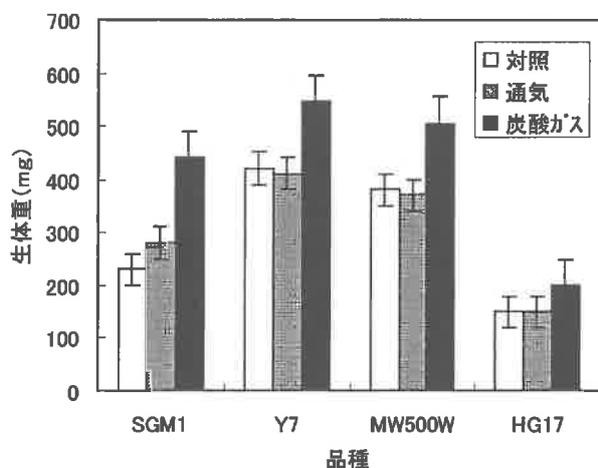


図2-10 通気培養、炭酸ガス施用が不定胚再生植物の生長(生体重)に及ぼす影響

バー：標準誤差 培養期間：30日 (HG17のみ26日)  
 培養条件：25℃、光量子束130 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ 、12時間照明  
 炭酸ガス施用区：1500ppm 施用(照明時間中のみ)  
 培養容器：図2-11参照、75×75×100mm、9マスのしきり付き、蓋に通気穴(直径8mm)+無菌通気膜貼付

型育苗を検討した。その結果、馴化が困難な夏季はミスト灌水、寒冷紗1枚被覆(光量子束60 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ 以下)で管理すると、培地の地温を下げ植物体の活着率を高めた。また、冬季においても温度が10℃以上で湿度が好適に制御できれば馴化が可能であった。馴化苗の状況は図2-13A, Bに示す。しかし、寒冷期の育苗はコストが高いため、定植時期の5月まで冷蔵保存する方法も開発した(図2-13D)。今後、これらの苗生産技術が活用され、組織培養で増殖できる優良品種が次々と誕生することを期待したい。

## 引用文献

- 1) Ammirato, P. V. : 1989. Recent progress in somatic embryogenesis. Newsletter. International association for plant tissue culture. 57 : 2-16.
- 2) 荒井滋・浅尾浩史・小島博文 : 1991. イチゴ培養苗の生育と苗質における炭酸ガス施用効果. 奈良農試研報 22 : 9-16.
- 3) Araki, H., H. Shimazaki, Y. Hirata, T. Oridate, T. Harada and T. Yakuwa : 1992. Chromosome number variation of callus cells and regenerated plants in *Asparagus officinalis* L. Plant tissue culture letters. 9 (3) : 169-175.
- 4) Brainerd, K. E. and L. H. Fuchigami : 1981. Acclimatization of aseptically apple plants to low relative humidity. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 106 : 515-518.
- 5) Bui Dang Ha, D. : 1975. Regeneration of *Asparagus officinalis* L. through Callus Cultures Derived from Protoplasts. J. Exp. Bot. 26(91) : 263-270.
- 6) Cheatham, R. D., C. Mikloiche, M. glubiak and P. Weathers : 1992. Micropropagation of a recalcitrant male asparagus clone (MD 22-8). Plant Cell Tiss. Org. Cult. 31 : 15-19.
- 7) Chin, C. K. : 1982. Promotion of shoot and root formation in asparagus *in vitro* by ancymidol. HortScience 17(4) : 590-591.
- 8) 長久 逸・甲村浩之・池田好伸 : 1991. アスパラガスの高密度多芽状集塊の誘導と植物体再生. 広島農試報告 54 : 25-31.
- 9) D'Amato, F. : 1975. The problem of genetic stability in plant tissue and cell cultures. In crop genetic resources for today and tomorrow (O. H. Frankel and J. G. Hawkes, eds.) Cambridge univ. press, London : 333-348.

- 10) Deburgh, P., Y. Harbaoul and R. Lemeur : 1981. Mass propagation of globe artichoke (*Cynara scolymus*): Evaluation of different hypotheses to overcome vitrification with special reference to water potential. *Physiol. plant.* **53**(2) : 181-187.
- 11) Deng, R. and D. J. Donnelly : 1993. *In vitro* hardening of red raspberry through CO<sub>2</sub> enrichment and relative humidity reduction on sugar-free medium. *Can. J. Plant Sci.* **73**(4) : 1105-1113.
- 12) Fujimura, T. and A. Komamine : 1979. Synchronization of somatic embryogenesis in a carrot suspension culture. *Plant. Physiol.* **64** : 162.
- 13) 富士原和宏・古在豊樹・渡部一郎 : 1987. 植物組織培養器内環境の基礎的研究(3)培養小植物体を含む閉栓容器内の炭酸ガス濃度測定と培養小植物体の純光合成速度の推定. *農業気象* **43**(1) : 21-30.
- 14) Greiner, H. D. : 1979. Phenotype features in sexually produced progenies of vegetatively propagated asparagus strains by tissue culture. In : *Proc. 5th International Asparagus Symposium* (G. Reuther, ed.). Eucarpia Section Vegetables. Geisenheim Forschungsanstalt, Germany : 150-155.
- 15) Grout, B. W. W. and M. J. Aston : 1977. Transplanting of cauliflower plants regenerated from meristem culture. I. Water loss and water transfer related to changes in leaf wax and to xylem regeneration. *Hort. Res.* **17**(1) : 1-7.
- 16) 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.
- 17) Hasegawa, P. M., Murashige, T. and Takatori, F. H. : 1973. Propagation of asparagus through shoot apex culture. II. Light and temperature requirements, transplantability of plants, and cytological characteristics. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **98** : 143-148.
- 18) 長谷川繁樹・谷口義彦・沖森當・笈三男 : 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.
- 19) 星川清親 : 1975. イネの生長. *農文協* : 266-267.
- 20) ——・北条良夫 : 1976. 作物その形態と機能 (上) *農業技術協会* : 14-16.
- 21) 稲垣昇・津田和久・前川進・寺分元一 : 1989. アスパラガスの光合成に及ぼす光強度, CO<sub>2</sub>濃度及び温度の影響. *園学雑* **58**(2) : 369-376.
- 22) Jefferson, R. : 1987. Assaying chimeric genes in plants : the GUS gene fusion system. *Plant. Mol. Biol. Rep.* **5** : 387-405.
- 23) Jin, B., H. R. Dong and X. H. Yang : 1993. Influence of gaseous environment and light on growth of tissue-cultured carnation plants. *Acta Hort. Sinica.* **20**(4) : 389-393.
- 24) 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**(2) : 62-78.
- 25) ——・原田 宏 : 1982. 不定胚形成. *細胞工学* **1**(3) : 29-34.
- 26) Kamada, H. and H. Harada : 1981. Changes in the endogenous level and effect of abscisic acid during somatic embryogenesis of *Daucus carota* L. *Plant cell physiol.* **22**(8) : 1423-1429.
- 27) Koranski, D. S. and Karlovich, P. : 1989. Plugs : problems, concerns and recommendations for the growth. *Glower Talks* **53**(8) : 28-34.
- 28) Kozai, T. and Y. Iwanami : 1988. Effects of CO<sub>2</sub> enrichment and sucrose concentration under high photon fluxes on plantlet growth of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) in tissue culture during the preparation stage. *Jap. J. Hort. Sci.* **57**(2) : 279-288.
- 29) 古在豊樹・岩浪好恵・富士原和宏 : 1987. 炭酸ガス施用が増殖培養時におけるスターチス (*Limonium Hybrid*)の小植物体の生長に及ぼす影響. *植物組織培養* **4**(1) : 22-26.
- 30) Kunitake, H. and M. Mii : 1990. Somatic embryogenesis and plant regeneration from protoplasts of asparagus (*Asparagus officinalis* L.). *Plant Cell Rep.* **8** : 706-710.
- 31) Larkin, P. J. and W. R. Scowcroft. : 1983. Somaclonal variation and crop improvement. In "Genetic engineering of plants : An agricultural perspective" (T. Kosuge, C. P. Meredith and A. Hollaender eds. Plenum, New York. : 289-314.
- 32) Malnassy, P. and Ellison, J. H. : 1970. Asparagus tetraploids from callus tissue. *Hort Science* **5** : 444-445.
- 33) Marie, D. and S. C. Brown : 1993. A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species. *Biol. Cell.* **78** : 41-51.
- 34) Masuda, K., Y. Kikuta and Y. Okazaki : 1981. A revision of the medium for somatic embryogenesis in a carrot suspension culture. *J. Fac. Agr. Hokkaido Univ.* **60**(3) : 183-192.

- 35) Matsubara, S. and W. J. Clore : 1974. Vegetative propagation of asparagus from lateral buds. Sci. Rep. Fac. Agric. Okayama Univ. **43** : 19-26.
- 36) 三柴啓一郎・三位正洋 : 1998. 植物細胞へのフローサイトメトリーの応用 細胞工学 **17**(4) : 609-615.
- 37) Miyashita, Y., Y. Kitaya, T. Kozai and T. Kimura : 1995. Effects of red and far-red light on the growth and morphology of potato plantlets *in vitro*. Using light emitting diode as a light source for micropropagation. Acta Hort. **393** : 189-194.
- 38) 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**(2) : 158-161.
- 39) — and F. Skoog : 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with Tobacco tissue cultures. Physiol. plant. **15** : 473-497.
- 40) Nagae, S., T. Takamura, M. Goi and M. Tanaka : 1995. Micropropagation of gerbera in the culture pack-rockwool system with sugar-free medium under non-sterile condition. Acta Hort. **393** : 157-164.
- 41) —, T. Takamura, M., T. Tanabe, A. Murakami, K. Murakami and M. Tanaka. : 1996. *In vitro* shoot development of *Eucalyptus citriodora* on rockwool in the film culture vessel under CO<sub>2</sub> enrichment. J. For. Res. **1** : 227-230.
- 42) 中島寿亀・桑原宏・田中政信 : 1989. 胚様体・苗条原基の利用技術の開発 2. 苗条原基法を用いた試験管内大量増殖. 佐賀農試報 **25** : 65-71.
- 43) Navarro, C., C. Teisson, F. Cote and J. Ganry : 1994. Effects of light intensity and CO<sub>2</sub> concentration on growth of banana plants (*Musa* AAA, cv. 'Petite Naine') *in vitro* and subsequent growth following acclimatization. Scientia Hort. **60** (1-2) : 42-54.
- 44) 西貞夫・崎山亮三 : 1993. 育苗方式を異にする苗の一般名称について. 農業及び園芸 **68**(5) : 579-593.
- 45) Nitzsche, W. : 1983. Germplasm preservation. Handbook of plant cell culture, techniques for propagation and breeding. : 782-805.
- 46) 信森達也・内藤泰典 : 1987. 組織培養によるツクネイモの大量増殖. 園学雑 **56**(2) : 260-261.
- 47) Odake, Y., A. Udagawa, H. Saga and M. Mii : 1993. Somatic embryogenesis of tetraploid plants from internodal segments of a diploid cultivar of *Asparagus officinalis* L. grown in liquid culture. Plant Sci. **94** : 173-177.
- 48) Ozaki, Y., K. Narikiyo, M. Hiramatsu, K. Ureshino and H. Okubo : 1998. Application of flow cytometry for rapid determination of ploidy levels in asparagus. J. Fac. Agr. Univ. **43** (1-2) : 83-88.
- 49) 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.
- 50) 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. 農林水産技術会議編 : 116-127.
- 51) —・高谷昌紀・平松純子 : 1986. ニンジン胚様体形成の同調化とプロトプラスト培養. 植物の化学調節 **21**(1) : 58-62.
- 52) Pfosser, M., A. Amon, T. Lelley and E. Heberle-Bors : 1995. Evaluation of sensitivity of flow cytometry in detecting aneuploidy in Wheat using disomic and ditelosomic Wheat-Rye addition lines. Cytometry. **21** : 387-393.
- 53) Reinert, J. : 1958. Untersuchungen ber die Morphogenese an gewebeulturen. Ber. Dtsch. Bot. Ges. **71** : 15.
- 54) —, Y. P. S. Bajaj and B. Zbell : 1977. Aspects of organization-organogenesis, embryogenesis, cytodifferentiation. In : H. E. Street (eds.) Plant tissue and cell culture. University of California Press, Berkley : 389-427.
- 55) Reuther, G. : 1977. Adventitious organ formation and somatic embryogenesis in callus of asparagus and iris possible application. Acta Hort. **78** : 217-224.
- 56) — : 1984. In handbook of plant cell culture (W. R. Sharp et al. ed. Section IV Vegetables : 8. Asparagus. Macmillian, New York. **2** : 211-242.
- 57) Rick, C. M. and Hanna, G. C. : 1943. Determination of sex in *Asparagus officinalis* L. Amer. J. Bot. **30** : 711-714.
- 58) Robbins, W. W. and Jones, H. A. : 1925. Secondary sex characters in *Asparagus officinalis* L. Hilgardia. : 183-202.
- 59) Saito, T., S. Nishizawa and, S. Nishimura : 1991. Improved culture conditions for somatic embryogenesis from *Asparagus officinalis* L. using an aseptic ventilative filter. Plant Cell Rep. **10** : 230-234.
- 60) 佐藤洋・原田隆・八鍬利郎 : 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.
- 61) 薛惠民・荒木肇・八鍬利郎 : 1991. ニンニクにおける embryogenic callus 形成と植物体再生の品種間差異. 植物組織培養 8 (3) : 166—170.
- 62) Snow, R. : 1985. Improvements in methods for the germination of orchid seeds. Amer. Orchid Soc. Bull. 54 : 178—181.
- 63) Stanley, B. H., W. A. Dean, W. L. Sarah and 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.
- 64) Steward, F. C., S. M. Caplin and K. Mears : 1958. growth and organized development of culture cells. II Organization in cultures grown from freely suspended cells. Amer. J. Bot. 45 : 705—708.
- 65) Sutter, E. and R. W. Langhans : 1979. Epicuticular wax formation on carnation plantlets regenerated from shoot tip culture. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 104(4) : 493—496.
- 66) — and — : 1982. Formation of epicuticular wax and its effect on water loss in cabbage plants regenerated from shoot—tip culture. Can. J. Bot. 60 (12) : 2896—2902.
- 67) 鈴木誠一・下西恵・石川雅也・大澤勝次 : 1991. メロン苗条原基・不定胚の生長抑制法による *in vitro* 保存法の開発. 植物組織培養 8(3) : 193—197.
- 68) Tanaka, M, M. Goi and T. Higashiura : 1988. A novel disposable culture vessel made of fluorocarbon polymer films for micropropagation. Acta Hort. 226 : 663—670.
- 69) — : 1991. Disposable film culture vessels. Biotechnology in agriculture and forestry. Springer-verlag, Berlin Vol. 17 : 212—228.
- 70) 田中道男・長江嗣朗・高村武二郎・草薙直子・氏家正徳・五井正憲 : 1996. 数種園芸植物の種苗生産におけるフィルム培養システムの有効性と実用性. 植物工場学会 8 (4) : 280—285.
- 71) Tanaka, R. and H. Ikeda : 1983. Perennial maintainance of annual *Haplopappus gracilis* (2n=4) by shoot tip cloning. Jpn. J. Genet. 58 : 65—70.
- 72) 田代洋丞・宮崎貞巳 : 1985. 7. クローン増殖技術と変異の発生. クローン植物大量生産の実際技術. 田中隆荘編 CMC 社 : 66—76.
- 73) 寺坂治 : 1983. 染色体標本の作成法 実験生物学講座 8. 細胞生物学 新津恒良, 沖垣達編 丸善
- 74) Tompson, R. C. : 1930. Asparagus culture. U. S. Dept. Agr. Farmers Bull. : 1646.
- 75) 浦上敦子 : 1990. アスパラガス (*Asparagus officinalis* L.) の単細胞培養と不定胚形成による植物体再生. 北農試報 154 : 103—109.
- 76) Wardle, K., E. B. Dobbs and K. C. Short : 1983. *In vitro* acclimatization of aseptically cultured plantlets to humidity. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 108(3) : 385—389.
- 77) Wilmar, C. and M. Hellendoorn : 1968. Growth and morphogenesis of asparagus cells cultured *in vitro*. Nature 217 : 369—370.
- 78) 八鍬利郎・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.
- 79) Yanagawa, T., M. Nagai, T. Ogino and R. Maeguchi : 1995. Application of disinfectants to orchid seeds, plantlets and media as a means to prevent *in vitro* contamination. Lindleyana 10(1) : 33—36.
- 80) Yang, H. J. and W. J. Clore : 1973. Rapid vegetative propagation of asparagus through lateral bud culture. HortScience 8 : 141—143.
- 81) — and — : 1974a. Development of complete plantlets from moderately vigorous shoots of stock plants of asparagus *in vitro*. HortScience 9 : 138—140.
- 82) — and — : 1974b. Improving the survival of aseptically cultured asparagus plants in transplanting. HortScience 9 : 235—236.
- 83) — and — : 1975. *In vitro* reproductiveness of asparagus stem segments with branch—shoots at a node. HortScience 10 : 411—412.



### 第3章 アスパラガスの不定胚培養苗の栽培特性

アスパラガス (*Asparagus officinalis* L.) では、日本国内の農産物市場の評価基準が厳しいことから若茎の外観品質がよく揃った品種が、また、栽培面からは収量が多い雄株品種の育成が望まれている。アスパラガスは雌雄異株の作物であり、品種育成は一般に雌雄株間の交配種子により行われ、近年では親株を組織培養を利用して効率的に増殖するクローナルハイブリッド育種法<sup>1)</sup>が用いられ、従来の集団育種法に比べてかなり良質な品種が育成されてきた。しかし、雌株が半数程度混在することと株間の品質・収量のばらつきは依然として大きかった。雌株は落下種子から実生を発生し永年雑草化し、また、国内の西南暖地の露地栽培で重要病害とされる茎枯病の発生源となる<sup>6,10)</sup>ため、雄株だけを栽培することが除草労力を省力化し、茎枯病の耕種的防除にもつながる。欧米では、花器の雌蕊と雄蕊がともに発達している間性株<sup>3)</sup>や葯培養<sup>5,21)</sup>を利用した超雄株の作出が実用化し、これを優良な雌株と交配することにより全雄品種の育成が進められている。しかし、この育成方法では、間性株の作出や葯培養が可能な系統が限られているため、若茎頭部のしまりがよく、アントシアンの着色が少ない良質品種が未だ育成されていない。そこで、著者は前章のように不定胚形成を利用した大量増殖技術の開発を行い、優良な雄株の培養苗を供給するシステムを確立した。

本植物の特性調査には、実生養成から収穫にわたり数年間の長期を要し、収穫にも多大な労力を必要とするため、組織培養により増殖した株の栽培特性に関する報告は少なかった<sup>15,20)</sup>。しかし、これらの報告も春季に2ヶ月程度のみ若茎を収穫し、その後は株養成のみを行う寒冷地で一般的な春採り栽培によるものであった。国内の西南暖地では、台湾で開発された母茎留莖栽培<sup>2)</sup>を基にした全期立莖栽培<sup>11)</sup>が約10年前から普及し、畦の長さ1m当り10本の母莖を立て、光合成を効率的に行いながら新たに萌芽した若茎を収穫する栽培法が定着している。そのため、露地栽培の収穫期間は4月から10月、ハウス栽培では2月から11月にわたる長期化が進み、これらの長期栽培法における培養苗の特性調査は皆無であった。したがって、本研究では、不定胚形成により増殖した培養株の若茎品質、性、収量の各特性について全期立莖栽培法を用いて調査し、その有効性を検討した。

## 実験材料と方法

### 1. 植物材料と培養苗の増殖法

広島県立農業技術センター（東広島市八本松町）で栽培・維持しているアスパラガス (*Asparagus officinalis* L.) の三倍体品種‘ヒロシマグリーン’ (2n=30, Na17系統) の若茎を1989年5月に採取した。不定胚形成カルス (EC) の誘導材料を若茎の茎頂組織とし、第2章の方法で植物体を再生した (以下、HG17 (SE) と略)。また、‘メリーワシントン500W’ (MW500W) の実生茎切片を材料とし (1986年8月培養)、同様な方法で雌雄2系統の再生植物を得た (雄株, MW1 (SE); 雌株, MW2 (SE) と略)。いずれも健全な発根の認められた個体を馴化培土に移植し、苗として養成した。これらの培養苗はガラス室内で馴化養成後、草丈25~35cm、茎数3本程度に調整し、1990年7月に当センター圃場に定植した。また、‘ヒロシマグリーン’ では、株分けによる増殖株 (以下、HG17 (CDR) と略) も同様に定植した。種子繁殖品種は、隣接圃場の同年生で同栽培法の‘MW500W’ (2n=20)、‘ウエルカム’ (2n=20)、‘ヒロシマグリーンA’ (2n=30)、‘セトグリーン’ (2n=40) の4種を対照とし、いずれも1992~1994年の3年間、特性および収量の調査を行った。

また、広島県内の現地栽培圃場の20,000株を調査して選抜した優良雄株系統‘Y6’を用い、第2章の多芽集塊からECを誘導することにより不定胚経路による再生植物を得た。これを、1995年5月にセンター内の別圃場に1区10株2反覆で定植し、1996~1998年の3年間、特性および収量調査を行った。対照として種子繁殖品種の‘MW500W’ と‘ウエルカム’ を供試した。定植時の苗の大きさは、草丈35~45cm、茎数8~10本、茎径2~3mmであった。さらに、培養株と種子繁殖株の個体間差を調査するため、株別の収量調査も行った。

### 2. 耕種概要

試験場所 (東広島市) の年平均気温は13℃、降水量は1500mmである。圃場は水田転換畑であり、土質は粗粒質灰色低地土である。1990年定植では、畦間180cm、株間30cm、1995年定植では畦間200cm、株間40cmとし、いずれも1条植えとした。1年間の株養成後、翌年から全期立莖栽培法<sup>11)</sup>により栽培した。母莖の立莖開始は、降霜のなく

なる毎年5月1日とした。母茎の立茎数は、1990年定植では、培養株1株当り3本、種子繁殖株1m当り3~4本とし、1995年定植では1株当り4本とした。肥料は、1990年定植の1年目は窒素成分で15kg/10aの化成肥料、収穫年は、肥効調節型の被覆リン硝安カリ（NPK=13-13-11%，180日型）または初期溶出抑制型の被覆リン硝安カリ（同14-12-14%，180日型）を用い、窒素成分で30~40kg/10a施用した。また、露地栽培であるため、酒井ら<sup>10)</sup>の方法により茎枯病防除を徹底し、冬期における残存茎の抜き取りと圃場表面の焼却を行い、パーク堆肥マルチを行った。

### 3. 調査項目

性、若茎の品質および収量の3つの主要な特性について調査した。性については、八鍬ら<sup>25)</sup>の花の構造型の区分に準じて雌雄の性比と構造型を、また、母茎の立茎開始後の側枝上の開花時期について観察した。若茎の品質については、若茎頭部のしまり等の形態、若茎頭部・基部・りん片葉へのアントシアンの着色性、若茎の丸さ、りん片葉の形状、搾汁の可溶性固形物値（Brix値）等を調査した。Brix値の調査は、デジタル糖度計（dbx-30、愛宕製作所製）を用い、長さ25~30cmの範囲に伸長した若茎の頭部から5cmの位置で2cm程切り出し、搾汁を絞って測定した。若茎の収量は、萌芽後25cm以上に伸長した若茎を圃場で収穫後、頭部から25cmの位置で切りそらえた調整重の合計を収量として算出し、収穫本数、サイズ等級も合わせて調査した。若茎のサイズ等級は、市場評価基準と同様に25cm調整重の重さ別とし、3L:50g以上、2L:30~49g、L:20~29g、M:12~19g、S:9~11gを規格品、8g以下を規格外品とした。その他、春先

の萌芽時期の差異（温度に対する感応性）、母茎の立茎径、草丈、茎数、第1次側枝高、第1次側枝~第6次側枝間の節間長等を調査した。なお、これらの調査項目は主として農林水産省のアスパラガス品種登録基準に基づいて行った。

## 結 果

### 1. 不定胚由来培養株の生育と栽培特性

#### 1) 性や開花に関する特性

培養株や株分け株の性は、同系統内ではいずれも同じ雌雄性を示し、花の構造による分類でも同じ型であった（表3-1）。また、花の長さ（表3-1）、花色、胚珠長、子房長および柱頭長も揃いがよかった。一方、種子繁殖株の性はいずれも雌雄に分離し、いずれの品種も雄株が55~66%と若干多い傾向にあった（表3-1）。また、種子繁殖株では、花の構造や花長にもばらつきが多かった。

開花時期は、培養株では系統により早晚があるものの同系統内ではほぼ同時であった（表3-2）。培養株の開花時期の揃いを図3-1Bに示す。しかし、種子繁殖株では開花時期のばらつきが大きく、同時に開花することはなかった。

3年間の栽培後、種子繁殖株の栽培区では、雌株の落下種子から実生が多数発芽（約300個体/m<sup>2</sup>）し、雑草化したが、雄株の培養株の栽培区では実生の発生が認められなかった。

#### 2) 若茎の形態特性

若茎頭部の形状は、培養株‘HG17(SE)’、株分けの‘HG17(CDR)’、培養株‘MW1(SE)’および‘MW2(SE)’では、いずれも品種登録基準のII型を示し、均一

表3-1 栄養繁殖株（培養株・株分け）と種子繁殖株の性比および花の構造の差異

品種・系統	調査個体数	性比 (%) 雄:雌	花の構造による分類 <sup>a</sup> (%)				花の長さ (mm)
			2♂	3♂	4-5♂	6♀	
HG17(SE)	119	100:0	0	100	0	0	6.8±0.0
HG17(CDR)	9	100:0	0	100	0	0	6.8±0.0
ヒロシマグリーンA	40	55:45	0	15	40	45	♂6.6±0.1, ♀4.2±0.2
MW1(SE)	19	100:0	100	0	0	0	5.0±0.0
MW2(SE)	7	0:100	0	0	0	100	4.0±0.1
MW500W	61	66:34	51	13	2	34	♂5.5±0.2, ♀3.6±0.2
セトグリーン	37	57:43	22	35	0	43	♂7.0±0.1, ♀14.6±0.1
ウエルカム	45	56:44	38	18	0	44	♂5.5±0.1, ♀3.5±0.1

<sup>a</sup> 八鍬ら(1983)による分類:花の構造タイプ:2;雄(小さい痕跡的な雌ずいで花柱なし),3;雄(小さい花柱のついた中間サイズの雌ずいをもつ),4-5;雄(ほぼ完全な花柱のついた大きな雌ずいをもつ),6;雌(雌ずいがなく、完全な雌ずいのみをもつ),1992年5月調査

表3-2 栄養繁殖株(培養株・株分け)と種子繁殖株の開花時期の差異

品種・系統	調査 <sup>z</sup> 個体数	雄株率 (%)	開花時期 (%)					
			雄株 <sup>y</sup>			雌株 <sup>y</sup>		
			始	中	終	始	中	終
HG17(SE)	70	100	0	100	0	—	—	—
HG17(CDR)	9	100	0	100	0	—	—	—
ヒロシマグリーンA	38	55	19	48	33	29	47	24
MW1(SE)	9	100	0	0	100	—	—	—
MW2(SE)	7	0	—	—	—	0	0	100
MW500W	66	59	18	74	8	26	41	33
セトグリーン	36	58	24	62	14	47	47	6
ウエルカム	33	55	11	78	11	20	33	47

<sup>z</sup>母茎の立茎開始を1994年5月1日とし、各株中で最も早く立茎開始を行った茎(150cm以上)を6月7日に調査

<sup>y</sup>開花ステージ別の株割合：高さ1mの位置の側枝の開花状態を観察

始：側枝基部の花が開花， 中：側枝中央部の花が開花， 終：側枝先端部の花が開花

であった(表3-3)。しかし、種子繁殖の4品種では、I型、III型も出現し、ばらついた。

若茎各部位のアントシアニンによる赤あるいは紫色の着色は、培養株あるいは株分けの‘HG17’系統では、いずれも頭部、りん片葉および基部にかけて赤みの強い発色が認められた(表3-3)。同株の特徴を図3-1D、Eに示す。しかし、種子繁殖品種では、いずれも赤みのある株とほとんど赤みのない株が認められた。また、‘HG17’系統の若茎頭部のしまり状態は圃場の土壌水分が低下した8月期には不良となり、时期的な差異が認められたが、若茎頭部の形状や色は、4月～9月の萌芽収穫期間中を通してほぼ均一であった。

若茎の丸さは、培養株‘HG17(SE)’と種子繁殖の3

品種間でのばらつきの差が小さかったが、培養株では、短径と長径の比が1に近い、丸い若茎が多い傾向が認められた(図3-2A)。りん片葉の高さと底辺の比(高さ/底辺長)は、培養株の‘HG17(SE)’では、ほぼ1.0～1.3の範囲で、りん片葉の先が細くとがった形状を示す傾向が認められたが、種子繁殖品種では、平たい三角形のものも多く、ヒストグラム上に2つの山が出現するなど、遺伝的分離現象が認められた(図3-2B)。

可溶性の固形物値(Brix値)は、株分け株の‘HG17’系統が高い値(6～7%)を示し、同培養株も同程度に高かった。一方、2倍体の種子繁殖品種の‘MW500W’や‘ウエルカム’のBrix値は5～6%であった。

表3-3 栄養繁殖株(培養株・株分け)と種子繁殖株の若茎頭部の形状および各部位のアントシアニンの着色性の差異

品種・系統	調査 株数	若茎頭部 <sup>z</sup> の形態	若茎各部の着色								
			頭部			鱗片葉			基部		
			— (1)	＋ (2)	＋＋ (3)	— (1)	＋ (2)	＋＋ (3)	— (1)	＋ (2)	＋＋ (3)
HG17(SE)	20	II	0	19	1	0	3	17	0	13	7
HG17(CDR)	5	II	0	4	1	0	1	4	0	4	1
ヒロシマグリーンA	23	II～III	11	12	0	5	15	3	8	9	6
MW1(SE)	5	II	1	4	0	0	5	0	5	0	0
MW2(SE)	5	II	4	1	0	0	5	0	0	5	0
MW500W	20	I～III	13	5	2	9	9	2	13	3	4
セトグリーン	22	II～III	11	11	0	9	12	1	10	8	4
ウエルカム	24	II～III	23	1	0	12	12	0	22	2	0

<sup>z</sup>若茎は1993年8月9日にアスパラガスの種苗登録のための特性審査基準に基づいて調査、

I：尖塔型 II：中間 III：丸型

<sup>y</sup>外観による —：発色無し， ＋：僅かに赤 ＋＋：赤みが強い

表3-4 栄養繁殖株（培養株・株分け）と種子繁殖株の収穫若茎の太さ別等級の割合の差異

品種系統	若茎の太さ等級別割合 (%) <sup>2</sup>				
	S	M	L	2L	3L
HG17 (SE)	15	17	61	7	0
HG17 (CDR)	19	18	55	8	0
ヒロシマグリーンA	16	36	31	16	1
MW1 (SE)	45	40	14	1	0
MW2 (SE)	28	34	34	3	1
MW500W	19	40	29	12	0
セトグリーン	12	30	41	16	1
ウエルカム	23	42	25	9	1

<sup>2</sup> 若茎の太さ等級は、25cm以上の長さで収穫後の若茎を頭部から25cmの長さに切断・調整後、重量を測定し分類した。3L(≥50g), 2L(30-49g), L(20-29g), M(12-19g), S(9-11g), 1993年5月～9月間調査。

3) 栽培特性

収穫した若茎のサイズ別の等級割合は、培養株と株分けの‘HG17’系統が、ほぼ同じ傾向を示し、L級の割合が55～61%と極めて高かった。種子繁殖の‘ヒロシマグリーンA’では、2L級の割合が16%と培養株より高く、3L級も出現した(表3-4)。また、種子繁殖品種と雌株の培養株‘MW2(SE)’では、2L、3L級の若茎の割合が高くなる傾向にあり、サイズのばらつきが大きかった。

立茎した母茎の茎径は、雄株の培養株の‘HG17(SE)’では、太さ9～16mmの茎の割合が約80%と高く(表

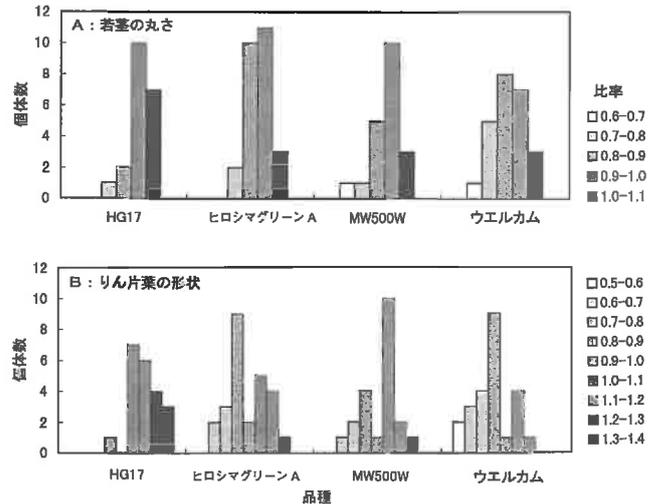


図3-2 不定胚増殖株と種子繁殖株の若茎基部の丸さおよびりん片葉の形状の差異

A: 若茎の丸さ: 若茎基部から2cm上の切断面の短径/長径比  
 B: りん片葉の形状: 基部から5cm上のりん片葉を調査, 二等辺三角形の高さ/底辺長, いずれも1993年8月9日の同じ日の午前中に収穫した25～30cm長の若茎を供試

3-5), よく揃っていた(図3-1C)。また、種子繁殖品種でも雄株は茎径20mm以下と細いものも多く、雄株は総じて茎が細く揃いがよい傾向が認められた。一方、種子繁殖品種の雌株では、茎径21mm以上の太さの茎が多く、中には25mm以上の太さの株も出現するなど茎径のばらつきが著しかった。

不定胚由来の培養株‘HG17(SE)’の3系統の株当りの若茎収量・収穫本数は、系統間で若干ばらつくものの変動係数はいずれも22%以下の範囲にあった。また、収穫2、3年目では変動係数がいずれも17%以下となり、株当りの揃いは1年目より上昇した(表3-6)。若茎の太

表3-5 栄養繁殖株（培養株・株分け）と種子繁殖株の立茎した母茎の太さ（茎径）別の本数割合の差異

品種・系統	性	観察株数	平均茎径 (mm±SE)	最大茎径 mm	母茎径の太さの別割合 (%)					
					茎径 (mm)					
					7-8	9-12	13-16	17-20	21-24	25<
HG17(SE)	♂	144	12.7±0.6	20	10	40	40	10	0	0
HG17(CDR)	♂	9	15.3±0.5	20	0	18	50	32	0	0
ヒロシマグリーンA	♂	27	13.3±0.5	18	4	26	55	15	0	0
	♀	24	16.4±0.9	24	4	21	17	42	17	0
MW1(SE)	♂	31	9.6±0.3	12	39	55	6	0	0	0
MW2(SE)	♀	31	10.1±0.3	14	13	77	10	0	0	0
MW500W	♂	40	11.0±0.4	16	10	72	15	3	0	0
	♀	61	13.8±0.5	25	3	41	36	15	3	2
セトグリーン	♂	47	15.2±0.5	22	0	32	30	32	6	0
	♀	48	16.2±0.6	25	2	19	29	33	13	4
ウエルカム	♂	50	13.1±0.5	20	8	38	38	16	0	0
	♀	41	14.9±0.6	26	7	20	41	25	5	2

<sup>2</sup> 1株当たり2本の母茎を調査(1994年6月), 茎径は基部から約5cmで測定

さによるサイズ等級では、L、M級の割合は、3系統とも3年間同様な傾向を示し、成株となる2年目以後は、L級の割合がほぼ60%と一定した。なお、1992年度の収穫1年目は草丈が低かったが、1993年、1994年には草丈243~249cm、母茎の平均径12mmと同程度に生育しており、成株に達したと推定した。なお、収穫期間中の気象は、過去10年間の平均を平年値(100%)とすると、1992年：積算平均気温99%、降水量71%、日照時間72%、1993年：同96%、171%、74%、1994年：同107%、38%、136%であった。

その他、培養株では春先の若茎の萌芽時期が、種子繁殖品種より揃いがよく、一斉の萌芽が認められた(図3-1A)。また、1993年は異常気象で夏季の降雨量が多く、圃場内で茎枯病が多発した。そのため、種子繁殖品種'MW500W'の収量は670kg/10aにとどまったが、培養株'HG17'では、同病害の発生が殆ど認められず、1500kg/10aの収量を得た。

2. 不定胚培養系を利用して選抜した優良系統の有効性評価

不定胚培養系により増殖した'Y6'系統と種子繁殖品種を比較し、培養株栽培の有効性について検討した。その結果、'Y6'の春季の若茎の萌芽時期は、'ウエルカム'や'MW500W'より2~7日早く、一斉に萌芽した(図3-3A)が、種子繁殖品種ではばらついた(図3-3B)。

草丈は、'Y6'と種子品種とはほぼ同程度、母茎の茎径は、'Y6'12mm、種子品種13~15mmと、'Y6'が種子品種より細い傾向を示した。第1側枝高、節間長の草丈に対する割合では、'Y6'の節間長が長い傾向が認められた。その他'Y6'では母茎から伸長した側枝のぎ葉が展葉した後の6月頃に、側枝から垂直に立ち上がる二次茎の発生が多い特徴が認められた(図3-3C)が種子品種では少なく、生育の旺盛なことが観察された(図3-3D)。また、地下部りん芽群の広がりもよく、株当たりの立茎し

た母茎間の最大長の平均(10株、1998年)は'Y6'が35cm(cv.3.7%)、'ウエルカム'29cm(cv.8.6%)、'MW500W'25cm(cv.9.2%)であった。

培養株'Y6'の1996から1998年までの3年間の収量は、重量・本数ともに種子品種より多く、株当りの揃いも調査した後期2年間の変動係数が10%以下で、種子品種の14~20%に比べてばらつきが小さかった(表3-7)。1茎重では'Y6'が3年間で15~17gと細い傾向にあるのに対し、種子品種では2年目から20g以上と太くなった。秀優品率は、収穫3年目の調査でよい形状の若茎が66%、変動係数も5.5%となるなどよく揃った。'Y6'の若茎は種子品種より細いが、太さがよく揃っていた(図3-4)。

若茎の重量による規格サイズ別の収穫本数では、'Y6'はL、M級の収穫本数と重量が種子品種に対して大きく増加し、2L級は減少した。

'Y6'と種子品種'ウエルカム'の個体別の収量の比較では、'Y6'では2年間、個体間ではほぼ一定した収量が得られたが、'ウエルカム'では大きくばらついた(図3-4)。ウエルカム個体間では、収量では雄株が多く、雌株は少ない傾向が認められた。また、'Y6'は、1茎重や秀優品率も一定していたが、'ウエルカム'で雌株が太く、秀品率も高い傾向が認められた。

考 察

1. 不定胚由来培養株の有効性

雌雄異株であるアスパラガスの育種では、遺伝的分離性により、均一な形質のF<sub>1</sub>種子を得ることは困難である。そのため、優良株のマイクロプロパゲーションによる増殖法が、Murashigeら<sup>10)</sup>やYang and Clore<sup>27)</sup>によって開発された。しかし、茎頂や腋芽培養法を用いた苗生産法は、移植や継代培養において多大な労力を要し、培養期間が長く健全根の発生率も低いため苗生産コストが高い<sup>20)</sup>。そこで、体細胞不定胚形成による低コスト増殖法の

表3-6 不定胚由来培養株'HG17'の3系統における3年間の若茎の収量、本数、太さの差異

系統No	株当り収量(g) <sup>a</sup>				株当り収穫本数 <sup>b</sup>				若茎の太さ別割合(%) <sup>c</sup>					
	1992	1993	1994	合計	1992	1993	1994	合計	1992		1993		1994	
									L	M	L	M	L	M
1	442(21)	786(16)	433(17)	1,661(18)	32(22)	41(15)	24(17)	97(18)	36	30	56	20	57	19
2	304(14)	792(14)	557(13)	1,653(14)	21(44)	37(14)	28(14)	86(14)	36	28	62	14	62	14
3	514(16)	853(16)	633(14)	2,000(15)	34(18)	42(17)	32(16)	108(17)	36	33	65	17	61	18
平均	420(17)	810(15)	641(15)	1,771(15)	28(18)	40(15)	27(15)	95(16)	37	32	61	17	61	17

供試数各11株、株別に収量調査。<sup>a</sup>若茎は1992年は101日、1993年は150日、1994年は159日収穫  
表中の( )は株当りの値の変動係数、<sup>b</sup>若茎の25cm調整重による等級割合 L:20-29g, M:12-19g

研究開発が進められてきた<sup>8,18)</sup>。

しかし、不定胚により増殖した培養株の栽培に関する報告はアスパラガスでは皆無であり、実用化のためにはその特性を明らかにする必要がある。腋芽培養苗の栽培では、上杉ら<sup>20)</sup>が、均一な太さの若茎を得るのに効果があるとし、小松<sup>15)</sup>も、若茎の太さや頭部の形状が揃い、選別作業が効率化されたとしている。また、ニュージーランドでは、選抜した腋芽培養により増殖した数系統が若茎の外観のよい輸出可能な秀品収量において、主要な種子繁殖品種より優れていたと報告されている<sup>9)</sup>。そこで、本研究では、不定胚形成により増殖した培養株について生育および若茎収量等の特性を調査し、これらが種子繁殖株より揃いがよく、培養株栽培の利点が高いことを明らかにした。

性や花に関する特性では、培養株の雌雄の別と花の構造が均一であった。特に培養株‘HG17’では100株以上の調査で開花時期などの揃いも良く、全て雄株であるため種子形成やその実生による雑草化も認められなかった。種子繁殖品種では、苗生産中に生育の良好な苗を選んで定植すると雄株が多くなる<sup>23,26)</sup>とされているように、栽培株中の雄株の割合が若干多かったものの、性はほぼ1:1になり、Sneep<sup>22)</sup>の理論値と一致した。なお、雌株は多数の種子を形成し、落下種子からは実生が発生した。実生は、単なる雑草としてだけでなく、茎枯病菌の中間宿主となる<sup>6,13)</sup>ことから、雄株だけの栽培の必要性が考えられた。

若茎品質に関する特性では、培養株は、頭部のしまり、色、りん片葉の形状等において種子繁殖株より均一であった。特に雄株の培養株では若茎の太さの等級も均一であり、1本が50g以上の3L級は発生することなく、30g以上の2L級も少なかった。培養株の若茎の等級は、

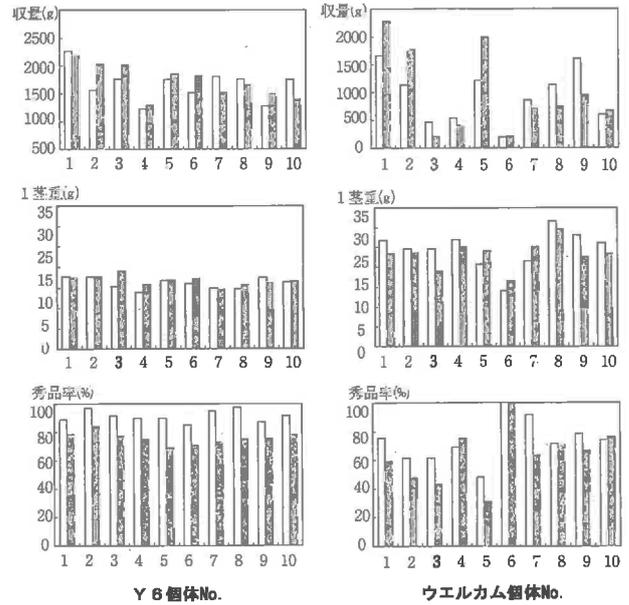


図3-4 選抜系統‘Y6’および種子品種‘ウエルカム’の若茎収量、1茎重、秀品率の個体間差と年次変動  
 左：Y6(全て雄株)，右：ウエルカム(No. 1~5が雄株，6~10が雌株)  
 収獲調査：□1997年，■1998年  
 収量：個体当たり25cm調整総重量(収獲期間：4月~9月)  
 1茎重：収量/収獲本数， 秀品率：7月~9月に調査

殆ど12~29gのL，M級に集中することから全体的に細かい傾向があるものの、種子繁殖株に比べて均一であった。この点については腋芽培養株を栽培した上杉ら<sup>20)</sup>も、株当りの1茎重や若茎の太さの変動係数が種子株より小さかったと同様な報告をしている。なお、種子繁殖株では若茎の太さに大きなばらつきが生じるが、これは立茎した母茎径の調査から、雌株が大きく太い若茎を生産する特性をもつことに原因があると推測した。

茎の丸さとりん片葉の形状は、エルウインら<sup>4)</sup>が遺伝的特性であると報告している。‘HG17’系統では、不定胚

表3-7 培養株‘Y6’及び種子品種の収穫開始3年間の収量特性の差異

調査年次	品種	株当収量 (g)	株当本数 (本)	1茎重 (g)	秀優品率 (%)
1996	Y6	1610	1060	15.2	51
	ウエルカム	920	570	16.2	41
	MW500W	940	538	17.5	38
1997	Y6	1130(8.1)	675(8.4)	16.8(2.5)	52
	ウエルカム	910(15.6)	338(14.4)	23.4(5.7)	40
	MW500W	670(16.8)	331(15.5)	20.1(5.8)	38
1998	Y6	1380(8.3)	811(8.4)	17.0(2.2)	66(5.5)
	ウエルカム	1010(18.5)	445(17.3)	22.6(4.5)	46(11.9)
	MW500W	770(19.0)	387(20.0)	20.0(5.3)	43(23.2)

試験圃場：1区10株/8m<sup>2</sup>，Y6：2反復，他3反覆  
 収量は若茎の25cm調整重量が9g以上の規格品，1茎重：株当収量/株当本数  
 秀優品率：若茎頭部のしまりのよい若茎の割合(7月~9月調査)  
 ( )は株別に調査した値の変動係数を示す。

由来の培養株と株分け株のりん片葉の形状や色が類似し、種子繁殖品種と比べても均一性が極めて高かった。そのため、りん片葉の形質は、不定胚培養で安定して維持される形質と考えられ、今後増殖した株の系統判別に有効な方法として活用できると考えられる。

培養株‘HG17’の系統間では収量において若干の差が認められたが、株ごとの変動係数は小さかった。アスパラガスでは灌水の多少が収量に影響するとされており<sup>12,13,17</sup>、降雨量が極めて多かった1993年には系統内ではほぼ一定した収量、本数が得られていることから、培養株は収量の揃いもよいと考えられる。

以上のように、不定胚由来の培養株は収量や品質が均一で、萌芽時期、茎の太さ、雄株性や耐病性等の特性も均一であった。アスパラガスの市場出荷では、太さや外観により若茎が選別され、価格も大きく左右される。培養株は均一で優良な若茎を生産でき、種子繁殖品種より有利に栽培できると考えられる。

## 2. 不定胚培養系を利用した選抜優良系統の有効性評価

前項では、不定胚培養株が栽培に有効であることを報告したが、本法の評価を高めるには、頭部の形状がよくアントシアンの紫色の発色が少ないなど近年の国内市場の評価が高い優良株を用いた実証が必要であった。そこで、北海道が行った「アスパラガス優勢種子緊急事業(1969~1971年)」<sup>26)</sup>に準じて、広島県内の産地から優良株を選抜した。選抜目標は、良質・多収の雄株であることとし、‘Y6’系統を選抜した。‘Y6’は、3年間の収穫調査において主要種子品種‘ウエルカム’より収量・品質とも優れ、株当たりの生育・収量や品質も種子品種より均一であった。

不定胚培養株の栽培特性については、これまでウド<sup>10)</sup>、バイカカラマツ<sup>14)</sup>とハリモミ類<sup>7)</sup>等で報告されている。池田ら<sup>10)</sup>によると、ウドの培養株は萌芽が早く、アントシアンの発色が少なく良質で揃いもよかったとし、本実験と同様な優良系統の選抜に至っている。また、樹木を取り扱った貴志ら<sup>11)</sup>は、バイカカラマツの培養株は栽培1年目の生育の揃いがよかったとし、Grossimickléら<sup>7)</sup>は、ハリモミ類の培養株で低温貯蔵耐性などの特性に問題が無いが、初期生育が遅いことを指摘している。しかし、不定胚培養株の栽培特性に関する報告例は極めて少ないのが実状である。これは、生産コストに見合う収益が期待できる作物に限られること、培養系の確立と効率化が優先され、栽培的な特性調査が十分進められていないことにあると考える。アスパラガスの培養苗では、北海道の寒冷地向き品種が本実験と同様な方法を用いて育成されている。また、国内でも独自に事業化して増殖を実施し

ている自治体もある。しかし、培養株に適する苗養成や栽培条件が十分解明されていないこと、長期間栽培しても収量が高い、品質がよいという保証は得られていない。今後、本研究がアスパラガスの栽培や育種研究に大きく活用されることを期待したい。

## 引用文献

- 1) Benson, B. L. and F. Takatori : 1979-1980. Foundation asparagus seed program and the release of ‘UC157’ parental clones to the seed industry. *Asparagus Research* : 25-26.
- 2) Chen, Y. W. and R. T. Jean : 1976. An experiment on the methods of maintaining and renewing the mother stalk in green asparagus. *Bull. District. Agri. Improvement Sta.* 9 : 200-203.
- 3) Ellison, J. H. and J. J. Kinelski : 1985. “Jersey Giant”, an all-male asparagus hybrid. *HortScience* 20 : 1141.
- 4) エルウイン ユリアデイ・廿日出綾・原田隆 : 1993. アスパラガスの有用形質とその発現(第3報)親株およびF<sub>1</sub>の形質の異同. *園学雑* 62(1) : 182-183.
- 5) Falavigna, A., P. E. Casali and M. G. Tacconi : 1989. Potential of in vitro anther culture technique for asparagus breeding in Italy. *Acta Hort.* 271 : 39-46.
- 6) Fukutomi, M. : 1993. Studies of stem blight of asparagus caused by *Phomopsis asparagi* (Sacc.) Bubak (3) Relationship between infection site and symptomatic area. *Bull. RIAR, Ishikawa Agr. Coll.* 3 : 31-41.
- 7) Grossnickle, S. C., J. E. Major and R. S. Folk : 1994. Interior spruce seedlings compared with emblings produced from somatic embryogenesis. I. Nursery development, fall acclimation and over-winter storage. *Canadian J. Forest Res.* 24(7) : 1376-1384.
- 8) 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.* : 167-170.
- 9) 平田行正 : 1995. アスパラガスミーティング報告. *農業及び園芸* 70(3) : 418-420.
- 10) 池田洋・中里博・小泉丈晴・田中伸子・山田文典・栗原則雄 : 1991. 不定胚から得られたウドの特性 *園学雑* 60別(2) : 240-241.
- 11) 伊藤梯右・今中義彦・長谷川繁樹・船越建明 : 1994 a. 西南暖地におけるグリーンアスパラガスの栽培に関する研究 第1報 収穫と株養成を平行させる

- 母茎留茎栽培の収量性について. 広島農技セ研報 60 : 35-45.
- 12) — : 1994 b. アスパラガスの立茎栽培による長期どり—暖地. 農業技術体系 野菜基礎編追録第19号 52 : 74-82.
- 13) — : 1999. アスパラガスの露地栽培広島の野菜作り Vegetable. JA 広島経済連・広島野菜振興協会編 : 143-146.
- 14) 貴志文昭・鏡勇吉・小山征男 : 1994. 組織培養によるバイカカラマツの大量増殖に関する研究 (第2報) 不定芽と不定胚による増殖および培養由来個体の栽培特性 植物組織培養11(2) : 103-111.
- 15) 小松史郎 : 1991. 組織培養苗の生産について園芸学会アスパラガス研究小集会資料集. 荒木肇他編 : 20-21.
- 16) 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(2) : 158-161.
- 17) 大串和義 : 1999. アスパラガスの半促成長期どり栽培における安定生産技術. 2.1, 2年生株の施肥, かん水法の違いと生育収量. 農耕と園芸 54(2) : 150-154.
- 18) Saito, T., S. Nishizawa and S. Nishimura : 1991. Improved culture conditions for somatic embryogenesis from *Asparagus officinalis* L. using an aseptic ventilative filter. Plant Cell Rep. 10 : 230-234.
- 19) 酒井泰文・伊藤佛右・田中昭夫 : 1992. アスパラガス茎枯病の発生生態 広島農技セ研報55 : 109-119.
- 20) 佐藤洋・原田隆・八鍬利郎 : 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. 北大農邦文紀14(1) : 76-89.
- 21) Simon, G., G. Pelletier and C. Raquin : 1972. La culture *in vitro* d'antheres d'asperge. C. R. Acad. Sci. : 848-851.
- 22) Sneep, J. : 1953. The significance of the andromonoecy for the breeding of *Asparagus officinalis* L. Euphytica 2 : 89-95.
- 23) Tompson R. C. : 1930. Asparagus culture U. S. Dept. Agr. Farmers Bull. : 1646.
- 24) 上杉寿和・塩川正則・馬場英実 : 1992. アスパラガス実生雄株と雌株及び側芽培養増殖株の特性. 長野野菜花き試報7 : 11-16.
- 25) 八鍬利郎・原田隆・笠井登 : 1983. アスパラガスにおける雄性系統の育成に関する研究 第2報 雄性系統における花の発育と果実着性について. 北大農邦文紀13(4) : 564-570.
- 26) — : 1986. 1. アスパラガスの品種農業技術体系アスパラガス基礎編追録第11号 48 : 16-21.
- 27) Yang, H. J. and W. J. Clore : 1973. Rapid vegetative propagation of asparagus through lateral bud culture. HortScience 8 : 141-143.

## 第4章 ヤマノイモの培養苗を利用した新生産技術の開発

国内で主に栽培されているヤマノイモは植物学的にはナガイモ種 (*Dioscorea opposita* Thunb.) に属する。中国原産とされるが、わが国の伝統的な野菜として古くから栽培されている塊茎作物である。地域によりナガイモ (長形種)、イチョウイモ (扁形種)、ツクネイモ (塊形種) 等と多様に品種が分化している。

ツクネイモは奈良県、兵庫県など古くからの産地があるが、近年、水田転作作物として、各地で特産化が図られるようになってきた。ツクネイモは耕土の浅い水田土壌でも栽培しやすく、芋をすり下ろした際のとろろの粘りが強く、高級菓子の加工や料理へと幅広く利用でき、健康食品志向にも適合して高収益が期待された。しかし、収量が向上せず、その原因としてウイルス病の発生や種芋の不均一等が問題視されていた。ナガイモでは、1970年代初めから優良品種の選抜と茎頂培養によるウイルスフリー化が試みられ<sup>5,12,28)</sup>、つるに着生するむかごを原種として利用する増殖法が確立された<sup>9)</sup>。一方、ツクネイモでも斉藤ら<sup>32)</sup>や大澤ら<sup>29)</sup>によりウイルスフリー化が試みられた。しかし、ツクネイモは日本国内の栽培条件下ではむかごを着生しにくく、適当な組織培養法も無いため、ウイルスフリー種球の増殖は困難であった。そこで、組織培養による大量増殖法 (マイクロプロパゲーション) の開発が望まれていた。

これまでのヤマノイモのマイクロプロパゲーション法としては、腋芽のついた茎切片に直接的にむかごを形成する培養法<sup>5,11,33)</sup>、節部切片培養により植物体を再生または培養小芋を形成する方法<sup>13,14,15,20,26)</sup>、カルス培養法<sup>4,29,34)</sup>と体細胞不定胚形成<sup>1,2,23,31)</sup>等が知られている。

これらの技術には以下のような問題点が指摘される。節部切片培養では、容器内で絡みあう茎の切断に労力を要し人件費がかかる。カルス培養では、変異の発生が懸念され、カルスの誘導率が供試する外植体の状態により大きく異なり、不定芽形成率も低い。不定胚形成は、画期的な増殖技術と考えられるが、ツクネイモでの誘導増殖技術は未確立である。

そこで本研究では、ツクネイモの多芽体誘導による大量増殖法の開発を行った。また、多芽体の継代培養、植物体再生と培養小芋 (以下、培養むかごとする) の形成について検討した。さらに、効率的な培養むかご生産法として簡易殺菌培養法、フッソ樹脂フィルム容器を利用した炭酸ガス施用培養法を検討した。得られた培養むか

ごは、セル成型育苗箱に播種し、萌芽後圃場に定植することによる効率的な種芋生産法を検討した。

### 実験材料と方法

#### 1. 未熟葉からの多芽体誘導による培養系の開発

**供試材料:** ヤマノイモ (ツクネイモ) の在来種 '丹波ヤマトイモ黒皮種' を起源とする広島県双三郡吉舎町の在来系統 '吉舎1号' のウイルスフリー株と広島県立農業技術センターで著者らが栄養系選抜法により育成した多収系統 '広系1号'<sup>17)</sup> を材料とした。

**茎頂培養によるウイルスフリー株の育成:** '吉舎1号' から萌芽した茎の頂部を70%エタノール、有効塩素1%の次亜塩素酸ナトリウム溶液で15分間殺菌し、殺菌水で3回洗浄後、無菌条件下で茎頂を採取した。これを $1.1 \times 10^{-6}$ Mのナフタレン酢酸(NAA),  $0.91 \times 10^{-6}$ Mのゼアチンと3% (w/v) のショ糖を添加した1/5強度の Murashige and Skoog 培地<sup>23)</sup> (以後MS培地とする) に移植して培養した。草丈が2cm程度に成長した後、生長調節物質を無添加のMS培地 (ショ糖濃度3%) に移植し、さらに養成すると植物体基部に培養むかごを形成した。培養むかごは、5℃低温で3ヶ月保存後、無菌培土に移植した。これをウイルス病を媒介するアブラムシ防除を目的とした寒冷紗を張った隔離ガラス室内で栽培し、1年間養成した。この間にウイルス検定を行い、葉にモザイクや萎縮症状などのウイルス病徴がなく、透過型電子顕微鏡観察 (約10万倍) でひも状ウイルスが観察されなかった株をウイルスフリー株とした。

**多芽体誘導材料の養成:** ウイルスフリー株では隔離網室内で翌年度の夏期に太い苗条 (茎径約5mm) が萌芽し、この先端部に形成した未熟葉 (未展開葉) を多芽体誘導材料として供試した。'広系1号' では、一般のガラス室で養成した株を用いて同様な未熟葉を供試した。

**多芽体の誘導:** 未熟葉は蒸留水で洗浄後、70%エタノールで数秒、有効塩素1%の次亜塩素酸ナトリウム溶液で15分間振盪浸漬して殺菌後、殺菌水で3回洗浄した。多芽体誘導は、各種生長調節物質 (NAA, BA) を所定の濃度で添加したMS培地を用い、1容器 (100ml培養用広口フラスコ、培地量20~30ml) 当り、未熟葉2枚ずつ移植し、アルミホイルで二重栓をした。

**植物体再生と培養むかご形成:**  $8.9 \times 10^{-6}$ MのBAと

3% (w/v) ショ糖を添加したMS培地上で多芽体を形成した葉(図4-1B, Cステージ)は、3~10mm長の不定芽を3個ずつ持つ小集塊に分割した。これらは個別に、NAA, BA, ショ糖を各種濃度で添加したMS培地を入れた試験管(25×100mm, 培地量10ml)に移植した。培養約1か月後に、苗条本数、苗条長、葉数、最大葉長と発根株数を調査した。また、茎葉がほぼ枯れた培養約6か月後に茎の腋芽部や基部に形成した培養むかごの数、重量、直径や形状等を調査した。培養むかごは5℃で2~3ヶ月間保存して休眠打破を行った後、育苗培土に播種しガラス室内で萌芽させ養成した。

**培養条件:** 全ての試験において、3% (w/v) ショ糖と0.8% (w/v) の寒天(和光化学株, 1級)を添加したMS培地を基本培地とし、0.1NのKOH又は0.1NのHClを用いてオートクレーブ(120℃, 120kPa・15分)前にpH5.8に調整した。培養方法は特に断らない限り、25℃, 光量子束 $30\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ , 16時間の白色蛍光灯の照明下で行った。

## 2. 多芽体を利用した培養むかご生産の効率化と新生産システムの開発

**多芽体からの植物体再生と培養むかご形成の効率化:** 多芽体からの植物体再生と培養むかご形成について、植物体再生培地への多芽体移植時の不定芽の発達程度、移植密度、培地ショ糖濃度、培地支持体の種類、照明時間、培養温度および生長調節物質が及ぼす影響について検討した。材料は、MS培地に2.0mg/l BA, 20mg/l アンシミドール, 3% ショ糖, 0.2% グランガムを添加してpH5.8に調整した培地により半年毎に継代培養している多芽体の分割集塊(各3個の不定芽を含む)を用いた。培地は、生長調節物質(NAA, BA), ショ糖(3, 6, 9%)や培地支持体(寒天, グランガム)を所定の濃度で添加し、pH5.8に調整したMS培地を用いた。

培養容器はポリカーボネート製の培養ボトル(直径100mm×高さ100mm, 培地量50ml)またはフッ素樹脂フィルムを素材とするPCP容器(108×108×高さ130mm, パイオU株, 香川, 培地量200ml)を用い、25℃, 光量子束 $70\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ , 16時間照明で培養した。

**多芽体の保存・継代と増殖:** 多芽体は25℃の温度条件下では次々と苗条を伸長し、同じ状態のまま維持することが困難である。そこで、形成した多芽体を温度勾配型の人工気象器(TG100-CT, 日本医科株)を用いて異なる温度条件下で培養し、生長抑制による短期間の保存条件について検討した。また、生育調節物質添加についても同様に検討した。

**炭酸ガス施用による培養むかご形成と肥大の促進:** ヤマ

ノイモの多芽体の分割集塊から再生中の培養植物に炭酸ガスを施用し、植物体の生育促進や培養むかごの形成数量の増加について検討した。培養は25℃, 光量子束 $110\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ , 12時間照明で行い。炭酸ガスは約1500ppmを照明時間中に施用した。

**簡易殺菌培養法のヤマノイモへの適用:** ヤマノイモでは多芽体の継代培養や培養むかご形成において、約半年の長期間の培養を行うため、その間の雑菌発生が問題となる。そこで、第2章と同様に次亜塩素酸ナトリウム溶液を培地に添加し、培養する方法について検討した。培地作成後、全ての培地を高圧滅菌処理し、培地温度が約60℃の時点で0~100ppmの所定の濃度となるように次亜塩素酸ナトリウムを加用した。培地固化後、多芽体の分割集塊を1容器(培養フラスコ100ml)当り、5個ずつ移植した。

**セル成型育苗箱による培養むかごからの種芋養成法:**

植物体再生培地で形成した培養むかごの大きさ(むかごの直径)と重量の関係について解析した。培養むかごは一定の大きさ別に仕分けした後、殺菌剤(ペノミル水和剤)1000倍液に10分間浸漬処理した。むかご表面が乾いた後、貯蔵中に乾燥しないようにビニール袋に小分けして密封し、5℃低温下で3ヶ月間保存した。これをパーミキュライトとピートモスを主とする園芸育苗培土(窒素成分150mg/l)を入れた角形セル成型育苗箱(55穴, 5×5×高さ5cm)に播種した。ガラス室内で養成し、萌芽後の苗は一定の草丈に生育した6月に農業技術センターの圃場に定植した。畦幅140cmの畦に4条植えとし、株間と条間は各15cmとした。茎葉が繁茂した7月下旬に高さ約50cmの支柱を行い、20cmの高さに4条の網(一辺20cm)を張り、つるを誘引した。芋の肥大時期(8~9月)には、土壌表面が乾かない程度に2~3日に1度の割合で灌水チューブ(噴霧型エパーフロウMタイプ, 三井石油化学株)を用いて灌水を行った。なお、肥料は被覆リン硝安カリ(NPK各14-12-14%)を用い、窒素成分で15kg/10a施用した。茎葉枯死後の11月に芋を掘り上げ、収量調査を行った。

## 結 果

### 1. 未熟葉からの多芽体誘導による培養系の開発

未熟葉を培養して約50~60日後、 $8.9 \times 10^{-6}\text{M}$ または $1.74 \times 10^{-5}\text{M}$ のBAを単独に添加した区において茎頂分裂組織形成部位(meristematic regionと呼称した)を誘導した。 $1.1 \times 10^{-6}\text{M}$ または $1.1 \times 10^{-5}\text{M}$ のNAAと $8.9 \times 10^{-6}\text{M}$ のBAの混用区、および $8.9 \times 10^{-7}\text{M}$ ,  $3.48 \times 10^{-5}\text{M}$ のBA単独添加区では、同組織の誘導は認められな

表4-1 葉長が多芽体および苗条形成に及ぼす影響

葉長 (mm)	供試 葉数	多芽体形成 (% ± S E)				苗条 形成 (%)
		形成葉の割合	葉 1 枚当りの不定芽数			
			<10	10 - 20	>20	
5-6	58	97 ± 3	45 ± 14	46 ± 14	5 ± 3	2
7-8	43	100	31 ± 8	43 ± 3	26 ± 8	9
9-10	44	100	13 ± 8	52 ± 10	35 ± 15	16
11-12	29	100	17 ± 7	41 ± 2	43 ± 14	3
13-15	12	100	16	42	42	0
18-20	7	43	14	0	29	0
25-30	7	0	0	0	0	0

SE: 標準誤差, 多芽体と苗条形成は各70日, 85日後に調査。  
 培地: MS培地+8.9×10<sup>-6</sup>M BA, 葉長5~12mmでは約10枚の葉を4反復で供試。  
 多芽体形成: 茎頂分裂組織形成部位を含む  
 苗条形成: 長さ10mm以上の不定芽が認められた葉の割合

った。この茎頂分裂組織形成部位は表面がなめらかなこぶ状の外観であり(図4-1A), 葉の向軸側表面に形成した。この組織は時間の経過とともに増殖し, 早期に形成したものは不定芽への発達が認められた(図4-1B)。約70日後には, 茎頂分裂組織形成部位や不定芽の混在した多芽体と称すべき形状となった。1外植体当りの多芽体の形成率は, 93-95%であった。本条件では1外植体当り50以上もの茎頂分裂組織形成部位または不定芽を形成したのもみられた。

多芽体誘導に及ぼす葉長の影響では, 葉長5~15mmの未熟葉を供試した区では, 97~100%の高率で多芽体を誘導した(表4-1)。特に, 葉長11~12mmの葉を用いた区では, 43%の供試葉において20個以上の不定芽(茎頂分裂組織形成部位を含む)を形成した。しかし, 葉長18~20mmの葉では, 多芽体形成率が大きく減少し, 葉長25mm以上では多芽体の形成が認められなかった。

未熟葉の表皮から茎頂分裂組織形成部位に発達し, 不定芽を経て苗条を形成する過程には5つの段階が認められた(図4-1A~E)。第1段階では葉の表面に多数の茎頂分裂組織形成部位が形成された(図4-1A)。第2段階では, 同部位の不定芽への発達が認められた(図4-1B)。第3段階では不定芽が萌芽した(図4-1C), 第4段階では不定芽の苗条が伸長し(図4-1D), 第5段階で展葉して植物体に再生した(図4-1E)。第2段階で作成した垂直切片では, 不定芽の中心部の突起部位に茎頂分裂組織の形成が認められた(図4-1F)。

多芽体からの植物体再生および培養むかご形成に及ぼす植物生長調節物質添加の影響では, 最も旺盛な苗条の生長は, 0.11×10<sup>-6</sup>MのNAA, 0.89×10<sup>-6</sup>MのBAを添加した区で認められた(表4-2)。この条件では, 1株当たりの苗条本数, 草丈, 葉数, 最大葉長, 発根数も供

試区中で最も高かった。また, 培地シヨ糖濃度が6%の方が3%より, 苗条形成試験管数, 1株本数や発根率が高い傾向にあった。

培養むかご(図4-2A)は, 不定芽から伸長した苗条の基部または茎の腋芽部に形成・肥大した。得られた培養むかごの総重量と形成数は, NAAの添加に関わらず, 0.89×10<sup>-6</sup>MのBA添加区で高かった(表4-3)。また, 培地シヨ糖濃度が6%の方が3%より, 培養むかごの総重量と形成数が多かった。

培養220日後の培養むかごの大きさは, 最大径12mmで, 特に径4mmまたは5mmの球状のむかごが最も高い割合で得られた。また, いずれの区においてもナガイモ状の細長いむかごが10~20%の割合で得られた。これらの培養むかご(550個)は休眠打破のために約3か月の低温貯蔵を行った後, 萌芽を検討した結果, 90%以上の培養むかごから苗条の萌芽と発根が認められた。これらはいずれも正常な植物体に生長し(図4-2B), 葉の奇形などの変異やモザイク症状などのウイルス病徴も全く認められなかった。また, 培土に移植した時の培養むかごの形状に関わらず, 良好に生育し茎葉枯死後の収穫時にはいずれも球状の芋を形成した。

2. 多芽体を利用した培養むかご生産の効率化と新生産システムの開発

多芽体からの植物体再生と培養むかご形成の効率化のために, 不定芽の発達程度が培養むかごの収量に及ぼす影響について検討した。その結果, 未発達の茎頂分裂組織形成部位を植物生長調節物質無添加の培地に移植すると萌芽率が低く, 培養190日後のむかごの収量も少かった(1容器当たり1.6g, 6.5個)。しかし, 0.11×10<sup>-6</sup>MのNAA, 8.9×10<sup>-6</sup>MのBA添加培地に移植した場合は, 収

表4-2 NAA,BA とシヨ糖濃度が多芽体からの苗条形成に及ぼす影響

NAA (10 <sup>-6</sup> M)	BA (10 <sup>-6</sup> M)	シヨ糖 (%)	苗条形成					
			試験管数 (%±SE)	本数 株 (±SE)	草丈 (mm)	葉数	最大葉長 (mm)	発根 (%±SE)
0	0.89	3	87±11	2.1±0.3	19.5	3.2	7.0	41±8
0	8.9	3	59±17	1.2±0.3	8.2	1.4	1.8	0
0.11	0.89	3	100	2.7±0.3	24.5	3.8	9.3	47±8
0.11	8.9	3	58±11	1.2±0.2	7.3	1.4	1.8	0
0	8.9	3	59±17	1.2±0.3	8.2	1.4	1.8	0
0	8.9	3	73±13	1.7±0.3	11.3	1.9	2.1	30±9

SE: 標準誤差, 移植35日後調査, 1切片当り不定芽3個を含む多芽体切片を径25mm, 高さ10cmの試験管(培地量10ml)に移植し, 各10本供試(4反復)。

表4-3 NAA,BA とシヨ糖濃度が多芽体からの培養むかご形成に及ぼす影響

NAA (10 <sup>-6</sup> M)	BA (10 <sup>-6</sup> M)	シヨ糖 (%)	培養むかご形成		培養むかごの形状・大きさ別形成率					長芋型 (%)
			総重量 (mg±SE)	総数 (±SE)	球状型直径(mm)別割合(%)					
					3	4	5	6	7<	
0	0.89	3	312±39	3.4±0.5	8	24	20	19	15	14
0	8.9	3	103±21	1.8±0.5	17	35	27	7	4	10
0.11	0.89	3	301±37	3.7±0.5	10	32	25	11	10	12
0.11	8.9	3	139±18	2.2±0.3	13	28	18	16	4	21
0	8.9	3	103±21	1.8±0.5	17	35	27	7	4	10
0	8.9	6	303±38	2.9±0.4	6	22	22	19	15	21

SE: 標準誤差, 移植220日後調査, 移植方法は表4-2参照, 長芋型: 長径と短径の比が2:1以上の芋とした。

量, 個数がともに増加した(3.3g, 13個)。なお, 発達した不定芽を用いた場合には, 植物生長調節物質添加の有無による収量の差は小さかった。

多芽体の移植密度が培養むかごの収量に及ぼす影響について検討した。その結果, 187日間の培養で培養ボトル1本あたり6個の分割した多芽体集塊を移植した場合に, むかごの収量, 形成数が最も多かった(3.2g, 30.3個)。また, 移植数が多くなるほど, 培養むかごの1個当りの重量は小さくなるものの個数は増加する傾向が認められた(移植数8個の時, 34個のむかごを形成)。

培地シヨ糖濃度が多芽体からの培養むかご形成に及ぼす影響では, 190日の培養で, シヨ糖6%添加区の培養むかごの収量が3.5g, 形成数40個で, 3%区の同2.0g, 22個, 9%区の同1.9g, 22個より多かった。培養むかごの形状は, いずれのシヨ糖濃度でも約70%が球状の芋を形成し, 特に3%ではナガイモ型, 6%または9%ではひょうたん型の芋が多くなった。また, いずれの濃度でも径4~5mmのむかごが最も多かった(6%区で45%)。

次に培地支持体, 照明時間および培養温度が培養むかご形成に及ぼす影響について検討した。培地支持体(組織培養で通常用いる濃度)では, 190日の培養でゲランガム区のむかごの収量, 形成数, 1個重は各3.8g, 8.4

個, 452mgで寒天培地(各2.6g, 7.3個, 356mg)より多く形成する傾向が認められた。このため, 以後の培養では培地支持体としてゲランガムを用いた。

多芽体から植物体が再生し茎葉が繁茂した後の培養中の照明時間(培養95日後から変更)が培養むかごの形成に及ぼす影響では, その後の110日間の培養で, 16時間日長区(8時間暗)と24時間連続照明区のむかごの収量・形成数が各2.6g・7.3個, 2.5g・7.4個で他区より多かった。また, 8時間日長区では, 16時間, 24時間日長区とむかごの形成数で差が認められないものの, 収量が減少した(1.6g)。24時間暗処理区では収量, 形成数共に減少した(1.1g, 4個)。

茎葉繁茂後(培養100日後から変更)の培養温度が培養むかごの形成に及ぼす影響についてみると, その後の50日間の培養で25℃区でのむかごの収量, 形成数が最も多く(1.6g, 7.8個), 15℃以下では減少し, 10℃または4℃では0.4g, 2.2個となった。なお, 15℃区では25℃区よりもむかご表面の色が黒い傾向が認められた。

植物生長調節物質が多芽体からの苗条の伸長や培養むかごの形成に及ぼす影響についてみると, 180日間の培養でジベレリン添加区での濃度の上昇に伴う草丈の低下が認められた(10<sup>-5</sup>M区で無添加区の38%)。培養むかごの

表4-4 培養容器、支持体の種類および炭酸ガス施用が培養むかごの収量・形状に及ぼす影響

試験の種類	処理	培養むかごの収量		むかご 1個重 (mg)	球状むか ごの割合 (%)	径別個数(%)		
		重量 (g ± S E)	個数 (± S E)			3-5 mm	6-7 mm	8 mm以上
容器	CB	4.6±0.4(100)	25.3±6.0(100)	182	79.0	55	20	25
	PCP	7.9±0.5(171)	67.5±6.7(266)	117	81.5	69	22	9
支持体	ゲランガム	7.9±0.5(171)	67.5±6.7(100)	117	81.5	69	22	9
	ゲランガム+CO <sub>2</sub>	11.9±0.4(100)	72.5±7.4(107)	164	88.3	64	23	13
	ロックウール	7.6±0.8(171)	52.3±7.4( 77)	145	80.9	75	17	8
	ロックウール+CO <sub>2</sub>	9.8±0.4(124)	59.0±2.7( 77)	166	75.1	65	29	6

CB：培養ボトル，多芽体切片移植数8株/65ml，PCP：フッソ樹脂フィルム容器，移植数株/200ml，支持体の試験の容器はPCPを使用  
 培養期間：177日，各3反復，炭酸ガス施用区：3000ppm 照明時間中施用  
 培地：MS+0.11×10<sup>-6</sup>M NAA+0.89×10<sup>-6</sup>M BA+6%ショ糖+0.2% ゲランガム+0.001% 有効塩素  
 ( )内は，容器の試験ではCB区を，支持体の試験ではゲランガム区を100とした指数

形成数と重量は，供試したジベレリン添加の範囲(10<sup>-5</sup>M ~10<sup>-7</sup>M)では大きく減少し，いずれも対照の30%，20%となった。また，10<sup>-6</sup>MのウニコナゾールPの添加区でも数量ともに対照の30%に減少した。全むかご数に対する苗条の基部に形成したむかご数の割合は，ウニコナゾールP区で濃度が高まるにつれて減少し，対照が60%であったものが10<sup>-6</sup>M区では40%に減少した。一方，ジベレリンでは濃度が高まると腋芽部へむかごが着生せず，基部にのみ形成した。アンシミドールおよびジャスモン酸の添加では，草丈や培養むかごの形成数量において対照区との顕著な差が認められなかった。

培地のショ糖濃度と炭酸ガス施用が培養むかご収量に及ぼす相互作用について，培養ボトルに通気穴を設けて検討した。その結果，180日間の培養で，ショ糖濃度が0%又は1%区では炭酸ガス施用によりむかごの収量が増加したが，3%区，6%区では通気と植物体の旺盛な生育により培地が早期に乾燥し減収した。そこで，同作用についてPCPフッソ樹脂フィルム容器を用いて検討した(表4-4)。その結果，PCP容器では，1容器当りの培養むかごの収量が培養ボトルの約1.7倍，形成数も同2.6倍と多くなった。また，PCP容器では炭酸ガス施用により，6%ショ糖の添加条件下で培養むかごの収量が無施用区の約1.5倍に増加した。これは，支持体をロックウールとしてもほぼ同様であった。なお，培養むかごの直径(Xmm)と重量(Ymg)は相関が高く(r=0.9842)，むかごの直径が2~10mmの範囲で， $Y=0.0766X^3+9.0301X^2-39.238X+57.126$ の近似式で表された。

培地への殺菌剤の添加がヤマノイモ多芽体からの植物体再生に及ぼす影響では，有効塩素濃度5ppm以上の次亜塩素酸ナトリウム溶液の添加により，培地上に雑菌の

発生が認められなかったが，対照区や低濃度区では雑菌の発生が認められた。また，有効塩素濃度5または10ppm区では，培養28日後の再生苗の草丈が21mm，生体重が0.31gと最も高くなり，その後も健全に生長した。培養10日後の次亜塩素酸ナトリウム添加区の生育と雑菌発生状況を図4-3Eに，同無添加区を図4-3Fに示す。

多芽体形成後の培養温度が多芽体からの苗条の伸長や展葉に及ぼす影響では，多芽体形成後113日間の培養で，供試した4℃から24℃の範囲で，培養温度が高いほど苗化した不定芽数や展葉数が多くなる傾向が認められた(表4-5)。4℃および8℃では，多芽体は生育をほとんど停止し，一部は黄化した。しかし，これらを培養6か月後に新鮮培地に移植し，25℃で培養すると多くの多芽体は正常な苗条を伸長した。

植物生長調節物質が多芽体からの苗条伸長や芽数の増加に及ぼす影響について検討した(表4-6)。8.9×10<sup>6</sup>

表4-5 培養温度が多芽体からの苗条の伸長や展葉に及ぼす影響

温度	苗化不定芽数	展葉数	備考
24℃	76± 3	66	
20℃	45± 4	11	
16℃	23± 3	2	
12℃	16± 3	1	
8℃	3± 2	0	一部黄化
4℃	2± 2	0	一部黄化

未熟葉を25℃で110日間培養し，1葉片当たり約20の不定芽を含む多芽体を形成した培養容器をパラフィルムで密封後，異なる温度条件下で移植なしに培養を継続。温度変更後113日後に生育状況を調査。各区4反復  
 苗化不定芽数：5mm以上に伸長した不定芽数  
 展葉数：葉を展開した不定芽数

表4-6 生長調節物質の種類と濃度が多芽体からの不定芽の伸長や芽数の増加に及ぼす影響

生長調節物質の種類 ( $\times 10^{-6}M$ )		草丈	総芽数	展開	不定芽長が5mm以下
NAA	Ancymidol	(mm)		葉数	(%)
0	0	17 $\pm$ 3	16.2 $\pm$ 2.9	1.9	58
0.11	0	18 $\pm$ 3	13.2 $\pm$ 1.9	1.6	56
1.1	0	15 $\pm$ 4	11.2 $\pm$ 2.6	1.6	52
0	0	17 $\pm$ 3	16.2 $\pm$ 2.9	1.9	58
0	7.8	9 $\pm$ 2	17.2 $\pm$ 2.6	1.8	70
0	78	7 $\pm$ 1	25.1 $\pm$ 4.5	1.6	88

培地：MS培地+ $8.9 \times 10^{-6}$ BAを基本。容器：培養フラスコ(培地量20ml)、未熟葉片置床106日後に形成した多芽体を供試し、1容器当り3個の不定芽を含多芽体切片を4個ずつ移植し48日後調査、4反復、数値は16個体の平均

MのBA存在下において芽の増加数はNAA濃度が高くなるほど減少した。また、同濃度のBA存在下においてNAA無添加では、 $7.8 \times 10^{-6}$ Mまたは $7.8 \times 10^{-5}$ Mのアンシミドール添加区で、苗条伸長が抑制され、芽数が増加する傾向が認められた。特に $7.8 \times 10^{-5}$ Mのアンシミドール添加区では、不定芽長5mm以下の芽が88%を占め、草丈の伸長が大きく抑制された。この区では25℃のまま6か月間培養した後も、草丈14mm、総芽数30個とほとんど変わらなかった。多芽体径(Xmm)と多芽体生体重(Ymg)は相関が高く( $r=0.9595$ )、 $Y(mg)=5.7588X^2-45.666X+306.59$ の近似式で表された。多芽体からの植物体再生および培養むかご形成に関する一連の過程を図4-3に示した。葉片から誘導した多芽体(図4-3A)を分割し、 $8.9 \times 10^{-6}$ MのBAと $7.8 \times 10^{-5}$ Mアンシミドールを添加した培地で継代増殖した(図4-3B)。この多芽体をさらに分割し、植物体再生培地(図4-3C、D)に移植すると培養むかごを形成した。

培養むかごを種芋生産へ利用するために、培養むかごの休眠性について調査した。その結果、培養むかごには、休眠が認められ、培養容器から採取直後のむかごからの発芽率は5%と低かった。そこで、培養むかごを乾燥しないようにビニール袋に入れて密封し、5℃の低温保存を3ヶ月間行くと保存後の発芽率が80%となった。そのため、培養むかごは全て5℃で3か月の低温保存後に種芋養成試験に供試した。なお、5℃で保存中にも雑菌が発生する場合があります、培養むかごをペノミル水和剤の1000倍液に10分間浸漬し、芋の表皮部分をよく乾燥させた後に保存すると雑菌発生は殆ど認められなくなり、発芽への影響もなかった。

培養むかごのセル成型育苗箱での発芽は、大きいむかごで早く、発芽率(52日後)も高い傾向が認められた。培養むかごの大きさ別、つる長別に露地圃場に定植・養成し、茎葉枯死後に芋の収量を調査した結果、平均26~40gの芋を形成し、ほとんどの芋は丸い形状であった。な

お、1株当たり複数の芋を形成しているものが28~63%の株で認められた。培養むかごを利用した一連の新種苗生産システムについては図4-4に示した。

## 考 察

### 1. 多芽体培養系の開発

本研究では、不定芽と茎頂分裂組織の形成部位の集塊である多芽体をヤマノイモの一種であるツクネイモの未熟葉から誘導した。この多芽体を植物体再生培地に移植することにより、旺盛な苗条伸長と植物体再生が認められ、苗条の基部や腋芽部に培養むかごを多数形成した。

これまで、多芽体による増殖は多くの作物で報告されている。このうち、外植体組織からカルスを經由せず、不定芽を分化するためには一般にサイトカイニンとオーキシンを組み合わせることで培地へ添加することが有効である<sup>27</sup>。Ma and Shii<sup>28)</sup>は、バナナの多芽体形成には特にサイトカイニンの影響が高いとし、Banerjeeら<sup>9)</sup>は、この現象から多芽体分化について組織学的に観察している。同報によるバナナの多芽体の形状は、本研究のツクネイモのそれと外観的に酷似している。一方、ニンニク、ネギ、ラッキョウ等の野菜類やツクネイモでもカルス経由の不定芽分化が報告され<sup>29)</sup>、いずれの作物も、サイトカイニンが分化を支配する重要な要素であるとしている。本研究におけるツクネイモの未熟葉(葉長15mm以下)からの多芽体形成では、 $8.9 \times 10^{-6}$ MのBAを添加すると多芽体の誘導率が高いことが明らかになった。したがって、サイトカイニンの濃度に加えて、葉長が不定芽分化に大きく関与すると推測された。ツクネイモでは、 $10^{-5}$ MのBAを添加した培地で幼茎から直接の不定芽分化に成功し<sup>29)</sup>、また、Arakiら<sup>4)</sup>が、ナガイモの茎頂から誘導したカルスを同濃度のBA添加培地に移植することにより再分化が進むことを報告している。これらのことから、サイトカイニンはツクネイモを含むヤマノイモ類の不定芽分化や

多芽体形成に重要な要素であると推測される。

多芽体誘導後の植物体再生では、多芽体を誘導した初代培地に置床したままでは、培養期間2~3ヶ月のうちにわずかな苗条が伸長し始めるに留まった。そこで、多芽体を分割し、低濃度のNAA, BAを添加した新しい培地に移植したところ、苗条の伸長や発根が促進された。多芽体からの植物体再生は一般に新しい培地への移植によって行われており、Banerjeeら<sup>6)</sup>もバナナの多芽体からの植物体再生や継代培養を約2ヶ月毎に行い安定した培養系を維持していることから、ツクネイモ多芽体からの植物体再生の効率化にも継代培養が不可欠であると考えられる。

多芽体からの植物体再生と培養むかごの形成は、ショ糖濃度の影響を受け、6%のショ糖濃度下で、苗条伸長と培養むかごの生長が促進された。これまで、ヤマノイモ類の培養におけるショ糖による生育促進効果は、*D. alata* と *D. bulbifera* では認められていない<sup>29)</sup>。しかし、腋芽部にむかごを形成させるナガイモ (*D. opposita*) の腋芽培養において、ショ糖濃度はむかご形成率に影響を与えなかったが、その濃度の上昇に伴ってむかごが生長することを観察されており<sup>29)</sup>、本法の結果と一致した。ショ糖濃度と植物体再生・培養むかご形成の関係は、品種間差があるものと推測され、今後の課題である。

本研究で開発したツクネイモの多芽体形成による一連の大量増殖法は、幼茎からの不定芽分化<sup>29)</sup>やカルス誘導<sup>4)</sup>に比べて、不定芽の集塊である多芽体を直接誘導することができるため増殖効率が高い。一方、増殖の効率性では、体細胞不定胚形成による方法が優れている。不定胚形成は、*D. rotundata*<sup>31)</sup>、*D. floribunda*<sup>1)</sup>やナガイモ (*D. opposita*)<sup>29)</sup>で報告されているが、体細胞胚からの植物体の再生数が数個体と低い。近年、Twyford and Mantell<sup>30)</sup>が *D. alata* を用い、培養根から誘導した不定胚の発芽率を密度効果とGA<sub>3</sub>の添加により30%まで高めたとしている。しかし、多芽体による増殖法では、ほぼ100%の速やかな植物体再生が認められる。すなわち、実用性では、多芽体の方が体細胞胚による方法より優れていると考えられる。

ツクネイモの組織培養による変異株の発生については、カルス経由により再生したカリクロン植物でも変異株の発生が認められていない<sup>29,30)</sup>。本実験では多芽体再生植物に着生したむかごの一部に形状の異常が認められたが、その後の栽培で全て球状の芋を形成したことから遺伝的な変異ではなく培養中の環境条件によるものと推定された。このことから、カルスを経由しない多芽体による植物体再生は、変異発生も少ない安全な培養法であると考えられる。

以上のことから、未熟葉から誘導した多芽体を利用してウイルスフリー株の培養むかごを大量に増殖でき、変異株の発生も認められないことから、今後、ヤマノイモの未熟葉を利用した多芽体形成法は優良株のマイクロプロパゲーションに有効であると考えられる。

## 2. 多芽体を利用した培養むかごの効率化と新生産システムの開発

前項ではヤマノイモの未熟葉から多芽体を誘導し、多芽体から再生した植物に着生する培養むかごを用いた増殖法を開発した。しかし、実際の苗生産に応用するためには、1) 培養むかごの簡易で効率的な増殖方法の開発、2) 多芽体の継代培養や保存条件の解明、3) 培養むかごからの効率的な種芋生産法の検討を行う必要がある。

まず、培養むかごの増殖法について検討した。集塊状の多芽体には、発達段階の異なる不定芽が存在し、多芽体の再生率は植物体再生培地により低い場合が観察された。そこで発達段階の遅れた不定芽についても植物体が効率的に再生する方法について検討した。その結果、NAAとBAを植物体再生培地に添加することにより苗化が安定し、培養むかごの収量も増大した。多芽体切片の容器当り移植数をみると、移植数と培養むかごの収量が密接に関連した。すなわち、多芽体切片の移植密度が培養むかごの大きさや数を決定する要因となり、これらを多芽体の移植数で制御できることが示唆された。なお、培地ショ糖の最適濃度は6%で、培地支持体はイチヨウイモ<sup>28)</sup>と同様にゲランガムの方が寒天より優れていた。したがって、以降の培養むかご形成に関する実験では、6%のショ糖、0.2%のゲランガムを添加した培地を基本として用いた。

ツクネイモにおける茎葉繁茂後の照明時間と培養むかごの収量の関係についてみると、16および24時間日長では培養むかごの個数や収量に大きな差異が無く、8時間日長では収量が減少したが形成個数は変わらず、暗黒下でもむかごの形成が認められた。ヤマノイモの培養による日長処理では、*D. abyssinica*、*D. alata* の2種では日長時間が長くなるほど個数が多く、重量は8時間日長と短い方が多い<sup>13)</sup>。また、Mantell and Hugo<sup>10)</sup>は、*D. alata*、*D. bulbifera* では、8時間日長が16時間日長よりむかごを形成した植物体が多くなるとしている。以上のように異なる研究結果が得られており、むかごの着生の差異は品種間差によるものが大きいと考えられる。これらの結果を総合し、ツクネイモの培養むかご形成では、16時間日長が最適と判断した。

茎葉繁茂後の培養温度がむかごの形成、肥大に及ぼす

影響をみると、培養温度が25℃を最大値として高いほどむかごの形成数が多く、肥大する傾向にあった。ヤマノイモの培養むかごの形成では25℃を基本としている場合が多く<sup>19, 22, 39)</sup>、一般栽培でも芋の肥大やむかごの形成は8～9月の高温期に認められることから、以後の培養も25℃を基本とすることが望ましいと考えられた。

培養むかごの形成や生長が植物生長調節物質によって大きく促進されることはなかった。しかし、その添加により苗条基部や腋芽部に着生するむかごの形成割合が変動する興味ある現象が認められた。イモ類では、これまでジャガイモを用いて植物生長調節物質が塊茎形成に及ぼす影響が検討されている。その結果、ジベレリン(GA<sub>3</sub>)が塊茎形成を抑制し<sup>7)</sup>、ジャスモン酸およびそれと化学構造の類似したツベロン酸は塊茎形成を促進することが報告されている<sup>15)</sup>。また、ヤマノイモ属のナガイモでは、むかごの形成物質として葉からジャスモン酸が単離されている<sup>16)</sup>。しかし、ジャスモン酸が培養むかご形成に関与したとする報告は見あたらない。また、吉田ら<sup>41)</sup>は、イチョウイモをハウス栽培し、各種生長調節物質を葉面散布して腋芽部に形成するむかごと新芋重の変化について検討している。この中でジャスモン酸は、早期の新芋肥大とむかご形成を促進するが収穫時の芋の収量は特に無処理区と変わらなかったとしている。このような現象は本実験では観察されなかった。一方、ジベレリンはむかごの形成を抑制し、新芋の肥大を促進した<sup>41)</sup>。この結果は本実験のジベレリン添加で腋芽部のむかごの形成数が減少した結果と一致したが、植物体の生育や苗条基部におけるむかご(新芋にあたる)形成も抑制した点で異なった。また、吉田ら<sup>41)</sup>は、ジベレリン阻害剤であるユニコナゾールPの添加によりむかごの形成数が増加したとしている。しかし、本実験では腋芽部のむかご数は低濃度のユニコナゾールでは変化せず、高濃度では大きく減少した。また、阻害経路が異なるジベレリン阻害剤のアンシミドールの添加によって腋芽部のむかご数が増加する傾向を示した。これらの結果より、ジベレリンがツクネイモの生育およびむかご形成を抑制することは明らかである。ヤマノイモ属の植物は他の植物種と異なり、唯一のジベレリン誘導休眠を示すことが知られており<sup>39)</sup>、苗条伸長やむかご形成も抑制されることは興味ある現象と考えられる。本研究では、植物生長調節物質がむかご形成に与える影響について *in vitro* 実験と圃場実験<sup>41)</sup>が必ずしも一致しなかった。この要因は、圃場実験では、気象、土壌や病害虫など多様な環境要因が複雑に関連しながら関与するためと推測される。むかご形成については、生理的に未解明な点が多く、今後、このような現象について本実験のような組織培養的手法を用いて

詳細に解析すれば、実際栽培にも応用できるものと考えられる。

炭酸ガス施用が培養むかご形成に及ぼす影響では、一般のポリカーボネート製の培養ボトル容器に通気穴を設けて培養すると、培地が早期に乾燥し、炭酸ガス施用によるむかごの増収効果が殆ど認められなかった。ヤマノイモの培養における炭酸ガス施用効果は、これまでジネンジョ (*D.japonica*) で認められている<sup>39)</sup>。すなわち、置換型脱酸素剤を入れたポリエチレン・ナイロン・ポリ塩化ビニリデンの三層フィルム内に培養容器を入れ密封し、内部が乾燥しないことにより炭酸ガス施用効果を得ている。そこで、通気性はあるが水分は保持する新素材のフッ素樹脂フィルムを用いたPCP容器<sup>39)</sup>の利用を検討した。その結果、PCPでは1容器当たりの培養むかごの収量が培養ボトルの約1.7倍多く得られるなど効率が良く、炭酸ガス施用によるむかごの増収効果が本研究でも明らかとなった。PCP容器では支持体としてロックウールが利用でき、液体培地との組合せでゲランガムのみと同程度の培養むかご収量が得られたことから、培地作成が容易な液体培地利用による培養むかご生産法の構築も可能であると考えられた。このPCP容器は、これまで乾燥や高浸透圧に弱いユーカリなどの培養植物の炭酸ガス施用による生育促進に効果が認められている<sup>24)</sup>。ヤマノイモは芋の肥大時に水分を多く必要とし、乾燥に弱い作物であるため<sup>40)</sup>、このPCP容器はヤマノイモの培養むかご収量を増加するための炭酸ガス施用に好適な素材であると考えられた。

ヤマノイモにおける次亜塩素酸ナトリウムを用いた殺菌剤加用培養法の検討では、アスパラガス(第2章)と同様に同剤を有効塩素濃度5ppmで添加すると、培地上の雑菌発生を抑制した。ヤマノイモの多芽体では、これまで培地を高圧滅菌処理後に移植しても半年に及ぶ長期間の培養のために雑菌が5割以上の容器で発生していたが、本培養法の確立により、各種培養条件の検討や増殖が容易となり培養環境は大きく改善できた。本法は極めて簡易な培養法であり、今後多くの作物に適用されるものと考えられる。

ヤマノイモ多芽体の効率的な継代維持を目的とした、培養温度が苗条の伸長や芽の増殖等に及ぼす影響では、4℃または8℃の低温培養により多芽体の植物体再生能を約半年間維持できた。また、生長調節物質の添加について同様に検討したところ、 $8.9 \times 10^{-6}$ MのBAと $7.8 \times 10^{-6}$ Mのアンシミドールを添加した培地で培養することにより、多芽体からの苗化を抑制することにより約半年間保存することができ、総芽数が増加する長所も認められた。本法では、多芽体形成中にカルスが生じること

なく、多芽体からの苗化にも異常が認められなかった。ヤマノイモの多芽体では、信森と内藤<sup>27)</sup>がアンシミドールを用いた効率的な液体培養法について報告しているが、保存については見あたらない。そこで、本法は効率的な多芽体の継代、保存法として今後活用できると考えられる。

組織培養により得られた培養むかごの種芋生産への利用を検討した。培養むかごには一般の生産芋と同様な休眠が認められ、収穫直後の培養むかごは育苗培土に播種してもほとんど発芽しない。種芋の休眠打破には2~3か月の低温処理が必要である<sup>10)</sup>。そこで、培養むかごを3か月間、5℃で低温処理した結果、むかごの発芽率は約80%に向上し、種苗として培養むかごを利用するためには低温保存処理が不可欠と考えられた。低温処理後の培養むかごはセル成型育苗箱に移植し、約1か月後に発芽した。これを6月に露地圃場に定植し、養成することにより、茎葉の枯れた11月には平均30g、重量で約600倍の芋に生長した。ツクネイモの一般栽培では、300~400g大の芋を種芋とし、これを1個約50g、6から8個に分割し、数日間風乾後に圃場に定植している。本実験では培養むかごからセル成型苗を養成し、露地に定植した当年だけで一般栽培の種芋に近い大きさに生長させることができた。また、むかごから養成した種芋では、一般の分割切芋の表皮部に形成する不定芽利用でなく、定芽を利用した栽培であるため、萌芽を2週間程度早める結果(甲村 未発表)も得られていることから実用栽培への利用性が高いと期待される。むかごを利用した種芋生産は自然条件で大きなむかごを形成するナガイモでは既に一般化し、ウイルスフリー株の普及に役立っている<sup>40)</sup>。また、ジャガイモでも、切り芋による増殖が一般的だが、小粒(30~40g)の種芋を利用する全粒種芋栽培<sup>28)</sup>では、定植後の芋の腐敗が少なく、切断労力も不要で、萌芽も早いとしている。今後は、ナガイモと同様に栽培1年目でむかごから種芋を養成し、2年目で成芋として出荷する体系を確立し、ツクネイモのむかごから養成した種芋を利用した新生産システムを確立したいと考える。

## 引用文献

1) Ammirato, P. V.:1984. Induction, maintenance and manipulation of development in embryogenic cell suspension cultures. In: Cell culture and somatic cell genetics of plants. Vol.1 (I.K. Vasil eds.) Academic press, New York: 139-151.  
 2) ——:1992. Yams, In: D. A. Evans, W. R. Sharp, P. V. Ammirato, Y. Yamada (Eds) Handbook of Plant

Cell Culture, Macmillan, New York. Vol. 3: 337-354.  
 3) 荒木肇・石嶺・八鍬利郎:1988. ナガイモ茎頂培養でカルスを経由しない個体再生. 園学雑57(1): 224-225.  
 4) Araki, H., L. Shi and T. Yakuwa:1992. Effect of auxin, cytokinin and nitrogen concentration on morphogenesis of tissue-cultured shoot apex of Chinese yam (*Dioscorea opposita* Thunb.) J. Jap. Soc. Hort. Sci. 60: 851-857.  
 5) Asahira, T. and S. Yazawa:1978. Bulbil formation of *Dioscorea opposita* cultured *in vitro*. Memoirs Coll. Agr. Kyoto. Univ. 113: 39-51.  
 6) Banerjee, N., D. Vuylsteke and E. A. L. Delanghe: 1986. Meristem tip culture of *Musa* Histomorphological studies of shoot bud proliferation. In: L. A. Withers, P. G. Alderson (Eds) Plant tissue culture and its agricultural applications. Butterworths, London.: 139-146.  
 7) Ewing, E. E.:1987. The role of hormones in Potato (*Solanum tuberosum* L.) In: Plant hormones and their role in plant growth and development. P. J. Davies eds. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.: 515-538.  
 8) 船越建明・松浦謙吉・村上清則:1987. 全粒種いも利用による秋バレイショの安定生産 第1報 種いものホルモン処理と大きさが生産力に及ぼす影響 広島農試報50: 105-116.  
 9) 平井輝悦:1987. ナガイモウイルスフリー苗の特性とその利用. 今月の農業31(5): 50-56.  
 10) 池内康雄:1986. つくねいも栽培 農業技術体系ヤマノイモ基礎編 佐藤一郎編著:115-142.  
 11) 稲垣昇・小松原佐和子・岡雄二・前川進・寺分元一:1985. ヤマトイモ(*Dioscorea opposita* Thunb. cv. Yamatoimo)の栄養繁殖におけるむかご利用 園学雑54(1): 66-74.  
 12) 石川悦郎・沢恩:1976. ナガイモの茎頂培養について 日本作物学会東北支部報19: 125-126.  
 13) Jean, M. and M. Cappadocia: 1991. *In vitro* tuberization in *Dioscorea alata* L. 'Brazo fuerte' and 'Florido' and *D. abyssinica* Hoch. Plant Cell Tissue Organ Culture 26: 147-152.  
 14) ——and——:1992. Effects of some growth regulators on *in vitro* tuberization in *Dioscorea alata* L. 'Brazo fuerte' and *D. abyssinica* Hoch. Plant Cell Rep. 11: 34-38.  
 15) Koda, Y., Y. Kikuta, H. Tazaki, Y. Tsujino, S.

- Sakamura and T. Yoshihara : 1991a. Potato tuber-inducing activities of jasmonic acid and related compounds. *Phytochemistry* **30**(5) : 1435-1438.
- 16) ——— and ——— : 1991b. Possible involvement of jasmonic acid in tuberization of yam plants. *Plant Cell Physiol.* **32** : 629-633.
- 17) 甲村浩之・井本征史・平尾晃 : 1998. ヤマノイモ多収系統 '広系1号' の育成 広島農技セ研報**66** : 25-31.
- 18) Lauzer, D., G. Laublin, G. Vincent and M. Cappadocia : 1992. *In vitro* propagation and cytology of wild yams, *Dioscorea abyssinica* Hoch. and *D. mangenotiana* Miede. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **28** : 215-223.
- 19) Mantell, S. H. and S. A. Hugo : 1989. Effects of photoperiod, mineral medium strength, inorganic ammonium, sucrose and cytokinin on root, shoot and microtuber development in shoot cultures of *Dioscorea alata* L. and *D. bulbifera* L. yams. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **16** : 23-37.
- 20) ——— and A. P. Whitehall : 1978. Clonal multiplication of *Dioscorea alata* L. and *D. rotundata* P. or yam by tissue culture. *J. Hort. Sci.* **53** : 95-98.
- 21) Ma, S. and C. Shii : 1972. *In vitro* formation of adventitious buds in banana shoot apex following decapitation. *J. Hort. Sci. China* **18** : 135-142.
- 22) 松原幸子・大森誉一・小正富知美・高田祐子 : 1992. イチヨウイモの多芽体培養による増殖岡山大学農学報**79** : 37-44.
- 23) Murashige, T. and F. Skoog : 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **15** : 473-497.
- 24) Nagae, S., T. Takamura, M., T. Tanabe, A. Murakami, K. Murakami and M. Tanaka : 1996. *In vitro* shoot development of *Eucalyptus citriodora* on rockwool in the film culture vessel under CO<sub>2</sub> enrichment. *J. For. Res.* **1** : 227-230.
- 25) Nagasawa, A. and J. J. Finer : 1989. Plant regeneration from embryogenic suspension culture of Chinese yam (*Dioscorea opposita* Thunb.) *Plant Sci.* **60** : 263-271.
- 26) Ng, S. Y. C. : 1988. *In vitro* tuberization in white yam (*Dioscorea rotundata* Poir.). *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **14** : 121-128.
- 27) 信森達也・内藤恭典 : 1989. 組織培養によるツクネイモの大量増殖 園学雑**56**(2) : 260-261.
- 28) 奥山功・八鍬利郎・原田隆 : 1973. 園芸植物のウイルスフリー株育成に関する研究 第5報 ナガイモにおける茎頂培養ならびに種子の形成について 北海道園芸談話会報**6** : 30-31.
- 29) 大澤勝次・栗山尚志・菅原祐幸 : 1981. 組織培養による栄養繁殖性野菜の大量増殖と利用に関する研究 野菜試報**A 9** : 23-30.
- 30) ——— : 1985. 園芸植物の器官と組織の培養 野菜の組織・細胞培養の展望 加古舜治編著 誠文堂新光社 : 318-351.
- 31) Osifo, E. O. : 1988. Somatic embryogenesis in *Dioscorea*. *J. Plant Physiol.* **133** : 378-380.
- 32) 齊藤幹夫・八鍬利郎・原田隆 : 1975. 園芸植物のウイルスフリー株育成に関する研究 第11報 イチヨウイモとヤマトイモの茎頂培養 北海道園芸談話会報**8** : 38-39.
- 33) 沢田英吉・八鍬利郎・今河茂 : 1958. 長芋のムカゴ形成に関する研究 第2報 器官培養によるムカゴの形成について. 園学雑**27**(4) : 241-244.
- 34) Sengupta, J., G. C. Mitra and A. K. Sharma : 1984. Organogenesis and tuberization in culture of *Dioscorea floribunda*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **3** : 325-331.
- 35) 田中道男・長江嗣朗・高村武二郎・草薙直子・氏家正徳・五井正憲 : 1996. 数種園芸植物の種苗生産におけるフィルム培養システムの有効性と実用性. 植物工場学会**8**(4) : 280-285.
- 36) 丹野憲昭 : 1994. ジベレリンが誘導する休眠 ヤマノイモ属における内生ジベレリンの関与. 植物の化学調節**29**(1) : 39-54.
- 37) Tisserat, B : 1985. Embryogenesis, Organogenesis and plant regeneration. *Plant cell culture, a practical approach.* R. A. Dixon ed. IRL press. Oxford-Washington D. C. : 79-105.
- 38) Twyford, C. T. and S. H. Mantell : 1996. Production of somatic embryos and plantlets from root cells of the greater yam. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **46** : 17-26.
- 39) 矢部和則・景山幸二・宮蔦成寿 : 1991. イチゴとジネンジョの試験管内植物体の生育に及ぼす炭酸ガス施用及び酸素の除去効果 愛知農総試研報**23** : 199-205.
- 40) 柳田雅芳 : 1988. ナガイモの増殖技術 農業及び園芸**63**(1) : 155-158.
- 41) 吉田康徳・高橋春寶・金浜耕基 : 1998. イチヨウイモの花穂と新芋の発育に及ぼす種芋重と植物生長調整物質の影響 園学雑**67**(2) : 353.

## 第5章 ワケギウイルスフリー株茎頂の超低温保存と効率的苗生産

ワケギ (*Allium wakegi* Araki) は、古くは「分葱」と表され、種子繁殖のネギと異なり、りん片繁殖により栄養的に増殖される作物である。優良種球 (りん茎) は栽培により維持され、通常、休眠期である夏期に行われている吊り玉貯蔵では乾燥による衰弱が激しく、1年以上の保存が実質上なされていないのが現状である。

近年、ウイルス病汚染による収量・品質の低下が顕在化した。そこで、池田と井本<sup>4)</sup>は、茎頂培養によるウイルスフリー化を行い、60%の増収に成功するとともに、鮮度保持効果も高いことを明らかにした。このため、ワケギでは現在約70%がウイルスフリー苗を利用して栽培されている。ウイルスフリー株の原種・原々種は隔離網室で栽培し、ウイルスを媒介するアブラムシの防除を行いながら維持されている。このようにワケギのウイルスフリー株等の優良遺伝資源をウイルスの再汚染や環境ストレスを避けて安全に保存するには、多大な時間、労力と圃場スペースが必要となる。そのため、簡易な長期保存技術の確立が不可欠となっていた。著者は、アスパラガス多芽集塊のガラス化法による超低温保存法を確立している (第1章)。ガラス化法は、予備凍結を行わず、細胞や組織をガラス化保存用媒液に一定時間浸漬後、直接液体窒素に投入し、ガラス状態として保存することを基本としている<sup>2,5,15,21)</sup>。そのため、高価なプログラムフリーザーを必要とせず、使用方法も簡単で確かな方法である。

これまでアリウム属植物に対する超低温保存の試みは庭田<sup>13)</sup>のニンニクの報告を除き見あたらない。そこで、本研究ではワケギ茎頂組織を液体窒素や超低温冷凍庫等に

簡単に確実に保存する手法の確立を目的とした。また、保存した茎頂から速やかに植物体や多芽体を形成し、増殖して苗生産する手法の確立も併せて行った。

### 実験材料と方法

**植物材料:** ワケギ (*Allium wakegi* Araki) の主要栽培系統である '木原晩生1号' を材料とし、茎頂組織を池田と井本<sup>4)</sup>の方法に従って採取し、超低温保存技術の確立のために供試した (図5-1)。また、確立した保存法については他の6系統にも適用した。

種球は5月に農業技術センター圃場から掘り上げ、網袋に入れた後、日の当たらない室内で3~6ヶ月間吊り玉貯蔵した。種球は外側の褐色の鱗片葉を除いた後、水平に分割し、下半分の表面を70%エタノールに数秒、4%の次亜塩素酸ナトリウム溶液に15分間振盪浸漬して殺菌し、滅菌水で数回洗浄した。無菌条件下で茎頂組織 (1mm長) を採取し、 $0.11 \times 10^{-6} M$  NAAと2%シヨ糖を添加したMurashige and Skoog<sup>9)</sup>の固形培地に移植し、18℃、光量子束 $30 \mu mol m^{-2} s^{-1}$ ・16時間照明の人工気象器 (LH200RD, 日本医科機器株) 内で培養した。

**低温処理:** 茎頂は18℃、光量子束 $30 \mu mol m^{-2} s^{-1}$ ・16時間照明で5日間培養し、その後4℃で7日間、同じ照明条件下の人工気象器で低温処理した。低温処理した茎頂は、0.4Mシヨ糖を添加したMS液体培地に移し、4℃・1日間前培養した。

**ガラス化法による保存:** 低温処理および前培養を行った茎頂は凍結チューブ (2ml) に5個ずつ入れ、1.8mlのPVS2液を加えた。PVS2液の組成は、30% (w/v) グリセロール、15% (w/v) エチレングリコール、15% (w/v) DMSOと0.4Mシヨ糖をMS培地 (pH5.8) に加えたものである<sup>15,16)</sup>。茎頂を入れた凍結チューブは、PVS2液に一定時間浸漬し、処理時間中にパスツールピペットを用いて新しい同液1mlに1回交換した。その後、液体窒素に投入し、-196℃の超低温下に最低1時間保存した。冷却速度は、-30℃~-150℃に下がる際にかかる時間から計算し、180℃/分である。幾らかの凍結チューブは、直接-152℃の超低温冷凍庫 (MDF-1155AT, サンヨー株) に保存した。超低温保存した凍結チューブは40℃のウォーターバスで急速に再加温した。加温速度は、-80℃から-40℃に昇温する時間から計算し、約160℃/分であった。

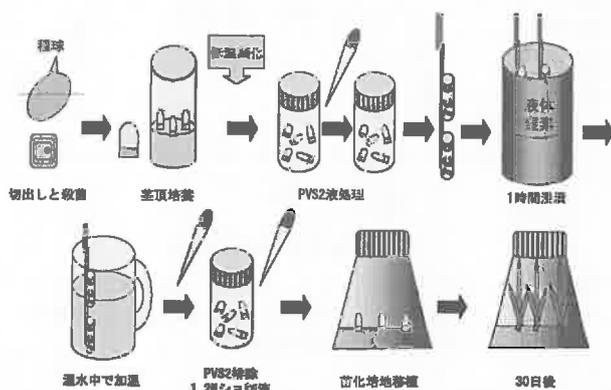


図5-1 ワケギウイルスフリー株茎頂のガラス化法による超低温保存

PVS2液:MS培地+30%グリセリン+15%エチレングリコール+15%DMSO+0.4%シヨ糖

緩速予備凍結法および簡易凍結法による保存： $-196^{\circ}\text{C}$ の超低温下に保存したワケギ茎頂からの苗条形成について、異なる凍結方法を用いて比較した。通常の緩速予備凍結法では、茎頂は16%または10% DMSOに $25^{\circ}\text{C}$ で60分間処理した後、 $0.5^{\circ}\text{C}/\text{分}$ の速度で $-40^{\circ}\text{C}$ にまで冷却し、その後液体窒素に投入した。簡易凍結法では、茎頂は2 Mあるいは3 Mのグリセロールに $25^{\circ}\text{C}$ ・30分間処理した後、直接 $-30^{\circ}\text{C}$ の冷凍庫に60分間置き、それから液体窒素に浸漬した<sup>11,17)</sup>。

保存茎頂の生長回復：凍結チューブの急速加温後、PVS 2液を同チューブから早急に排出し、1.2Mのショ糖を含むMS培地を1 ml加えた。 $25^{\circ}\text{C}$ ・10分間の処理後、茎頂は $0.11 \times 10^{-6}\text{M}$  NAA,  $0.89 \times 10^{-6}\text{M}$  BAと3%ショ糖を含むMS固形培地(苗条形成培地)上に移植し、白色蛍光灯( $30 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ )下で、 $25^{\circ}\text{C}$ 、16時間照明/8時間暗条件で培養した。茎頂からの苗条形成率は、処理した茎頂のうち、移植30日後に苗条を10mm以上伸長しているものから算出した。反復は各条件で4~6回とした。苗条形成した茎頂は、植物生長調節物質無添加のMS培地に移植し、植物体に再生した。また、保存した茎頂から多芽体を直接形成する場合には、 $0.55 \times 10^{-7}\text{M}$  NAA,  $2.23 \times 10^{-6}\text{M}$  BAと $0.39 \times 10^{-6}\text{M}$  アンシミドールを添加したMS培地に移植した。

生存細胞・組織の観察：超低温保存した茎頂を苗条形成

表5-1 ワケギ茎頂から生育した苗条の長さがガラス化法により $-196^{\circ}\text{C}$ に超低温保存した後の苗条形成率に及ぼす影響

生長した苗条の長さ(mm)	供試茎頂数	苗条形成率(%±S.E.)
1	22	37±6
2	20	50±5
3-5	44	5±3
7-10	25	0

茎頂採取後の癒傷処理のための培養：MS固形培地、 $18^{\circ}\text{C}$ ・5日間  
供試系統：木原晩生1号

表5-2 低温処理および前培養がガラス化法により $-196^{\circ}\text{C}$ の超低温下に保存したワケギ茎頂からの苗条形成に及ぼす影響

低温順化	前培養	苗条形成率(%±S.E.)
-*	-	10±5
-	+	15±6
+	-	87±5
+	+	90±5

\*低温処理無しの対照： $18^{\circ}\text{C}$ ・5日処理の茎頂  
低温処理： $4^{\circ}\text{C}$ ・7日間、前培養： $4^{\circ}\text{C}$ ・1日、MS培地+0.4Mショ糖  
PVS2液浸漬処理： $25^{\circ}\text{C}$ ・45分、  
苗条形成率：培養30日後に正常な苗条を形成した茎頂の割合

培地に移植し、培養3日目にマイクロスライサー(DTK-2000, 堂阪イーエム(株))を用いて垂直切片を作成した。これを0.5%FDAと1%フェノサフラニンで二重染色<sup>22)</sup>し、蛍光顕微鏡で観察した。

## 結 果

予備実験において、ガラス化法により $-196^{\circ}\text{C}$ で超低温保存した茎頂は、種球掘り上げ後の貯蔵期間が長くなるに従って苗条形成率が低下する傾向にあった。そこで、3~6ヶ月保存し、休眠打破を終えた種球のみを本実験に供試した。これらの茎頂は、超低温保存前に5日間、 $18^{\circ}\text{C}$ で培養し、生長した茎頂を幼葉長によって4グループに分類し、生育ステージが保存後の苗条形成に及ぼす影響について検討した。その結果、幼葉長2mmの茎頂で苗条形成率が最も高かった(表5-1)。そのため、以下の試験では全て2mmに生長した茎頂のみを材料として用いた。

次に茎頂を $4^{\circ}\text{C}$ で7日間低温処理および0.4Mショ糖を含むMS培地で1日前培養することが超低温保存後の茎頂からの苗条形成に及ぼす影響について検討した。その結果、低温処理区は、保存後の茎頂の苗条形成率が顕著に高かった。前培養区は対照区の苗条形成率との有意な差が認められなかった(表5-2)。

茎頂の $25^{\circ}\text{C}$ 常温でのPVS 2液への最適な浸漬時間を決定するために、低温処理および前培養した茎頂を、

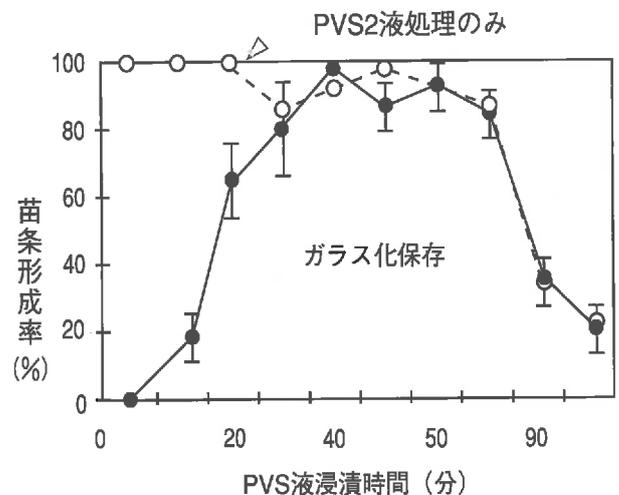


図5-2 ガラス化法により $-152^{\circ}\text{C}$ に保存したワケギ茎頂からの苗条形成に及ぼす $25^{\circ}\text{C}$ での茎頂のPVS 2液浸漬時間の影響

低温処理( $4^{\circ}\text{C}$ ・7日間)と前培養(MS+0.4Mショ糖液体培地、 $4^{\circ}\text{C}$ ・1日)を行った茎頂を供試。  
(—●—)  $-152^{\circ}\text{C}$ 超低温冷凍庫に保存  
(-○-) PVS 2液処理のみ(Treated control)  
バー：標準誤差

-152℃の超低温冷凍庫保存前に、PVS2液浸漬時間を変えて処理した。その結果、最も高い苗条形成率は、PVS2液に30~60分浸漬した場合に得られ、85~100%であった(図5-2)。超低温保存しない区(treated controls)の茎頂は、PVS2液への浸漬時間が60分までは高い苗条形成率を示したが、それ以上に長い浸漬時間では超低温保存した場合と同様に急激に苗条形成率が低下した。

茎頂のガラス化保存および加温が適切で正常に生育した場合、茎頂は培養2日目には緑色を呈し、1週間以内にカルスを形成することなく苗条を形成した(図5-3A)。これらの90%以上の苗条は、ホルモン無添加の1/2強度のMS寒天培地に移植することにより発根し(図5-3B)、植物体に再生した。

超低温保存後の培養3日目の茎頂を蛍光顕微鏡により観察した結果、茎頂ドームの細胞はほとんど生存し、茎頂組織の基部および葉原基の細胞が枯死した(図5-3C)。

以上の方法により再生した植物は、無菌の園芸培土を入れたセル成型育苗箱(図5-3D)で順化養成後、黒ポリ鉢に移植した。同植物体は、保存処理をしていない個体と比較して形態的な異常は観察されなかった(図5-3E)。

他のワケギ6系統について超低温保存後の苗条形成について本技術の適用を検討した。その結果、供試系統の多くで50%以上の高率の苗条形成が観察された(表5-3)。これらのガラス化した茎頂は、-152℃冷凍庫で3ヶ月間保存後も同程度の植物体再生率を示した。木原晩生系統では、1年間の保存も行ない、約70%の茎頂から植物体を再生した。

超低温保存した茎頂を直接多芽体形成培地に移植した場合もカルス形成をすることなく多芽体を形成し、健全な植物体に再生した。

異なる3種類の超低温保存法の比較では、ガラス化法でのみ高率の苗条形成率が認められた(表5-4)。緩速

表5-3 ガラス化法により-152℃冷凍庫に超低温保存したワケギ6系統の保存後の苗条形成の系統間差

系統	苗条形成(%±S.E.)
下関	88±5
長崎大玉	62±2
寒知らず	51±14
寒知らず(ウイルスフリー)	83±8
吉和(ウイルスフリー)	78±12
木原晩生(ウイルスフリー)	80±9

低温処理: 4℃・7日間; 前培養: MS培地+0.4M ショ糖に4℃・1日, 前処理された茎頂は-152℃超低温冷凍庫に保存前に、PVS2液に25℃で45分間浸漬処理  
各5個の茎頂を3~6反復で処理

表5-4 異なる超低温保存法により-196℃に保存したワケギ茎頂からの苗条形成

超低温保存処方	保存保護溶液	苗条形成(%±S.E.)
緩速予備凍結法*	16%DMSO	9±4
緩速予備凍結法	10%DMSO	0
簡易凍結法†	2Mグリセロール	0
簡易凍結法	3Mグリセロール	0
ガラス化法	PVS2 (25℃・45分)	70±11

低温処理と前培養を行った茎頂を利用

\*茎頂を10%あるいは16%DMSOで25℃で60分間処理し、-40℃まで0.5℃/分の速度で下げて予備凍結した後、液体窒素に浸漬

†茎頂を2Mあるいは3Mグリセロールで25℃・30分間浸漬処理後、-30℃フリーザーに60分間置いて予備凍結した後、液体窒素浸漬

予備凍結法あるいは簡易凍結法では低温処理および前培養などの処理を行ったにも関わらず、苗条形成は低率であるかまたは形成が認められなかった。

茎頂の超低温保存に適する時期と保存前の前処理について検討した。その結果、掘取り後0.5ヶ月の休眠期の茎頂では、前処理無しで83%の高い植物体再生率が得られたが、掘採り後の時間が経過するにつれて低温処理や耐性誘導処理(Loading)無しには保存後の植物体再生率が低下した。特に3ヶ月後では前処理無しで67%に対し、低温処理+前培養88%、Loading処理89%となった。また、5ヶ月後では前処理無し54%に対し、いずれも83%となった。なお、超低温保存後に再生した茎頂由来の幼植物の生育(草丈)は、培養開始17日後までは遅延傾向にあったが、37日後には超低温保存していない株とほぼ同程度の生育となった。

## 考 察

超低温保存を成功させるためには、液体窒素浸漬の際に生じる細胞内凍結を避けることが必要とされている<sup>18)</sup>。このため、細胞や茎頂は、液体窒素に浸漬する前に、細胞内がガラス化されるよう十分に脱水される必要がある<sup>19)</sup>。ガラス化法では、細胞や茎頂を高濃度のガラス化液により脱水する。しかし、これらをガラス化液に直接浸漬した場合、浸透圧ストレスや化学毒性により致命的傷害が生じる場合が考えられる。そのため、ガラス化法による超低温保存において生存率の低下が認められる場合は、保存前の濃縮したガラス化液による脱水<sup>20)</sup>および保存後の1.2Mショ糖による保存媒液の排出<sup>5)</sup>が不十分であることが原因となっていると考えられる。アスパラガスのEC<sup>12)</sup>やワサビの茎頂<sup>6)</sup>では、PVS2液に浸漬する前に2Mのグリセロールと0.4Mのショ糖を含んだ溶液に25℃で10分間浸漬する耐性誘導処理(Loading)を行い、生存率の低下が認められなくなったとしている。本

研究ではこの生存率の低下は、4℃・7日間の低温処理と0.4Mシヨ糖液・1日間の前培養処理によりほぼ完全に解消され、Loadingの効果も認められた。

PVS2液に25℃で60分間以上の長時間浸漬処理し、その後液体窒素に保存しなかったワケギ茎頂 (treated controls) の苗条形成率は、ガラス化保存した茎頂の苗条形成率とほぼ同様に浸漬処理が長時間となるほど低下した。同様な結果は、ホワイトクローバー<sup>20)</sup>、リンゴ・西洋ナシ・クワ<sup>9,10)</sup>のガラス化保存した茎頂でも報告されている。このように、茎頂をガラス化液への浸漬処理時間を最適な条件に制御したガラス化により、ガラス化液による脱水中の細胞の傷害枯死は生じなくなると考えられる。また、培養細胞や茎頂の十分な脱水による完全なガラス化による超低温保存により、細胞外あるいは細胞内凍結により生じる障害も回避できると考えられる。

近年、ニンニク (*Allium sativum*) の休眠種球から採取された茎頂が、庭田<sup>12)</sup>により効率的に超低温保存されている。茎頂 (2mm長) を事前に低温処理も高濃度シヨ糖処理も行わず、PVS2液に25℃で10~20分間浸漬処理後、直接液体窒素に浸漬し、苗条形成率はほぼ100%であったとしている。本研究のワケギでも休眠中の茎頂を用いることにより低温処理などの特別な処理を行うこと無しに保存が可能であり、ネギ属植物の超低温保存には休眠期の茎頂の採取が望ましいと考えられる。また、Matsumotoら<sup>7)</sup>は、ユリの培養種球から採取した茎頂もガラス化法により効率的に超低温保存できたとしている。このため、ガラス化法は多くの種球形成植物にも適用できるものと考えられる。

低温処理、前培養と保存後の処理法の改善により、果樹類やクワでは培養植物から採取した茎頂の効率的な超低温保存法が確立されている<sup>9,10)</sup>。Reed<sup>14)</sup>は、低温による順化処理は、供試した4種類のナシ茎頂の植物体再生率を有意に向上したとし、Dereuddreら<sup>1)</sup>は、前培養中の高濃度のシヨ糖が、Yamadaら<sup>23)</sup>はソルビトールが超低温保存した茎頂の生存率向上に有効であったとしている。著者もキクが多芽体のガラス化による超低温保存の場合、低温処理した多芽体を0.4Mシヨ糖液で1日前培養することにより、無処理の10%から60%に生存率が高まった (未発表)。しかし、ワケギでは低温処理が超低温保存した茎頂からの苗条形成率を大きく向上したものの前培養による苗条形成率の向上効果は認められなかった。

また、本研究で特に重要なことは、超低温保存したワケギの茎頂が、無処理の茎頂と同様に完全な植物体を再生できることが示されたことである。緩速予備凍結法により超低温保存されたエンドウの茎頂では、茎頂ドーム起源よりも他の組織からの再生が多かったと報告されて

いる<sup>3)</sup>。保存後の茎頂は、一時的にカルスを形成した後で、再分化や植物体再生の方向に進み生長を回復したと考えられる。カルス形成は、遺伝変異の発生を促進する可能性が高く、苗条形成に先立つカルス形成は望ましくない。本実験においてガラス化により超低温保存したワケギの茎頂は、苗条形成培地に置床して10日以内にカルス形成することなく直接、苗条を形成し、再生植物の形態にも特に異常は認められなかった。再生植物の遺伝的安定性については、さらなる細胞学的、生化学的、形態学的な分析が必要と考えられるが、ワケギ茎頂の超低温保存は、今後ウイルスフリー優良株や有用遺伝資源の保存に大いに活用できる技術と考える。

## 引用文献

- 1) Dereuddre, J., J. Fabre and C. Bassaglia: 1988. Resistance to freezing in liquid nitrogen of carnation (*Dianthus caryophyllus* L. var Eolo) apical and axially shoot tips excised from different aged *in vitro* plantlet. *Plant Cell Rep.* 7: 170-173.
- 2) Fahy, G. M., D. R. Macfarlane, C. A. Angel and H. T. Meryman: 1984. Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology* 21: 407-426.
- 3) Haskins, R. H. and K. K. Kartha: 1980. Freeze preservation of pea meristems: Cell survival. *Can. J. Bot.* 58: 833-840.
- 4) 池田好伸・井本征史: 1991. 茎頂培養によるワケギウイルスフリー株の育成とその効果 広島農試報 54: 41-46.
- 5) Langis, R and P. L. Steponkus: 1990. Cryopreservation of rye protoplasts by vitrification. *Plant Physiol.* 92: 666-671.
- 6) Matsumoto, T., A. Sakai and K. Yamada: 1994. Cryopreservation of *in vitro*-grown apical meristems of wasabi (*Wasabia japonica*) by vitrification and subsequent high plant regeneration. *Plant Cell Rep.* 13: 442-446.
- 7) ———, ——— and ———: 1995. Cryopreservation of *in vitro*-grown apical meristems of Lily (*Lilium japonicum*) by vitrification. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 41: 231-241.
- 8) Murashige, T and F. Skoog: 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with Tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- 9) Niino, T., A. Sakai, H. Yakuwa and K. Nojiri: 1992a. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of apple

- and pear by vitrification. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **28** : 261-266.
- 10) —, —, S. Enomoto, J. Magoshi and S. Kato : 1992b. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of mulberry by vitrification. *Cryo-Letters.* **13** : 303-312.
- 11) Nishizawa, S., A. Sakai, Y. Amano and T. Matsuzawa : 1992. Cryopreservation of asparagus embryogenic suspension cells and subsequent plant regeneration by a simple freezing method. *Cryo-Letters* **13** : 379-388.
- 12) —, —, — and — : 1993. Cryopreservation of asparagus embryogenic suspension cells and subsequent plant regeneration by vitrification method. *Plant Sci.* **91** : 67-73.
- 13) 庭田英子 : 1994. ニンニク茎頂のガラス化法による超低温保存. *青森園試報* **8** : 7-15.
- 14) Reed, B. M. : 1990. Survival of *in vitro*-grown apical meristems of *Pyrus* following cryopreservation. *HortScience* **25**(1) : 111-113.
- 15) Sakai, A and S. Kobayashi : 1990. A simple and efficient procedure for cryopreservation of nucellar cells of navel orange by vitrification. *Cryobiology* **27** : 657-465-470.
- 16) —, — and I. Oiyama : 1991a. Survival by vitrification of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* var. *brasiliensis* Tanaka) *J. Plant. Physiol.* **137** : 465-470.
- 17) —, — and — : 1991b. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb.) by a simple freezing method. *Plant Sci.* **74** : 243-248.
- 18) — and S. Yoshida : 1967. Survival of plant tissue at super low temperatures. *Plant. Physiol.* **42** : 1695-1701.
- 19) — : 1993. Cryogenic strategies for survival of plant cultured cells and meristems cooled to  $-196^{\circ}\text{C}$ . *JICA GRP. REF.* **6** : 5-26.
- 20) Steponkus, P. L., R. Langis and S. Fujikawa : 1992. In : *Advances in low temperature biology*, Vol. 1, P. L. Steponkus (ed) JAI Press Ltd. : 1-61.
- 21) Towill, L. E. : 1990. Cryopreservation of isolated mint shoot tips by vitrification. *Plant Cell Rep.* **9** : 178-180.
- 22) Widholm, L. M. : 1972. The use of fluorescein diacetate and phenosafranine for determining viability of cultured plant cell. *Stain Technol.* **47** : 189-194.
- 23) Yamada, T., A. Sakai, T. Matsumura and S. Higuchi : 1991. Cryopreservation of apical meristems of white clover (*Trifolium repens* L.) by vitrification. *Plant Sci.* **78** : 81-87.



## 総合考察

栄養繁殖性作物であるアスパラガス、ヤマノイモ、ワケギのマイクロプロパゲーション法を用いた培養苗生産のシステム化に関する研究開発を行った。著者が関与した栄養繁殖性作物の培養系を活用した苗生産法を図1に示す。

アスパラガスでは、これまで、茎頂から多芽体を誘導し、多芽体から伸長した苗条の腋芽切片から発根させる培養法が主流であった<sup>19)</sup>。しかし、苗生産の効率が低いため、著者は、茎頂からEC（高い不定胚形成能をもつ細胞集塊である embryogenic cell line）を誘導し、不定胚を形成後、植物体に再生させる系を開発した。また、遺伝資源としても利用できる多芽体（多芽集塊）のガラス化法による超低温保存法、多芽体（多芽集塊）からECを誘導する方法、および不定胚形成による効率的な培養苗の生産法を開発した。さらに、本法により増殖した培養苗の特性を長期的に解析し、栽培上の有利性を検証するとともに国内の西南暖地で主流となっている長期採り栽培

法に適した高品質・多収品種の育成に至った。

ヤマノイモでは、茎頂培養で育成したウイルスフリー苗の腋芽を利用した培養苗生産が主流であった。しかし、苗生産の効率が低いため、著者は、未熟葉からの多芽体誘導法を開発し、多芽体の効率的増殖・保存法や *in vitro* で形成する小芋（培養むかご）を経て効率的に苗を生産する方法を開発した。現在、栄養系選抜法により育成した多収品種‘広系1号’<sup>18)</sup>に本法を適用し、現地の生産圃場で培養むかごを種芋として扱うための養成方法、増殖体系の検討を行っている。

ワケギでは、茎頂培養によりウイルスフリー株が作出され<sup>20)</sup>、その利用が全作付面積の70%を占めるなど既に実用化が進んでいる。しかし、各産地の特徴あるウイルスフリー系統の原々種の維持には、アブラムシによるウイルス再感染の防止が重要な問題となっている。そこで、ウイルスフリー株の茎頂組織のガラス化法による超低温保存条件を検討し、ウイルスフリー株原種の長期保存と

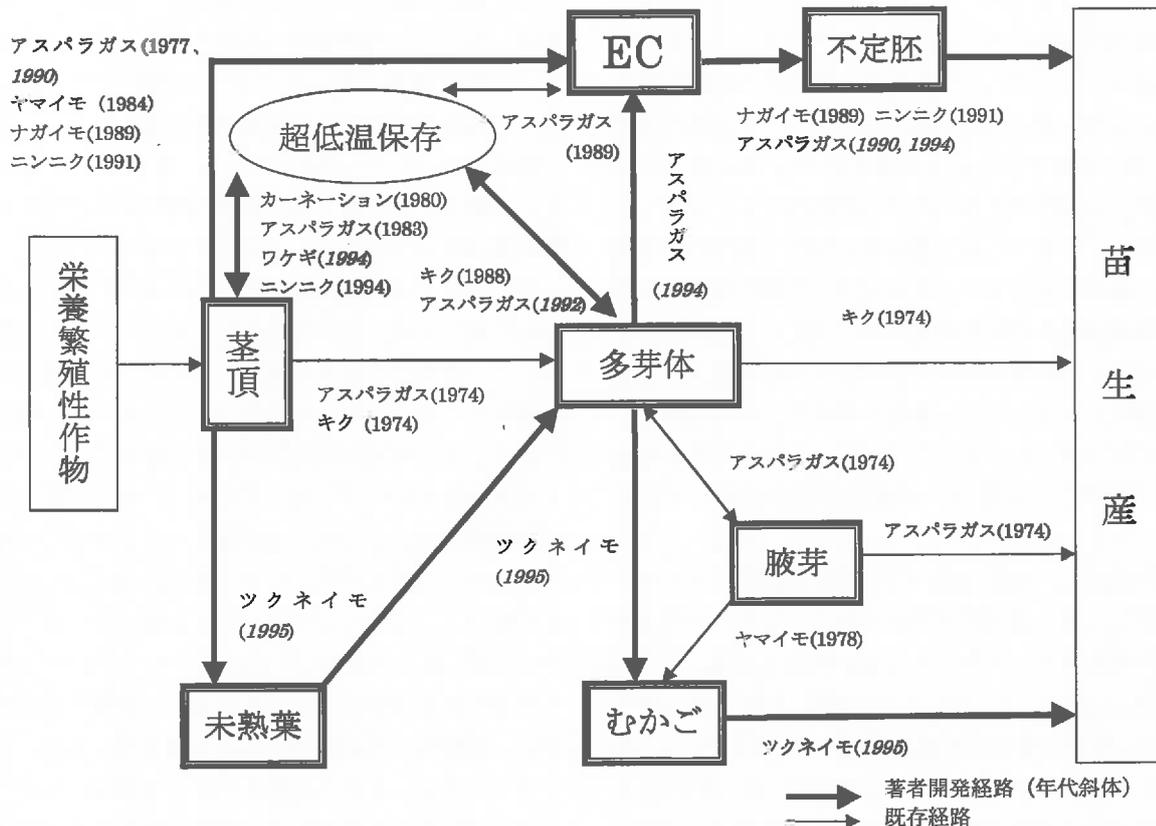


図1 栄養繁殖性作物の培養苗生産経路

多芽体形成による早期増殖を可能にした。

なお、これら一連の技術の開発には以下のような問題と今後の展開が考えられる。

### 1. マイクロプロパゲーションを利用した育種や栽培法改善の有効性

世界には様々な性質をもつ植物が存在し、作物として人間が利用する植物は、その利用目的により種子繁殖や栄養繁殖が使い分けされている。著者がマイクログロパゲーションの対象としたアスパラガスは、雌雄異株の植物であるため他殖性である。雌雄が揃えば交雑種子を得ることが可能だが、その雌雄もヘテロ性が高いため種子から得られた実生の性質にはばらつきが多い。アスパラガスを栽培して生計を立てようとする農家は、収益性が高く、栽培管理が容易で揃いのよい優良品種を栽培したいと望んでいる。アスパラガスの育種の方向について浦上<sup>4)</sup>は、従来品種のヘテロ性の改善を目的として1)組織培養によって増殖した優良株を交配親とするF<sub>1</sub>品種の育成、2)間性株(両全花を持つ個体)由来の超雄株を花粉親とする全雄品種の育成、3)葯培養で得られた遺伝的にホモな交配親間のF<sub>1</sub>ハイブリッド品種育成の3法を上げている。また、4番目に優良株を組織培養により大量増殖し、これを品種とする考え方もあるとしている。前3者については種子による供給が前提で現在、雌株の発生が殆どなく落下種子実生による雑草化等の問題がない全雄品種もオランダ、イタリア、アメリカ合衆国などで誕生している<sup>29)</sup>。このように海外では交配育種が進んでいるものの、全雄品種では今のところ日本の国内市場で高い評価が得られる品質を持つものは見当たらない。一方、日本ではアスパラガスが野菜として定着した年月も浅く、育種への取り組みも後発的でその体制を確立できた場所は殆どない。そのため、比較的労力がかからず、育種理論も明快な優良雄株の選抜による培養苗生産が大学などの指導もあって北海道富良野農協や上湧別町寒地園芸センターなど大産地を背景とした地域機関で先行して取り組まれてきた<sup>30)</sup>。しかし、これらの優良な増殖系統も品種として作付けが進むまでには至っていない。

著者の選抜した雄株品種‘Y6’(種苗登録名‘グリーンフレッチェ’)は、国内西南暖地において4月~10月まで収穫する長期採りの作型で最も高い収量(重量)を上げている種子品種‘ウエルカム’の1.4倍、収穫本数は同2倍に加え、外観の優れた秀優品の割合が1.4倍を示し、栽培を3年間続けて安定した収量を示した上に、別の2ヶ所の現地ハウス栽培試験でも同様な結果を得ている<sup>19)</sup>。培養苗の生産コストは、第3項で後述するように不定胚

形成技術を開発・改良したことにより従来の腋芽培養法に比べて大きく低減し、農業経営における種苗費の差は収穫1年目で十分解消できる。また、1度定植すると約10年栽培できることにより培養苗の有利性は高いと考えられる。他国では品種導入に際して、経営指針を示すのは当然であり、ニュージーランドでは、全雄F<sub>1</sub>品種の‘ジャージー・ジャイアント’の導入で、従来の‘MW500W’や‘UC157’の栽培に比べて大きな純利益が上がるという報告されている<sup>31)</sup>。このように組織培養を通して収益性の高い品種が育成できたことは、今後のアスパラガス育種の発展において重要であると考えられる。なお、日本国内市場では、アスパラガスの若茎の等級(太さ)における嗜好性が緩やかに変化しており、従来M・L級(25cm長で12~30g)の販売単価が高い傾向にあったものが、M級(12~19g)が低落し、2L級(30~50g)が高く取引される傾向に転じている。従って、育種目標設定時(1993年頃)の細いM級の割合が高い‘Y6’の栽培にとっては、不利な条件になってきた。そのため、今後はその他の優良形質をもつ母株の選抜と保存・増殖にも、本システムを活用し、市場動向に即座に対応できる育種体制を確立する必要がある。また、優れた外観品質をもつ‘Y6’の特性を活かしながら太い若茎を多く収穫できる栽培法や新品種の開発も検討事項の1つである。

アスパラガスの栽培試験では個体毎の特性がばらつくために供試株数による試験実施規模が大きくなる傾向にある。しかし、西南暖地の長期採りの栽培条件では大規模の試験を維持することは多くの時間と労力を必要とし、試験の実施が極めて困難である場合が多い。そこで今後は‘Y6’のような遺伝的に均一なクローン苗を材料とし、省力・少面積で栽培条件の解析を進めることが成果を効率的に引き出すことにもつながると考える。

ヤマノイモ属の植物は、アスパラガスと同様に雌雄異株の作物である。牧野<sup>22)</sup>はツクネイモについても雌雄異株とし、雄株の存在を記載しているが、一般栽培では花の形態からみて雌株しか認知されていない<sup>10)</sup>。雄株が無いため、種子繁殖が不可能であり、むかごや芋の分割による栄養繁殖だけが一般に行われている。同属の仲間には雌雄株が共に存在し、交雑種子による繁殖が可能な日本在来種とされるジネンジョ(*Dioscorea japonica*)などが存在する。また、ツクネイモと同種とされるナガイモでは、栽培種には雄株しかないと言われてきたが、八畝<sup>42)</sup>が在来の栽培系統から雌株を発見し、解析を進めたことから、交雑種子の胚培養による品種育成も開始された<sup>1)</sup>。ナガイモでは、とろろの粘りの改良を目的としてツクネイモとの交配・胚培養による育種が進められているが、ツクネイモでは基から強い粘りをもつため、ウイルス抵

抗性を導入しようとした以外の交配例は無い。また、ナガイモでは、直径1～2 cmの比較的大きいむかごを多数着生する性質をもつため、これがウイルスフリー優良株の普及に大きく貢献した<sup>48)</sup>。しかし、ツクネイモの場合、むかごは10a当り数十個の単位でしか着生がみられず、直径も3～5 mmの小さいものが多い。そのため、むかごを利用した栽培は殆ど行われてこなかった。組織培養により効率的にむかごを形成し増殖できる品種を育成できれば、ナガイモと同様な種芋生産体系の確立により、1) 慣行栽培のように優良で高値で販売できる芋を次年度の種芋として残す必要がない、2) 不定芽利用でなく定芽を利用した栽培となるため萌芽が早く、比較的小さい種芋でも高い収量が期待できる等の長所がある。著者の育成した多収系統‘広系1号’<sup>18)</sup>は、未熟葉を用いた葉片培養による多芽体形成が容易であり、植物体再生・培養むかごの着生量も生産コストを低減し、実用化できるほど十分な量であった。そのため、現在、むかごから養成した‘広系1号’の種芋を一般栽培に活用する試験を開始している。‘広系1号’は、在来系統に比べて外観品質や株当り収量の揃いがよく、これまでも芋の肥大と気象要因の関係解析<sup>20)</sup>や肥効調節型(緩行性)肥料による省力施肥法の開発(甲村ら 未発表)にも大きく貢献してきた。また、本報では各種の植物生長調節物質がヤマノイモのむかごや芋の着生にどのような影響を及ぼすかについて検討したが、これまでの植物生長調節剤の適用実験では、圃場で栽培している作物に直接散布して効果を検討するケースが多く、その処理効果の信頼性も疑わしいものが多かった。栽培環境では各種要因が複雑に影響するため、最終的に圃場試験で効果を問われるものの検討に際しても、事前に組織培養により実験を行い、処理効果を小スペースで推測することにより、新たな管理方法を提言できる有効な手段となりうると考える。今後も優良系統の特性を生かした栽培法の確立と新たな栽培管理方法を導き出す手法としてもマイクロプロパゲーションの活用が期待できる。

ワケギは、ネギ属の植物であるが、細胞遺伝学的研究により、異型接合の2倍体であることが明らかになっておりネギのような種子繁殖はできない。田代<sup>21)</sup>は、ネギ(*Allium fistulosum* L.)とシャロット(*Allium ascalonicum* L.)との交配雑種とワケギとの染色体や外観などに相違点を見つけれないことからワケギの起源をネギとシャロットの交配雑種であると推測している。これについては、Hizume<sup>11)</sup>がネギ(*Allium fistulosum* L.)とタマネギ(*Allium cepa* L., シャロットはタマネギの一群とされる)のDNAを用いて分子細胞遺伝学的に証明している。すなわち、各植物の全DNAを採取して、ワケギ染色体に *in situ*

ハイブリダイゼーション(GISH法)を行ったところきれいに2分し、rDNAを用いても同様であったというものである。

このようにワケギは異型接合の2倍体であるため、種球の分球による栄養繁殖しか増殖方法が無かったが、栽培による種球の繁殖が1作30倍と高率であるため、この方法で維持・増殖されてきた。したがって、ウイルスフリー株も茎頂培養だけでマイクロプロパゲーションを利用することなく実用化された<sup>12)</sup>。しかし、隔離ハウスでの原種保存では、現在、アブラムシの媒介によるウイルスの再感染が大きな問題となっており、また、ウイルスフリー苗の利用による増収が十分得られていないのも実状である。そのため、アブラムシによるウイルス再感染の心配がない *in vitro* 条件下での原種の維持増殖とウイルス病抵抗性等の新品種育成が求められている。*in vitro* 条件下で原種が維持できれば、健全なフリー株数系統を多芽体を用いて一斉に増殖し、ほぼ均一な生育条件で特性検定を行うことも可能となると考えられる。

## 2. 種苗生産のシステム化における培養組織の保存技術の利用

培養苗生産の実用化には、生産者の要求に合わせた優良株の安定供給が必要となる。そのためには、植物資源を保存するシステムが必要となるが、これには長期保存(Base collection)と、短期保存(Active collection)の2つの方法がある<sup>45)</sup>。保存の目的の第1は、選抜した優良個体が遺伝的な変異を生じることなく、正常に維持増殖されることであり、第2は、均一な苗を一斉に出荷できるように、発芽や生長時の各生育段階を調節できることである。前者には、遺伝的に安定した材料を用いる静止的保存が、後者には直接苗生産に結びつく材料を用いる活動的保存が望ましいとされている。

前者の長期保存技術の1つである超低温保存技術は、現在さまざまな細胞、組織や器官への適用が試みられている。増殖技術のシステム化においては、第1に原種(選抜株)の保存が重要である。原種は、親株と遺伝子型が同じ植物を復元し、増殖できることが前提となる。通常のカルス化(脱分化)を経由して分化した植物の場合には、親植物と遺伝子型を異にする植物を含むおそれがある<sup>9)</sup>ため、試験管内での培養によって保存するには、茎頂が最も望ましいとされてきた<sup>39)</sup>。近年、茎頂を液体培地に移植し、回転培養することにより遺伝的に安定な苗条原基<sup>39)</sup>が誘導できると報告され、著者らは同様な回転培養法を用いてアスパラガスの多芽集塊の誘導に成功した<sup>4)</sup>。この組織は、カルス経由でなく、継代培養中にもカルス化が殆ど認められない特徴がある。一方、アスパラガス

では、不定胚形成による増殖系を開発したが、カルス培養であるため変異の発生を否定することはできない。

カルス培養では一般的に長期間の継代や急速培養が遺伝的な変異を起こす可能性の他、胚分化能の低下や喪失、増殖能力、栄養要求性等の変化が生じる可能性があると考えられている。そのため、不定胚形成カルス (EC) は、親株から定期的に誘導し、再生株の形態や染色体数を確認することによって適度に更新することが望ましいと考えられる。しかし、圃場から新たに若茎を収穫し、滅菌処理して EC を誘導するには、実施時期や植物体の状態が大きく影響する。多芽集塊は、継代培養により安定した増殖を繰り返す、EC 誘導のための活性の高い茎頂組織をいつでも大量に供給できることから、親株の *in vitro* 保存に有効であり、EC の誘導率も安定し、EC 誘導材料としても望ましい特性を持っていた。そのため、多芽集塊を原種として保存することが培養苗生産にも有効であると考えられた。また、今後の組織培養を利用した作物育種にも、大量の系統保存を行う必要性が生じると予想され、培地作成や試験管への移植等には、多くの人件費や時間、場所を必要とする<sup>34)</sup>ことから、超低温保存技術の開発に取り組んだ。

アスパラガスでは、主として多芽集塊を材料とし、PVS 2 液を用いたガラス化法<sup>35)</sup>による超低温保存技術の開発を検討し、得られた結果を EC や不定胚の保存にも応用した。これらの技術開発により、アスパラガスでは優良親株の保存から増殖・苗生産まで一貫した培養苗生産体系を確立した(図2)。また、同じガラス化法を用い、保存前に低温順化処理を行うことによってワケギのウイルスフリー株茎頂の超低温保存法を開発した。これまで、培養細胞の超低温保存を培養苗生産に位置づけて利用した例としては、キクの1種であるハプロパプスの苗条原基の超低温保存<sup>11)</sup>がよく知られている。しかし、農業生産に実用性の高い系では、腋芽茎頂を利用して大量増殖でき、超低温保存後の再生率も高いワサビ<sup>23)</sup>やユリ<sup>24)</sup>を除き、極めて少ない現状にある。一方、ニュージーランドでは、林木育種におけるクローン苗の特性検定が長期にわたるため、数百系統の EC の保存が実際に行われている。日本では、このような規模の育種を行っている作物は水稻を除きほとんどない。しかし、できるだけ多くの品種系統を扱って比較することが、育種の原点であり、超低温保存技術を組み入れることにより効率的な育種も可能になると考えている。本報告で扱ったアスパラガスなど永年性の作物は、5年単位の比較的長期間の栽培による特性検定を必要とし、超低温保存により、同じ生育段階の再生植物を得ることができれば系統、株数を一定規模に揃えて、より正当な品種評価も可能となると考えられる。

また、現在、遺伝子組換え技術が進行し、米国では組換え大豆やトマト等が作付けされ、これらは日本へも既に入ってきている段階にある。農作物の将来的な育種を考える上で、著者らもアスパラガス培養細胞への遺伝子導入を試み、パーティクルガンを用いた方法の開発に成功している(重本ら未発表)。アスパラガスの栽培上、甚大な被害を及ぼしている茎枯病に対し、耐病性の素材を育成する目的で、液体培養中の EC にイネから単離されたキチナーゼ遺伝子<sup>29)</sup>を導入しようとするもので、既に再生植物の耐病性の検討に入っている(重本ら未発表)。今後、遺伝子組換え作物の育種のためには、より多くの系統を扱う必要があり、アスパラガスのように常温で2~3週間毎の継代培養を繰り返す必要がある生育の早い培養細胞を扱う場合には体系的な保存技術の活用が望ましいと考えられる。また、それらの培養細胞の一部を選抜して、育苗段階や圃場試験で特性検定を行う場合も、隔離温室や隔離圃場の使用面積を考慮して計画的な試験設計を行う必要がある。生育段階を均一に揃えるためにも長期保存技術を活用する利点は高い。ワケギでも感染が問題となっているネギ萎縮ウイルスのウイルス

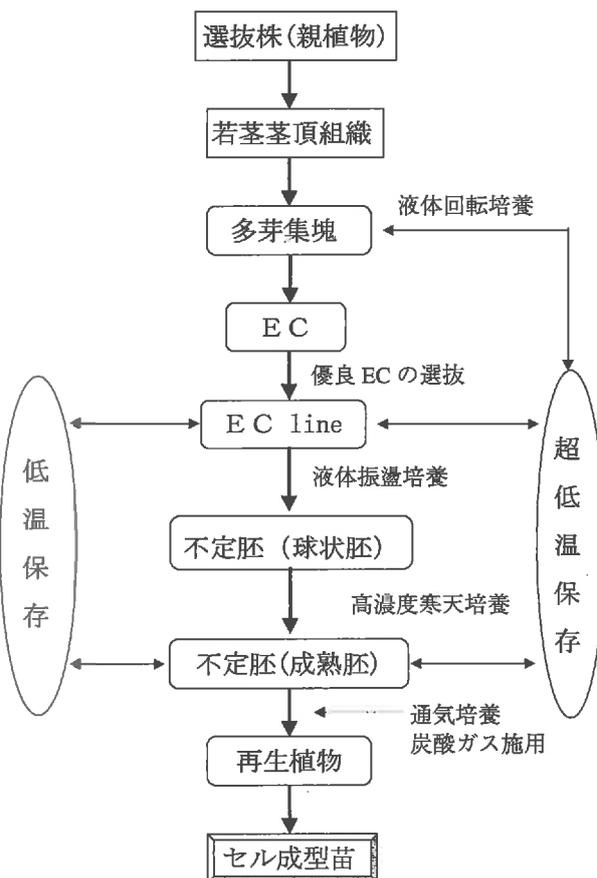


図2 アスパラガス培養苗の大量生産システム

外被タンパク遺伝子の解析に成功し（池田ら 未発表；重本ら 未発表）、この外被タンパク質遺伝子を組み込んだベクターの構築を検討している。今後、アスパラガスと同様に多くの培養細胞系統を扱うことが予想され、超低温保存技術を活用する利点は高いと考える。なお、ヤマノイモでも多芽体を用い、ガラス化法を用いた超低温保存法を検討したが、低温前培養処理などを試みても生存細胞すら得られない状況にあった。ヤマノイモ属の植物はその多くが熱帯雨林を原産とし<sup>36)</sup>、温帯適応種とされるツクネイモの実際栽培でも降霜による凍結等には極めて弱い性質を持っているため、超低温保存法の確立は極めて難しいものと考えられる。しかし、近年になってヤマノイモでもビーズガラス化法<sup>29)</sup>を用いて成功例が報告された（平井ら 未発表）。これは①培養株を0.3Mシヨ糖培地で10日間前培養した後に約1mmの茎頂を採取する。②0.4Mシヨ糖と2%アルギン酸によるビーズに包埋する。③2Mグリセリンと0.6Mシヨ糖液に25℃で90分間浸漬する浸透圧保護処理を行う。④PVS2液に0℃で4時間浸漬後に液体窒素に浸漬する4段階の複雑な方法である。しかし、約60%の高率で茎頂の保存に成功しており、今後、多芽体での保存法の確立と作業性の改良が望まれる。

次に、種苗を必要時に一斉に供給可能とするために有効な短期保存技術では、アスパラガスのEC、不定胚やヤマノイモの多芽体の低温や植物生長調節物質を用いた遅生長<sup>40)</sup>による保存法を開発した。ECや多芽体は一般的に生育速度が速く、これを抑制し、一定に制御することは大量増殖を計画的に行い易く、継代培養のために必要とされる培地作成や移植の労力を軽減でき、超低温保存施設のある研究機関でなくても利用できる。また、超低温保存と異なり、即日急速な増殖に活用できる利点がある。アスパラガスの不定胚を利用した種苗生産においては、ECを数ヶ月、不定胚を半年間保存できるようになり、ほぼ計画的な種苗生産体系を確立できた。しかし、発芽時期の同調化・斉一化と初期生育の促進などの残された問題があり、発芽可能な段階に生育させた胚を1年程度保存し、より効率的な種苗増殖体系を確立したいと考える。また、ヤマノイモでは多芽体の継代培養期間を6ヶ月と長期化でき、省力できる一定の増殖体系は確立でき、実用化に向けて今後取り組みたい。

### 3. 培養苗生産方法にかかる諸問題

培養苗生産はここ20年間で急速に普及してきたが、効率が悪く生産コストが高いなどの理由から、実用化した例はランなど一部の高価に販売できる花き類やサツマイモなど栄養繁殖作物のウイルスフリー苗の母株生産に限

られている。培養苗生産に関する研究は、一方では作物育種の観点から、見た目やおいしさ等、消費者が料理に好んで使用する品質をもち、生産者に高い収益性をもたらす優良株の選抜による品種の育成を第一とし、もう一方では、種苗生産者としての観点から低コストの培養苗生産法の構築を行って、良質で安価の苗を生産者に供給することにより、農業経営をより健全な方向に導くことを目的とする。後者においては、現状の種子を利用した苗生産においても採算性の改善のため、セル成型育苗方式への転換により、必要面積、時間、労働力の低減が図られており、米国では苗物生産の75%・15億株がセル苗として供給されている現状にある<sup>7)</sup>。これらのセル苗生産においては、従来の直播と異なり、高度な機器とより綿密な管理が必要となったとされている<sup>2)</sup>が、組織培養による苗生産は、これらの設備投資に加え、無菌化のための施設・備品等にさらなる投資を必要とし、より一層のコスト低減のための技術開発が求められる。

西<sup>27)</sup>は、組織培養による増殖技術が成立するためには、前提条件として1)他の増殖方法が適用困難な条件の基で従来の品種よりも生産性や商品価値が大幅にまさる栄養系が得られること。2)培養ならびに育苗成のコストが格段に低下して他の増殖方法と十分な価格競争が可能であることとしている。しかし、培養苗の生産コストに関する報告は少なく<sup>14,15,51)</sup>、農家の収益性や種子品種との比較まで行った例は見当たらない。本試験において取り扱った作物のうち、アスパラガスは、種子繁殖による増殖方法が主であるが、同一の品種内でも株間の品質・収量の差が極めて大きい。この点、優良株を選抜して増殖した培養苗は品質の揃いもよく、多収であるため生産性や商品価値は種子品種より大幅にまさると考えられる。また、培養苗の生産コストも、図3のように1年目の培養苗生産過程において、施設を有効利用し周年(年4回)生産する体系を組むことで1苗約45~60円まで低下させ、販売額も1苗約70円で設定できる目途が立ち、種子苗(45円)と十分競争できる価格帯となった。この苗生産コストは培養期間1ヶ月、200穴セル成型育苗箱を用いて年20万本出荷、植物体の再生率、順化率を約80%として試算した。また、培養施設・順化ハウス、培養機材は平成4年度の農畜産業固定資産評価標準を参考に減価償却費を計算し、人件費も農技センターの雇用賃金職員の給与を参考とした<sup>17)</sup>。

アスパラガスは定植後10年以上の長期にわたって栽培される果樹的な野菜であるため、苗の購入価格は高くても、栽培期間を10年として種苗コストを分割して計算すると1年性作物と比べてさらに安価となる。そこで、当初は腋芽培養系<sup>40)</sup>でもコスト的に経営が成立するとして

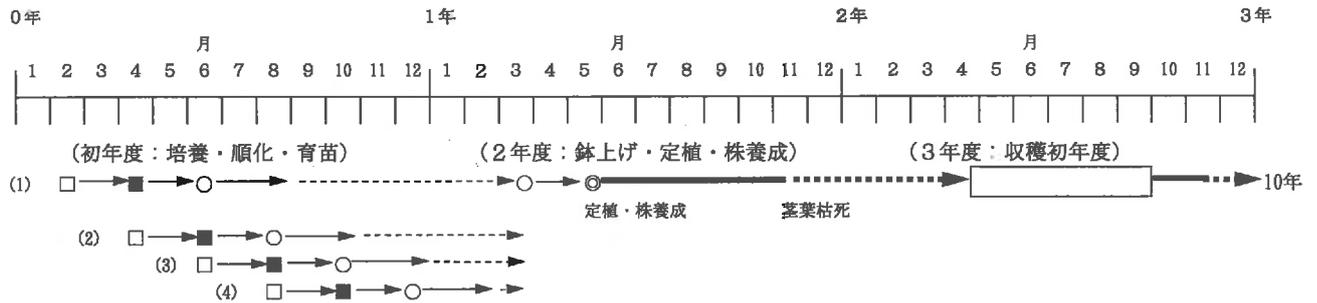


図3 アスパラガス培養苗生産、株養成、収穫のスケジュール

アスパラガス培養苗の生産初年度から定植、収穫までのスケジュールを示す。

- ：組織培養開始（不定胚の移植による植物体再生），■：セル成型育苗利用による馴化開始
- ：黒ポリ鉢への鉢上げ養成開始，◎：圃場への定植 □：収穫期間
- ：培養および馴化期間， →：冷蔵庫への貯蔵期間（地下部のみ掘り上げ貯蔵）
- ：定植後の栽培期間， ■→：定植後の休眠期間（地下部の枯死期間）

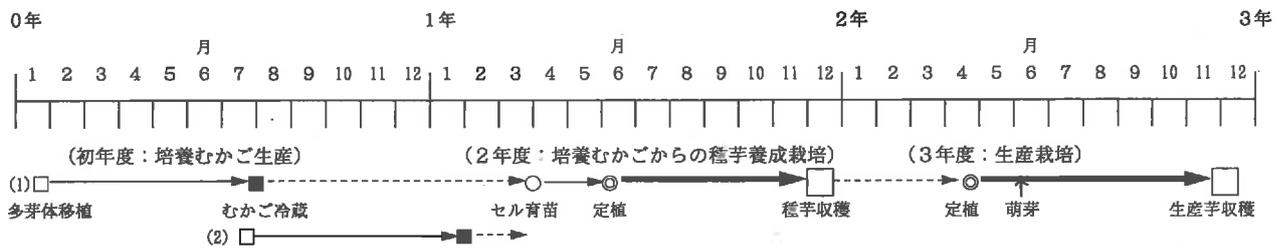


図4 ヤマノイモの培養むかご生産、種芋養成、生産栽培のスケジュール

ヤマノイモの培養むかごの生産初年度から、むかごを利用した種芋生産と生産培養までのスケジュールを示す。

- ：組織培養開始（多芽体の移植による植物体再生），■：培養むかごの掘り上げ貯蔵
- ：セル成型育苗箱へのむかご播種，◎：圃場への定植 □：収穫期間
- ：培養および育苗期間， →：冷蔵庫への貯蔵期間（培養むかご）
- ：定植後の栽培期間，

精力的な開発研究が進められ、苗の活着率を高めるための貯蔵根発生率の向上を図るべく研究が行われてきた。野菜の培養苗は、既に欧米を中心に1200万本が流通し、その主要な作物がアスパラガス、ニンニク、ジャガイモとメロンの4作物(1992年)であり<sup>9)</sup>、腋芽培養の開発はアスパラガス生産に新たな展開をもたらしたものと考えられる。産地としてもニュージーランド(Jermynら未発表)や国内でも北海道富良野町や上湧別町などで実用化が図られてきた<sup>30)</sup>。北海道の例では、1)発根率が低いため苗生産コストが高い(1苗400円)、2)種子苗の販売単価が極めて安い(1苗15~25円)、3)寒冷地の春芽収穫(5月中から7月上旬)だけの作型は収益性が低い等の理由から採算がとれず事業が停滞している状態である。しかし、不定胚培養系を用いた事業展開が可能になれば、苗の販売単価も100円以下となる。西南暖地の全期立茎法<sup>31)</sup>による長期採り栽培(露地では4月から9月、ハウス3月から10月の収穫)では、広島市場の年次別月別の規格別重量単価に従って粗収益を試算した結果、露地で‘Y6’146万円/10a、‘ウエルカム’106万円/10aであった。したがって収穫1年目だけで種苗費の差額である5万円(1苗当りの差額25円×2000株/10a)を解消でき、農家の所得向上への貢献は大きいものと考えられる。

ヤマノイモは、ナガイモのウイルスフリー苗の供給など組織培養を利用した苗生産の展開が1980年代から進められていた。その際、ナガイモやジネンジョは通常の栽培中に1~2cmのむかごを茎の腋芽部に形成し、着生数も多いため、組織培養を用いて増殖するより、寒冷紗を利用した隔離ハウス内で増殖する手法の開発が中心となった。ツクネイモでも、ウイルスフリー苗の収量性が高いことは報告されていた<sup>40)</sup>が、ナガイモ類と異なり一般栽培でのむかごの着生がほとんどみられない。そのため、組織培養によるむかごの増殖について検討した。その際、不定胚形成はナガイモでは報告があるものの<sup>28)</sup>、ツクネイモでは同様な方法を試みてもECや不定胚を誘導できなかった。腋芽や多芽体による増殖法は数例あるものの、容器内でつる茎の節間が伸長して繁茂するために継代培養の際の切り出しに手間がかかり、雑菌混入の機会も多かった。そこで、新たに未熟葉を用いた多芽体誘導と増殖法を開発し、改良を重ねてきた。その結果、継代培養や植物体再生が容易、回転培養などの設備投資が不要、培養過程が終了した時点でむかごを採取するため、以後の雑菌汚染の心配が少ないなど汎用性の高い技術が開発できた。この系を用いると図4のような培養むかごによる生産体系が組める。すなわち、1年目は年2回の培養むかご生産を行い、翌年むかごを播種しセル成型苗としたものを圃場に定植し、種芋として養成する。3年目に

生産栽培に利用し、早期萌芽による多収穫が期待できる。

ヤマノイモでは、良質で多収の‘広系1号’を育成しており<sup>30)</sup>、本系統は従来の切り芋による生産法でも在来系統が重量で年6倍なのに対し、年9倍と高い増殖率をもっている。種芋を毎年購入する場合の種苗費は10a当りの種芋が200kg必要なため約20万円かかるが、本系統では肥大がよいために種芋購入量は試算上は2/3に低減でき、種苗コストも削減できる。また、種芋を培養むかごから養成して生産する場合、年間8万個の培養むかごを生産する想定で培養容器1本当たり40個着生、容器数1800本、2回転/年、80人役(日給6500円)で試算すると組織培養によるむかご1個(約80mg,直径4mm)当りの生産費は10円となる。このむかごを原価で10a分4200個購入した場合、種苗費は42000円となり、自家での種芋養成には栽培面積約2.5a、通常の栽培管理費として約5万円が必要であり、合計約10万円で翌年の種芋が生産できる。したがって、通常必要な種苗費(約20万円/10a)の約半額で種芋が得られる。また、通常の栽培では、形状が良質で高収益が上がる芋を種芋として翌年の栽培のために保存しているが、むかご由来の種芋を利用した栽培では、全量出荷・販売できるため農家の所得向上も期待できる。本法開発の参考としたジャガイモの全粒種芋栽培では、従来の切り芋でなく着生した小粒の芋を利用して栽培するため病害虫による障害を受けにくく、萌芽が早いなどの長所があるとされている<sup>9)</sup>。ヤマノイモでも慣行の切り芋による栽培に比べて萌芽が約2週間早まることを観察している。しかし、栽培ではナガイモのウイルスフリー苗栽培<sup>30)</sup>と同様に、芋の肥大時期が従来より早く旺盛になり、芋の形状が不良になり易い傾向を認めている。この原因は、通常の芋の栽培管理としては圃場を乾燥し根を張らせる茎葉伸長期にむかご養成種芋が芋の肥大を開始することであると推測している。したがって、今後は培養むかごの栽培に適した施肥や水管理法の検討を進める必要がある。

ワケギは、イチゴ、ナガイモやカーネーションに次いでウイルスフリー苗の利用が早期に実用化した作物であり<sup>32)</sup>、既に市販生産物の70%がウイルスフリー種球(りん茎)由来となっている。ワケギは葉を食用とする野菜であり、ウイルス病徴が葉に発現すると外観の品質を低下させ、市場単価も大きく低下することに加え、鮮度保持期間も短くなる。また、隔離ハウス内での栽培による種球増殖が1作3ヶ月で30倍となることから、年30<sup>3)</sup>の増殖率と試算され実用化は早かった。しかし、ウイルスフリー苗の原種の維持は隔離ハウスによる栽培でも周到な管理を必要とし、アブラムシの吸汁によるウイルス再汚染やその他の病害対策などが必要になる。そこで、ウイル

スフリー苗原種の長期保存と多芽体培養系の確立による早期供給が課題となり、本研究を行った。長期保存では、ウイルスフリー株の茎頂を低温処理と前培養を行うことによりPVS2液を用いたガラス化法<sup>35)</sup>で超低温保存することができた。また、この茎頂を多芽体形成培地に直接移植しても、茎頂がカルス化することなく健全な多芽体および植物体に再生した。ワケギではカルス化することにより変異が多発することが報告されている<sup>43)</sup>。他のネギ属では、ニンニク<sup>37,38)</sup>で不定胚形成により安定した増殖が可能とする系統の存在も報告されているが、今のところ多芽体による増殖や発根が比較的容易であるため利用されていないのが実状である。組織培養により植物体に変異することなく維持再生できることは農業におけるバイオテクノロジーの最も重要なポイントであり、現時点では多芽体培養系が優れていると言える。ワケギでは、現在ウイルスフリー系統「広島1号」が育成されている<sup>12)</sup>。また、田代<sup>42)</sup>は、2,4-Dを添加した培地でカルスを形成後、2,4-Dを除いた培地に移植する方法と、茎頂をコルヒチン添加培地で培養する2つの方法で染色体数の倍化した個体を得ている。現在、田代<sup>42)</sup>の方法に従って倍数性育種による新系統の育成に取り組んでおり、著者が開発した保存・増殖体系を活用することにより、今後の育成のための遺伝資源・原種の保存や優良種球の早期増殖が可能となると考えられる。

#### 4. 培養苗生産システムの今後の展望

以上、栄養繁殖性野菜であるアスパラガス、ヤマノイモ、ワケギの1) マイクロプロパゲーションを利用した育種・栽培の有効性、2) 種苗生産のシステム化における保存技術の利用、3) 種苗生産にかかる諸問題について述べた。培養苗生産技術は、技術の進歩や新技術の活用により、日進月歩で進み、さらに低コスト化の方向に進んでいる。遺伝資源の長期保存を目的とする超低温保存では、これまで困難とされていたヤマノイモなどの熱帯を起源とする植物の成功例(平井 未発表)も出始めるなど、適用拡大が図られつつあり、21世紀には育種のための基本技術として広く一般化するものと期待される。また、培養苗生産の効率化技術では、フッソ樹脂フィルムを利用した培養容器の開発<sup>40)</sup>、発光ダイオードによる半永久的な低コスト照明技術<sup>26)</sup>、ジャーファーマンターを利用して培養する際の雑菌をフィルターで除去する大量培養法の開発<sup>21)</sup>や耐熱性殺菌剤PPM™(Plant Cell Technology(株))等の簡易培地殺菌剤の開発によるベンチャー企業も出現している現状にあり、今後の進展が期待される。

各作物別では、浦上<sup>44)</sup>がアスパラガスなどの他殖性作

物の今後のF1ハイブリッド育種には、クローン苗で優良な系統を選抜することが育種の第1歩であるとしており、本報により組織培養で育成した優良系統を将来的には、全雄良質のF1ハイブリッド品種の育成につなげたいと考える。また、種子のコルヒチン処理により倍数性育種が行われてきた<sup>30)</sup>が、今後は田代<sup>42)</sup>がワケギの茎頂培養で行った方法に準じ、不定胚形成の培地中に直接コルヒチンを処理するなど培養系を利用した倍化や突然変異誘導による育種も実施できると考える。

ヤマノイモでは、マイクロプロパゲーションにより増殖した優良系統のむかごを種芋として利用し、萌芽促進効果による高収益の新生産技術の開発や*in vitro*条件下で生育調節剤を初めとした栽培管理法を検討する試みについても提言した。ワケギでは、マイクロプロパゲーションをこれまで進めてきたウイルス外被タンパク質遺伝子の組換え体の保存・増殖や有用変異体の作出と固定・維持に利用でき、育種面への広範な活用が期待できる。

今後はこれまで開発した培養系を柱として、さらなる安定した培養苗生産システムを構築し、野菜産地の活性化に貢献したいと考える。

## 引用文献

- 1) 荒木肇・原田隆・八鍬利郎：1984. ナガイモのさく果、種子および胚の生長過程と胚培養の可能性 ヤマノイモ属 (*Dioscorea*) の性状に関する基礎的研究 第5報 北大農邦文紀 15(2) : 133-139.
- 2) Armitage, A. M. : 1994. Ornamental bedding plants. Cab international.
- 3) Broom, F. : 1990. 11. The economic of growing asparagus. The New Zealand asparagus manual. S. J. Franklined. : 1-12.
- 4) 長久逸・甲村浩之・池田好伸：1991. アスパラガスの高密度多芽状集塊の誘導と植物体再生 広島農試報 54 : 25-31.
- 5) Chu, I. Y. E. : 1992. Perspective of micropropagation industry. Transplant production systems (K. Kurata and T. Kozai eds.) Kluwer academic publishers. Press. Netherlands : 137-150.
- 6) D'Amato, F. : 1975. The problem of genetic stability in plant tissue and cell cultures. In crop genetic resources for today and tomorrow (O. H. Frankel and J. G. Hawkes, eds.) Cambridge univ. press, London : 333-348.
- 7) Dill, R. : 1993. Power houses of the plug industry. green house grower 11(11) : 10-11.
- 8) Fukushima, E., S. Iwasa and T. Yoshinari : 1964. On

- the basic karyotype of *Allium wakegi*. Chrom. Inf. Service. 5 : 5-6
- 9) 船越建明・松浦謙吉・村上清則:1987.全粒種いも利用による秋バレイショの安定生産 第1報 種いものホルモン処理と大きさが生産力に及ぼす影響 広島農試報50 : 105-116.
  - 10) 平井輝悦:1987. ナガイモのウイルスフリー苗の特性とその利用. 今月の農業 31(5) : 50-56.
  - 11) Hizume, M. :1994. Allopolyploid nature of *Allium wakegi* Araki revealed by genomic *in situ* hybridization and localization of 5S and 18S rDNAs. Jpn. J. Genetics 69 : 407-415.
  - 12) 池田好伸・井本征史:1991. 茎頂培養によるワケギウイルスフリー株の育成とその効果. 広島農試報 54 : 41-46.
  - 13) 伊藤悌右・今中義彦・長谷川繁樹・船越建明:1994. 西南暖地におけるグリーンアスパラガスの栽培に関する研究 第1報 収穫と株養成を平行させる母茎留茎栽培(全期立茎栽培)の収量性について. 広島農試報60 : 35-45.
  - 14) 川島信彦:1993. 園芸作物の低コスト種苗生産技術の開発 奈良県・鳥取県・大阪府・和歌山県共同研究. 平成3年度近畿中国地域重要新技術 農林水産省中国農業試験場編:217-245.
  - 15) 川村泰史・久島繁:1996. 植物組織培養の生産コストシュミレーションによる技術改良の方向付け—山菜シオデを例に. 筑波大農林研報 9 : 47-62.
  - 16) 木村光雄:1938. 薯蕷大和黒皮種の栽培に関する研究 農業および園芸13 : 1803-1812, 2011-2017.
  - 17) 甲村浩之:1995. アスパラガス優良株の多芽集塊, 不定胚形成を利用した効率的苗生産. BRAIN テクノニュース49 : 23-26.
  - 18) ——・井本征史・平尾晃:1998. ヤマノイモ多収系統‘広系1号’の育成. 広島農試報66 : 25-31.
  - 19) ——:2000. アスパラガスの雄株系統‘Y6’の育成と栽培特性. 今月の農業44(1) : 99-105.
  - 20) ——・栗本省二・津村王則・光永暹:2001. ツクネイモの芋の肥大に及ぼす気象条件の影響. 近畿中国農研102 : 3-7.
  - 21) Levin, R., R. Stav, Y. Alper and A. A. Watad :1996. *In vitro* multiplication in liquid culture of *Syngonium contaminated with Bacillus spp. and Rathayibacter tritici*. Plant Cell Tiss. Org. Cult.45 : 277-280.
  - 22) 牧野富太郎:1961. 牧野新日本植物図鑑 北隆館 : 865.
  - 23) Matsumoto, T., A. Sakai, C. Takahashi and K. Yamada :1995 a. Cryopreservation of *in vitro* grown apical meristems of wasabi (*Wasabia japonica*) by encapsulation-vitrification method. Cryo-Letters. 16 :189-196.
  - 24) ——, —— and K. Yamada :1995 b. Cryopreservation of *in vitro* grown apical meristems of Lily (*Lilium japonicum*) by vitrification. Plant Cell Tiss. Org.Cult.41 : 231-241.
  - 25) 皆川裕一:1993 アスパラガスの品種に関する諸問題(3) 農業及び園芸68(9) : 1011-1015.
  - 26) Miyashita, Y., Y. Kitaya, T. Kozai and T. Kimura :1995. Effects of red and far-red light on the growth and morphology of potato plantlets *in vitro*. Using light emitting diode as a light source for micropropagation. Acta Horti. 393 : 189-194.
  - 27) 西貞夫:1988. 種苗増殖の進展と問題点—野菜を中心として. 農業及び園芸63(1) : 65-72.
  - 28) Nagasawa, A. and J. J. Finer :1989. Plant regeneration from embryogenic suspension culture of Chinese yam (*Dioscorea opposita* Thumb.) Plant Sci.60 : 263-271.
  - 29) Nishizawa, Y. and T. Hibi :1991. Rice chitinase gene : cDNA cloning and stress-induced expression. Plant Sci. 76 : 211-218.
  - 30) 沖森當・笈三男・長谷川繁樹・谷口義彦:1985. 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の育成. 広島農試報 48 : 75-79.
  - 31) 奥野耕太郎・久島繁・石塚皓造:1994. 地域農業振興への組織培養技術の利用について3. 生産コストの解析の例. 筑波大農林研報 7 : 37-56.
  - 32) 大澤勝次・田村賢治:1992. 農協・自治体によるアスパラガス培養苗の供給 事例バイオテク農業 花・野菜・果物地域社会計画センター編:57-76.
  - 33) 酒井昭:1987. 植物の茎頂の凍結保存, 凍結保存—動物・植物・微生物 (酒井昭編著), 朝倉書店, 東京:200-206.
  - 34) ——:1991. 植物培養細胞, 組織, 胚の超低温保存に関する研究の現状と動向. 農業及び園芸66(11) : 1223-1229.
  - 35) Sakai, A., S. Kobayashi and I. Oiyama :1991. Survival by vitrification of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* var. *brasiliensis* Tanaka). J. Plant Physiol.137 : 465-470.
  - 36) 佐藤一郎:1986. ナガイモ=植物としての特性. 農業技術体系. 基礎編:21-56.
  - 37) 薛惠民・荒木肇・八畝利郎:1991. ニンニクにおける embryogenic callus 形成と植物体再生の品種間差

- 異. 植物組織培養 8(3) : 166 - 170.
- 38) ———・———・石嶺・八鍬利郎 : 1991. ニンニクの底盤と花床部由来カルスにおける不定胚形成と植物体再生. 園学雑 60(3) : 627 - 634.
- 39) Tanaka, R. and H. Ikeda : 1983. Perennial maintainance of annual *Haplopappus gracilis* ( $2n=4$ ) by shoot tip cloning. Jpn. J. Genet. 58 : 65-70.
- 40) 田中道男・長江嗣朗・高村武二郎・草薙直子・氏家正徳・五井正憲 : 1996. 数種園芸植物の種苗生産におけるフィルム培養システムの有効性と実用性. 植物工場学会誌 8(4) : 280 - 285.
- 41) Taniguchi, K., R. Tanaka, N. Ashitani and H. Miyagawa : 1988. Freeze preservation of tissue-cultured shoot primordia of the annual *Haplopappus gracilis* ( $2n=4$ ) Jpn. J. Genet. 63 : 267-272.
- 42) 田代洋丞 : 1984. ワケギの起源に関する細胞遺伝学的研究. 佐賀大農 56 : 1 - 63.
- 43) ———・宮崎貞巳 : 1985. 7. クローン増殖技術と変異の発生. 植物クローン増殖の実際技術 田中隆荘編 CMC社 : 66 - 76.
- 44) 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的利用. 農業及び園芸 63(2) : 271 - 273.
- 45) Withers L. A. : 1989. Cryopreservation and storage of germplasm. Plant cell culture. A practical approach. R. A. Dixon ed. IRL Press : 169-190.
- 46) 山辺学・吉秋斎 : 1990. ツクネイモ (加賀丸芋) のウイルスフリー化と大量増殖. 農耕と園芸別バイオホルテイ 6 : 91 - 93.
- 47) 八鍬利郎・原田隆・笠井登・荒木肇・奥山功 : 1981. ヤマノイモ属 (*Dioscorea*) の性状に関する基礎的研究 第1報 ながいも雌株に着生した花, 果実および種子の構造と発芽過程. 北大農邦文紀12(4) : 271 - 279.
- 48) 柳田雅芳 : 1988. ナガイモの増殖技術. 農業及び園芸63(1) : 155 - 158.
- 49) Yang, H. J. and W. J. Clore : 1973. Rapid vegetative propagation of asparagus through lateral bud culture, HortScience 8 : 141 - 143.

## 摘 要

本研究は栄養繁殖性作物であるアスパラガス、ヤマノイモ、ワケギの組織培養系を利用したクローン苗の大量生産（マイクロプロパゲーション）システムに関する方法を開発し、その特性を調査したものである。特に、多芽体・不定胚誘導と超低温保存法を試みた。本論文は5章から構成されている。

### 序 論

栄養繁殖性とされる作物は、一般には種子採取が可能であることが多い。しかし、種子苗は形質のばらつきが大きく、栽培管理や収量・品質上の問題が生じることが多い。一方、栄養繁殖による株分けや芋の分割による種苗生産は、種子繁殖による方法と比べて極めて効率が低い。そのため、農家が苗を購入するために投資する種苗費が高くなり、経営が安定しない等の問題も生じている。そこで、組織培養を利用した種苗増殖法（マイクロプロパゲーション）が開発され、農業利用のための応用が試みられてきたが、増殖効率が低く、生産コストも高くつくなど実用化に至った例は少ない。そこで本論文では、アスパラガス、ヤマノイモ、ワケギの低コストで効率のよい培養苗生産に必要な保存法や培養法等のシステム開発を行った。

### 第1章

アスパラガスは、食生活の欧米化と健康指向により需要が伸び、国内の西南暖地地域でも栽培面積が急増している。育種の推進上、遺伝子資源の保存が急務であり、若茎（食用部）の茎頂組織から誘導した多芽集塊の超低温保存法を検討した。多芽集塊は、アンシミドールを含む培地を用い、回転培養により誘導・継代維持できた。しかし、継代には培地準備、移植、培養等に労力や経費がかかる。そこで多芽集塊を液体窒素等に長期間保存する方法を検討した。従来のプログラムフリーザーや $-30^{\circ}\text{C}$ 冷蔵庫を予備凍結に用いる二段階保存法と高濃度の保存溶液に一定時間浸漬処理した後、液体窒素に直接浸漬するガラス化法（一段階法）を比較した。その結果、ガラス化法のみで保存後の多芽集塊の高い生存率・植物体再生率が得られた。保存溶液には酒井ら（1990）の開発した植物ガラス化液（PVS2）を用い、 $25^{\circ}\text{C}$ で45分間ま

たは $0^{\circ}\text{C}$ で120分間、浸漬処理後に液体窒素に保存すると保存後の生存率・再生率が従来の10%から80%に高まった。また、多芽集塊の茎頂部分は保存による障害が殆ど無いことを蛍光染色により観察した。この結果、アスパラガス優良株の培養組織が長期間保存可能であることが明らかになった。液体培養組織の効率的な超低温保存法は世界でも例がなく、同技術は今後の遺伝子資源の保存に有効な方法であると示唆された。また、不定胚形成カルス（Embryogenic callus, EC）や不定胚の超低温保存条件も明らかにした。

### 第2章

アスパラガスは雌雄異株の作物である。収量や品質が個体間で大きくばらつき、雌株は種子が散布されることによる雑草化の問題があるため、優良な雄株だけを栽培する利点は高い。これまで、マイクロプロパゲーション法として腋芽培養法が開発されてきたが、培養期間が約3ヶ月と長く、再生植物が貯蔵根を形成しにくいことから実用化が困難であった。そこで、不定胚による増殖法について検討した。ニンジンの培養法に従い、カルスの観察に努めた結果、1987年に実生組織からのECの誘導と植物体再生に成功した。その後、圃場選抜した成株の茎頂組織からのEC誘導にも成功した。しかし、EC誘導の期間が長く効率も低い等の問題があり、多芽集塊からのEC誘導法を確立した。多芽集塊は、1) 多くの品種・個体から容易に誘導でき、2) EC誘導の際に殺菌処理が不要で、3) EC誘導材料を必要時に大量に供用でき、4) EC誘導率が安定している等の長所が認められた。一方、不定胚形成と不定胚から植物体を再生する過程の改良も行った。その結果、浸透圧を高めた培地で不定胚を成熟させることにより発芽率を高め、通気培養・炭酸ガス施用により、培養植物の健全化と生育促進により馴化率を高めた。さらに、次亜塩素酸ナトリウム溶液を培地に添加する簡易殺菌培養法を開発し、培地作成時の高圧滅菌や無菌室での培養操作を省略し、作業性・経済性を大きく向上させた。この結果、培養容器の大型化、フッ素樹脂フィルム容器等の新素材の活用により、培養20~30日で馴化できる培養苗の生産が実現できた。

### 第3章

アスパラガスの培養苗生産を実用化するためには、培養苗の特性を解明し、これらの栽培が従来の種子品種と比較して有利である点を検証する必要がある。しかし、培養苗を圃場で栽培した際の特性解析に関する報告は殆どなかった。そこで、不定胚由来の培養苗を農業技術センター圃場に定植し、種子由来の品種と特性を比較した。その結果、雄株由来の培養株には雌株が混在せず、母茎を一斉立茎する際の茎の直径もよく揃った。種子品種では収穫する若茎の太さが揃わず、その原因は雌株が混在するためであると推測できた。若茎の品質では、頭部のしまり、茎色等が種子品種よりよく揃っていた。収量では、3年間の調査において、培養株の株当りの収穫量や本数の変動係数が20%以下であった。このため、培養苗では立茎や除草等の栽培管理や品質・収量に関係する形質がよく揃い、高収益を目的とした栽培に有効であることを明らかにした。その後、1993年に現地圃場の2万株中から、品質と収量の優れた数株を選抜し、これらの培養苗を増殖、定植後に特性検定を実施した。その結果、基準品種より収量が1.4倍、秀品率が30%増加し、収益性も2倍近い雄株系統‘Y6’（登録名‘グリーンフレツチェ’）を選抜・育成した。

### 第4章

ヤマノイモ（ツクネイモ）は栄養体である芋を分割して増殖させる作物である。とろろのきめの細かさや粘りの強さ等の品質で市場や菓子加工での評価が高い。主に水田の輪換作物として栽培され、近年は減反強化により作付けが急増している。しかし、栽培面積10a当りの種苗コストは約20万円と高く、在来系統では増殖率が重量で3~5倍と低いため、優良系統の選抜とマイクロプロパゲーションを利用した早期増殖技術の開発が望まれていた。そこでウイルスフリー株や多収系統‘広系1号’（増殖量8~10倍）を育成した。これらの未熟葉をベンジルアデニン（BA） $8.9\mu\text{M}$ を添加した培地で培養することにより多芽体を誘導した。多芽体は、ナフタレン酢酸（NAA）、BAとショ糖6%を添加した培地に移植すると植物体に再生し、約6ヶ月後に、径3~7mmのむかご大の小芋（培養むかご）を多数形成した。本法は従来法に比べて植物体再生率が高く、形成したむかごの利用により、培養苗の順化過程を省略できた。また、むかごは休眠打破後、セル成型育苗箱に播種し、発芽後に圃場に定植し半年間の養成で30~50gに肥大した。むかごから養成した

種芋は、萌芽が早く、肥大率も高いため、培養むかごを用いた新生産体系の構築に応用できる可能性を示した。

### 第5章

ワケギは、近年、ウイルス病汚染による収量・品質の低下が顕在化し、茎頂培養によるウイルスフリー株の利用が定着している。原種としてフリー株を保存するには、ウイルスを媒介するアブラムシ防除のため、隔離網室で栽培しなければならないが、試験管内で保存ができれば省力化が可能である。第1章で多芽集塊の超低温保存法を開発したので、ワケギのウイルスフリー株茎頂についても同法の適用を試みた。5月に種球を掘上げて殺菌し、茎頂培養を行った。これを4℃の低温で7日間培養し、茎頂を取り出して0.4Mの高濃度ショ糖液に1日処理後にガラス化液（PVS2）に浸漬することにより、超低温保存後の植物体再生率を10%から90%まで高めることができた。ワケギの茎頂では、ガラス化法のみで植物体の高い再生率が得られたが、同法は他のワケギ系統へも適用でき、供試5系統は50~80%の再生率が得られた。これらの保存はいずれも-152℃フリーザーで行い、保存1年後でも植物体の再生率は変わらなかった。保存茎頂から多芽体を直接誘導し、苗生産を効率化する条件も解明しており、将来的に培養苗の生産体制が整えば実用化が可能と考えられる。

### 総合考察

栄養繁殖性作物であるアスパラガス、ヤマノイモ、ワケギの培養苗生産法を開発した。アスパラガスでは、多芽集塊のガラス化法による超低温保存法、また、多芽集塊からECを誘導し、不定胚形成による優良雄株の増殖法を開発した。さらに、培養苗の特性を解析し、栽培上の有利性を検証した。ヤマノイモでは、ウイルスフリー株の未熟葉からの多芽体の誘導と多芽体の常温保存条件を検討し、試験管内で培養むかごを周年生産する方法を開発した。ワケギでは、ウイルスフリー株茎頂の超低温保存条件を検討し、ウイルスフリー株原種の長期保存と多芽体形成による増殖を可能にした。

栄養繁殖性の作物では、特に野菜類でのマイクロプロパゲーションの実用化が遅れている現状にあるが、本研究により従来より効率的な培養苗の生産が可能となり、実用化に向けて大きく前進できると思われる。今後、さらなる培養系の改良や培養組織の保存などの個別技術のシステム化に努めるとともに、育種理論に基づいて組織培養を活用し、収益性の高い優良品種を育成することが課題と考えられる。

## Development of nursery plant production system by tissue culture on vegetative crops Asparagus, Chinese yam (*Tsukuneimo*) and Japanese shallot (*Wakegi*)

Hiroyuki KOHMURA

### Summary

Effective nursery plant production systems by tissue culture on vegetative crops, asparagus (*Asparagus officinalis* L.), Chinese yam (*Dioscorea opposita* Thunb.) and Japanese shallot (*Allium wakegi* Araki.) were established.

#### 1. Development of cryopreservation method of *in vitro* cultured tissues of asparagus.

A culture line of asparagus forming green bulbous structures consisting of numerous multiple bud clusters designated "bud clusters" was induced from a meristem culture of asparagus. Small cubic segments (2 mm) cut from bud clusters were cryopreserved using three different cryogenic protocols. Only vitrification produced very high levels of shoot formation after cooling to  $-196^{\circ}\text{C}$ . Segments were treated with a vitrification solution (PVS 2) at  $25^{\circ}\text{C}$  for 45 min or at  $0^{\circ}\text{C}$  for 120 min prior to a direct plunge into liquid nitrogen. After rapid warming, the segments were expelled into Murashige and Skoog medium (MS-medium) containing 1.2M sucrose for 10 min and then plated on agar shoot outgrowth medium. The average rate of shoot formation of vitrified segments producing normal shoots was near 90% without any preculture and/or cold-acclimation treatment. Revived segments resumed growth within 3 days and developed about three shoots per segment. *In vitro*-cultured bud clusters appear promising as material for cryopreserving asparagus germplasm. Subcultured embryogenic calli and somatic embryos also cryopreserved efficiently by above technique. Thus these cryopreservation method is effective for developing micropropagation system or breeding asparagus.

#### 2. Development of micropropagation system of asparagus.

A micropropagation system through somatic embryogenesis was established on asparagus. Embryogenic calli were induced from a segment of young shoot on MS medium supplemented with  $10^{-5}\text{M}$  2,4-D. Somatic embryos were formed on subcultured calli on MS hormone free medium. The plantlets regenerated from them had white vigorous root, so they easily grew in greenhouse normally. In addition, an effective micropropagation system of superior plants selected in the field was established. It was involving somatic embryogenesis and induction of bud clusters. Bud clusters were induced from an excised shoot apex cultured in MS liquid medium supplemented with 10 mg/l ancymidol three months after inoculation. Culture tubes on a revolving drum were rotated vertically at 2 rpm at  $22^{\circ}\text{C}$  under continuous illumination at  $80\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ . The bud clusters were routinely maintained over the course of 2 years by their subdivision into small segments and subculturing them in the same fresh medium at monthly intervals. Calli did not form during culture period, and bud clusters exhibited genetic stability. This method for induction of bud clusters was universally applicable to other asparagus cultivars. In the course of 30 to 60 days, embryogenic calli were induced from 10–20% of segments excised from bud clusters and cultured on MS solid medium supplemented with  $10^{-5}\text{M}$  2,4-D. The embryogenic calli subcultured biweekly on this medium yielded embryogenic cell lines, which apparently remained genetically stable for more than one year. Somatic embryos were formed frequently on bud clusters that had been subcultured for more than 3 to 6 months. From these embryos, embryogenic calli were induced at a high frequency (more than 30%) on MS solid medium, supplemented with  $10^{-5}\text{M}$  2,4-D. No albino or abnormally dwarf plants were detected among approximately 2,000 plants regenerated from somatic embryos. Chromosome numbers ( $2n=30$ ) did not vary among the 15 randomly sampled regenerated plants. These results suggest that this micropropagation system can be effectively applied to the cultivation of asparagus.

In order to improve the development of somatic embryos, liquid suspension culture of embryogenic calli were examined. Synchronized globular embryos were obtained after filtration with mesh from 2 weeks liquid suspension culture. Globular embryo developed to bipolar one on MS medium supplemented with 2.5% (w/v) agar. The yield of the bipolar embryos

was 300 per culture bottle. The rate of plant regeneration with vigorous white root from bipolar embryos was about 80%.

In order to improve the plant growth and the rate of acclimatization of short-term culture (30days) plantlets regenerated from somatic embryos, ventilation and CO<sub>2</sub> enrichment culture method was developed. Scanning electron microscope revealed that the presence of much structured epicuticular wax on the surface of plantlets cultured under ventilation and that the rate of closed stomata was much higher on plantlets cultured under ventilation than those of without it. After the short-term culture (30days), the fresh weight of plantlet grown with CO<sub>2</sub> enrichment (1500ppm) was 1.4 times greater than that of plantlets without one. The growth of the plantlets after transplanting to the soil was greater for plantlets that received the CO<sub>2</sub> enrichment treatment *in vitro* than it was for plantlets that didn't receive the treatment. *In vitro* plant regeneration method using disinfectant incorporated medium and film culture vessel was also developed. In micropropagation, much labor and time are necessary for preparing the medium and for transplanting the somatic embryos into it under aseptic condition. With the new culture method, sodium hypochlorite (active chlorine 5–10ppm) was incorporated into plant regeneration media (1/2 MS + 2 % sucrose) and embryos were transplanted in open air condition. The concentration of these disinfectants did not damage the plantlets and suppress the contamination. This method was also available for plant regeneration using novel fluorocarbon polymer film culture vessel (PCP).

### 3. Characteristics of micropropagated clonal plants derived from somatic embryos of asparagus

Micropropagated clonal plants were derived through somatic embryogenesis (from young spears in adult plants or nodal segments of seedlings) of asparagus (cv 'Hiroshima Green' (2 n=30), 'Mary Washington 500W'). They were cultivated by the method maintaining mother stalks in the field of HPARC for 4 years (1990–1994) and their growth characteristics and yields were compared with those of 4 cultivars propagated by seeds or crown division. In micropropagated plants, the flower types were identical with the parent and flowering occurred simultaneously. The quality of young spears, such as head shape and colors resembled the parent. Spear size and shoot diameter of mother stalks, yield and other growth characteristics of them were more uniform than those of seed propagated cultivars. In the triploid clone of 'Hiroshima Green', the high Brix content of spears and resistance to disease were maintained through propagation by somatic embryogenesis. Thus, micropropagation of superior asparagus clones through somatic embryogenesis is an economical means of producing uniform spears of high quality and yield.

In response to the stabilization of micropropagation system and the demonstration of clonal plants, the elite male plants selected in local field and micropropagated. After field productivity test, the Y 6 line was selected and named 'GreenFrecce'. In open field cultivation, the yield per plant was 1380g (17t/ha) and number of standardized spears was 81. These values were much higher than for control varieties 'MW500W', 'Welcome'. However, the weight per spear was somewhat reduced (17 g.). The yield of marketable, A-Class spears in summer is much higher than for other cultivars.

### 4. Development of new cultivation method of 'Tsukuneimo' Chinese yam using micropropagated tubers.

A micropropagation system of 'Tsukuneimo' Chinese yam was developed. Immature leaves collected from virus-free plants growing in the greenhouse were cultured on MS medium supplemented with 8.9µM benzyladenine (BA), 3% (w/v) sucrose, 0.8% (w/v) agar. After 2–3 months, multiple buds that was clumps of green-colored bulbous structures including adventitious buds and meristematic regions of 2–3 mm in diameter were formed on immature leaves. Transplanting the pieces of multiple buds to fresh MS medium supplemented with 0.11µM α-naphthalene acetic acid (NAA), 0.89µM benzyladenine and 6% (w/v) sucrose was effective to induce shoot formation, leading to plantlets. After 6 months, a large number of microtubers, about 3–7 mm diameter, were obtained.

New cultivation method was developed after improvement of tissue culture method and applied to the new variety 'Hirokei No. 1'. The plantlets from microtubers were transplanted to the field in May and harvested in October. The weight of tuber was 26 to 40g and that was the almost same quantity of regular seed tubers.

### 5. Cryopreservation of apical meristems of Japanese shallot 'wakegi' and efficient micropropagation.

Apical meristems excised from harvested bulbs of Japanese shallot were successfully cryopreserved by vitrification with

subsequent high plant regeneration. Apical meristems (1 mm in length) were cultured on solidified MS-medium with 0.8% sucrose at 4°C for 7 days to obtain cold-hardened meristems. Meristems were then precultured on MS medium supplemented with 0.4M sucrose at 4°C for 1 day. Cold-hardened and precultured meristems were treated with a highly concentrated cryoprotective solution (PVS 2) at 25°C for 45 min before immersion into liquid nitrogen or transfer to a deep-freezer held at -152°C. After rapid rewarming, meristems were expelled into liquid MS medium containing 1.2 M sucrose for 10 min and then plated on agar recovery medium. Cryopreserved meristems resumed growth within 2 days and developed directly into plantlets. The average rate of shoot formation about 30 days after plating was 80%. This vitrification procedure was successfully applied to six other cultivars of *Allium wakegi*. Our result also demonstrated the feasibility of conserving vitrified meristems in a deep-freezer at -152°C for at least 3 months without decrease in plant regeneration. Conclusively the micropropagation system through multiple shoot from cryopreserved apical meristems was developed.



## 謝 辞

本報告は広島大学総合科学部に提出した学位論文の再録である。本報告の作成にあたり、同学部教授・桜井直樹博士から終始懇切でいねいなお指導、ご助言を賜りました。また、同大学理学部植物遺伝子実験施設教授・近藤勝彦博士、生物生産学部教授・藤田耕之輔博士および総合科学部教授・堀越孝雄博士には有益なお指導・ご助言とご校閲を賜りました。ここに深く感謝いたします。

本研究の遂行にあたり、広島大学総合科学部教授・故倉石晋博士には、組織培養全般の研究方法について懇切でいねいなお指導を賜りました。北海道大学理学部名誉教授・酒井昭博士には、培養組織の超低温保存技術の開発において、新手法による保存方法のご指導と適切なご助言を賜りました。北海道大学農学部教授・八鍬利郎博士と同教授原田隆博士には、アスパラガス・ヤマノイモの組織培養等を利用した育種研究において、平成3年7月～12月にかけて同大学に内地留学以来、現場に密着しつつも新技術の開発にいどむ姿勢をお教えいただき、かつ適切なご助言・ご指導も賜りました。香川大学農学部教授の田中道男博士および京都教育大学教育学部教授の梁川正博士には、培養苗生産を効率化するための情報や新素材のご提供をいただき、実験方法についても適切なご助言・ご指導を賜りました。新潟大学農学部付属農場助教授・荒木肇博士と岩手大学教育学部助手・金沢俊成博士には、組織培養の基礎から応用まで、議論を共にしながら研究を進め、ご助言・ご指導もいただきました。ここに深く感謝する次第です。

元農林水産省野菜茶業試験場の吉川宏昭博士、農業生物資源研究所の大川安信博士には、実験計画や論文作成にあたり、適切なご助言とご指導を賜りました。また、農業環境研究センターの浦上敦子博士には、アスパラガスの組織培養を利用した育種研究のご指導・ご助言を賜りました。ここに深く感謝申し上げます。

元広島県立農業技術センターの上本哲氏、井本征史氏、吉田隆徳氏を初め、前重道雅博士、西田和男氏、大友譲二氏には、研究当初からの適切なご指導、ご助言と励ましのお言葉を賜りました。また、同センター酒井泰文博士、土屋隆生氏、古谷博氏、池田好伸氏、長久逸氏、重本直樹氏、伊藤悌右氏および小迫高氏には、本研究遂行の便宜とご指導、ご協力を賜りました。さらに、業務課の故舛岡宏毅氏、河野博行氏、福永やす子氏、桧山大行氏、平田由紀氏、和田淳氏、舛永昌子氏を初め、当セン

ター職員諸氏の皆様にご理解とご協力をいただきました。ここに深く感謝いたします。

なお、本報告は以下の1)～5)の関係論文を中心に6)以下の参考論文を含めてとりまとめた。

- 1) Kohmura, H., A. Sakai, S. Chokyu and T. Yakuwa. : 1992. Cryopreservation of *in vitro* cultured multiple bud clusters of asparagus (*Asparagus officinalis* L. cv Hiroshima Green (2n=30) by the techniques of vitrification. *Plant Cell Rep.* 11 : 433-437.
- 2) —, S. Chokyu and T. Harada : 1994. An effective micropropagation system using embryogenic calli induced from bud clusters in *Asparagus officinalis* L. *Jap. J. Hort. Sci.* 63(1) : 51-59.
- 3) — T. Ito, N. Shigemoto, M. Imoto and H. Yoshikawa : 1996. Comparison of growth, yield, and flowering characteristics between micropropagated asparagus clones derived by somatic embryogenesis and seed propagated progenies. *Jap. J. Hort. Sci.* 65(2) : 311-319.
- 4) — H. Araki and M. Imoto : 1995. Micropropagation of 'Yamatoimo' Chinese yam (*Dioscorea opposita*) from immature leaves. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 40 : 271-276.
- 5) —, Y. Ikeda and A. Sakai : 1994. Cryopreservation of apical meristems of Japanese shallot (*Allium wakegi* A.) by vitrification and subsequent high plant regeneration. *Cryo-Letters* 15 : 289-294.
- 6) —, S. Chokyu and T. Harada : 1996. Application of a new micropropagation system involving induction of bud clusters and somatic embryogenesis in asparagus. *Acta Hort.* 415 : 119-127.
- 7) —, T. Yanagawa and M. Tanaka : 1999. An efficient micropropagation system using disinfectant incorporated medium and film culture vessel for *in vitro* plant regeneration of asparagus. *Acta Hort.* 479 : 373-380.
- 8) 甲村浩之・長久逸・池田好伸 : 1990 a. 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53:43-50.
- 9) — . — . — : 1990 b. 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. 広島農試報53:51-61.
- 10) ————:1991. アスパラガスの不定胚形成による大量増殖. 第3報 圃場栽培株若茎からの不定胚形成と植物体再生. 広島農試報54:33-40.
- 11) ————・井本征史:1994. アスパラガスの不定胚形成による簡易で効率的な苗生産法. 広島農技セ研報60:55-63
- 12) ————:1996. 通気処理及び炭酸ガス施用がアスパラガス培養苗の生育・馴化に及ぼす効果. 広島農技セ研報64:11-22.

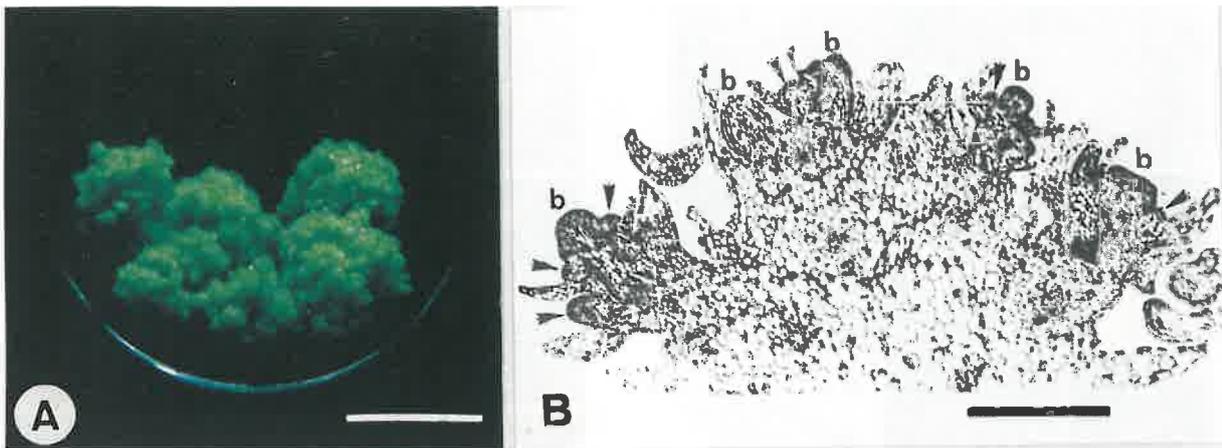


図1-1 A. アスパラガスの多芽集塊：若茎茎頂組織から誘導した緑色球状の集塊組織  
初代培養から，継代培養を2回行った3ヶ月後の状態バーの長さ：1 cm

- B. 多芽集塊断面の垂直切片  
幾らかの新しい茎頂ドーム組織 (B) と腋芽 (矢印) が分裂組織表面に観察される  
バーの長さ：400 $\mu$ m

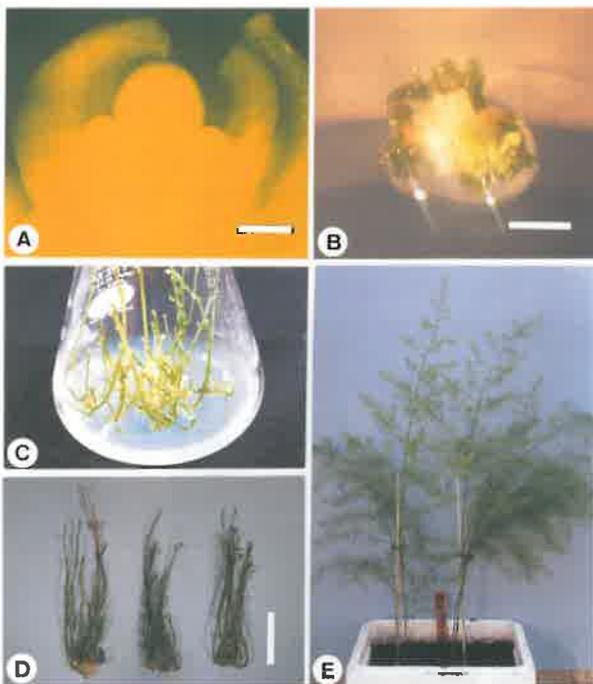


図1-4 超低温保存した多芽集塊小切片からの苗条形成  
A：培地置床3日目の小切片の0.5%フルオルセインジアセテート(FDA)染色 蛍光顕微鏡によりUV光源で観察 バー：100 $\mu$ m  
B：培地置床5日目の小切片からの再生  
バー：1 mm  
C：容器内での小切片からの苗条の伸長，培養30日後  
D：小切片から形成した苗条，培養約50日目  
バー：1 cm  
E：発根後，馴化養成した再生植物

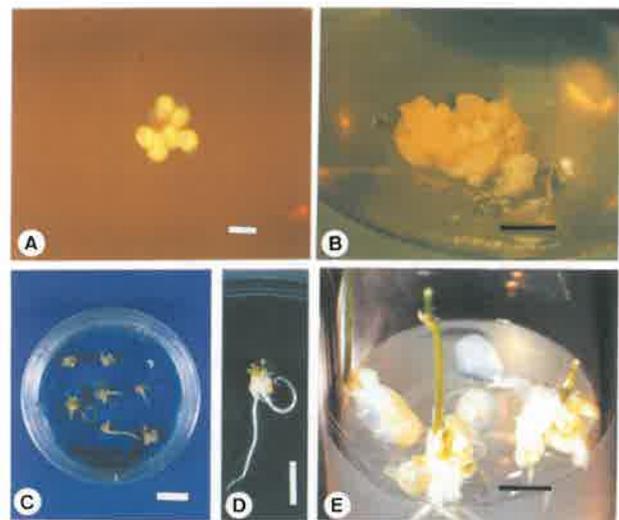


図1-7 ECおよび不定胚の超低温保存とその再生

- A：ガラス化保存後のECの生存(培養2日目)FDAとフェノサフランニンによる二重染色後，蛍光顕微鏡で観察 バー：0.2mm  
B：寒天培地で増殖中のガラス化保存後のEC  
バー：3 mm  
C：ガラス化保存後の不定胚からの再生  
バー：1 cm  
D：再生植物 バー：1 cm  
E：アルギン酸ビーズ乾燥法による不定胚の超低温保存と再生植物 バー：5 mm

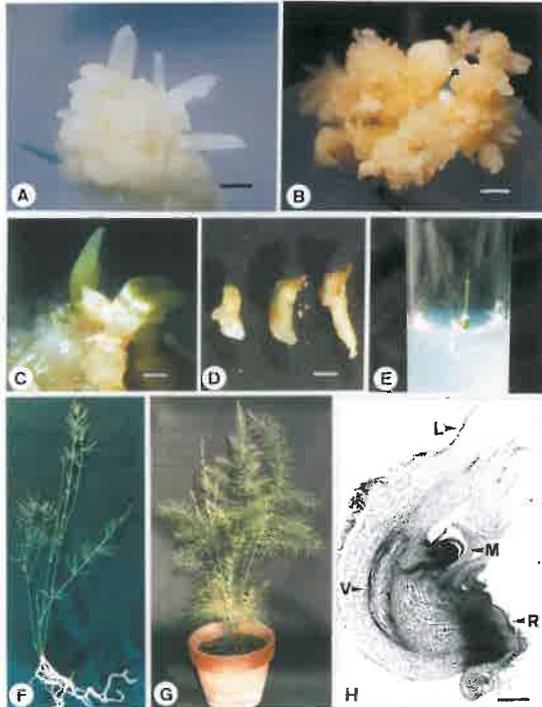


図2-1 アスパラガス実生組織からの不定胚形成カルス誘導と植物体再生

- A: 培養35日後に $10^{-5}$ M 2,4-D添加培地で形成した不定胚様の放射状組織集塊 パー:1mm  
 B: 不定胚形成カルス(EC, 培養90日目) パー:1mm  
 C: 緑色の不定胚(ECを2,4-D無添加培地に移植して形成) パー:1mm  
 D: 不定胚の発達の様子 パー:1mm,  
 E: 再生中の幼植物  
 F: 健全な再生植物(白色貯蔵根を形成, 培養45日後),  
 G: 順化鉢上げ後の植物体  
 H: 不定胚の組織切片(M:茎頂, R:根, L:幼葉, V:維管束 パー:0.3mm)

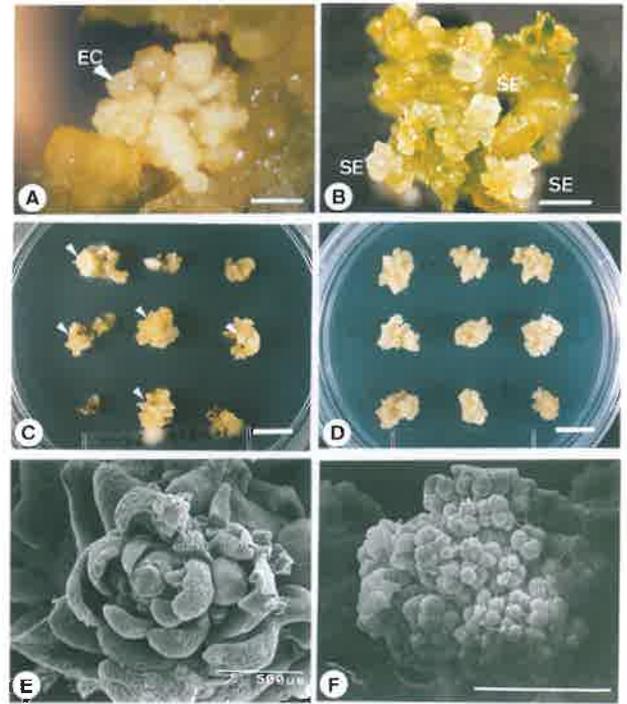


図2-2 アスパラガスの多芽集塊を用いたEC誘導

- A: 多芽集塊切片上でのEC誘導 パー:1mm  
 B: アンシミドール10mg/l添加のMS培地で継代培養後6か月後に多芽集塊上に形成した球状胚の集塊 パー:2mm(品種:ヒロシマガリーン)  
 C: 多芽集塊からのEC誘導状況 矢印はEC(品種:Y6) パー:10mm  
 D: 継代培養中の不定胚形成能をもつ細胞系統(品種:Y6) パー:10mm  
 E: 多芽集塊表面の走査電子顕微鏡観察 パー:500 $\mu$ m  
 F: EC表面の走査電子顕微鏡観察 パー:200 $\mu$ m

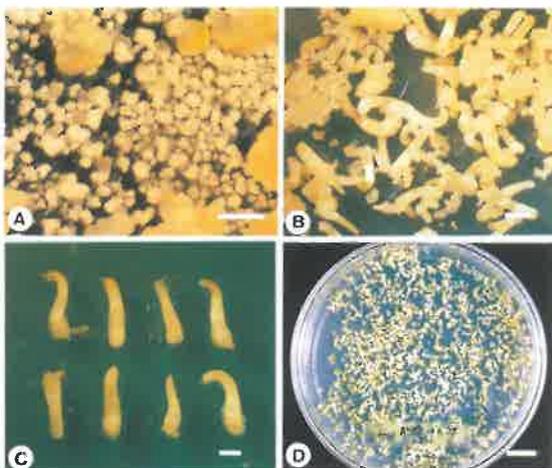


図2-5 液体振盪培養と不定胚の成熟

- A: 液体振盪培養直後の球状胚の集塊 パー:1mm  
 B: 成熟培地上の不定胚の集塊(培養1か月後) パー:1mm  
 C: 液体振盪培養中に $10^{-5}$ M ABAを添加し, 成熟培地で培養1ヶ月後の不定胚 パー:1mm  
 D: 液体振盪培養後, 成熟培地(MS+2.5%寒天)で培養1か月後の不定胚 パー:1cm

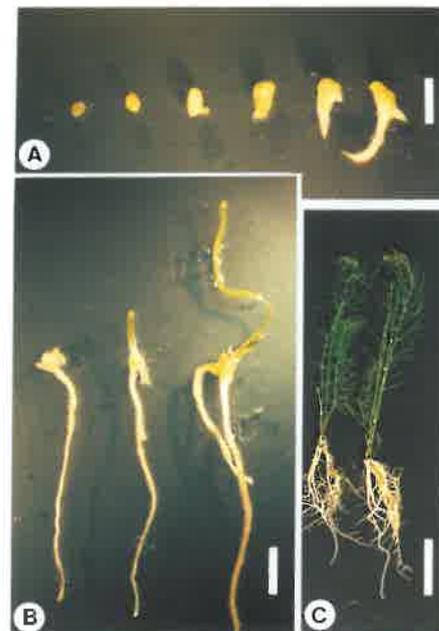


図2-6 不定胚の発達と再生植物供試系統「Y6」  
 パー: A: 2mm, B: 1cm, C: 2cm

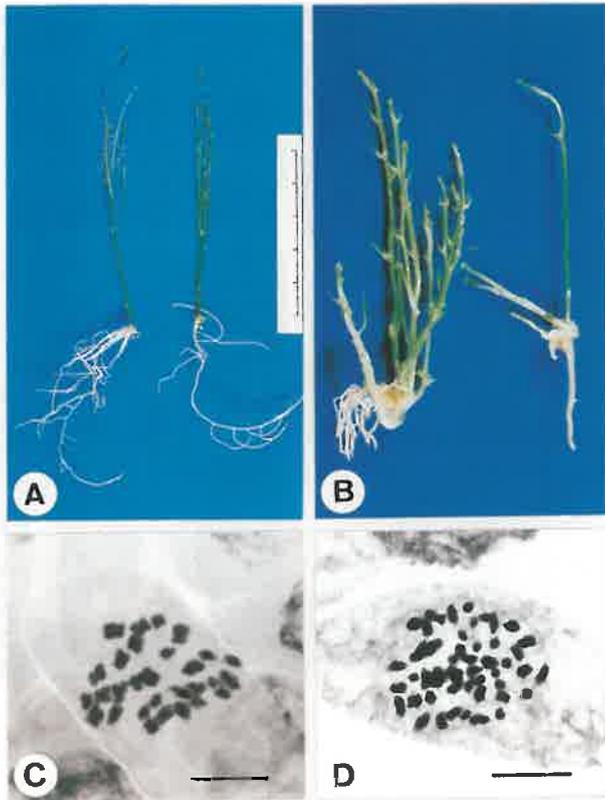


図2-7 EC系統による変異株の発生と除去  
 A: 正常な生育を示す不定胚由来再生株 (系統: HG17, 3X)  
 B: 水浸状の苗条や吸収根の形成が少ない等の異常を示す不定胚由来株  
 C: 正常株の染色体(系統: HG17, 3X), バー: 5 $\mu$ m  
 D: 形態異常株の染色体(メリーワシントン500W由来株, 6-7X), バー: 5 $\mu$ m

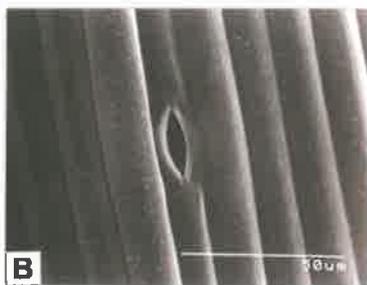
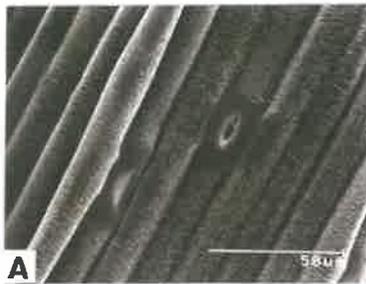


図2-9 通気処理が表皮表面のエピクチクラワックス量に及ぼす影響の走査電子顕微鏡観察  
 A: 通気処理, B: 対照  
 バーの長さ: 50 $\mu$ m 供試系統: HG17

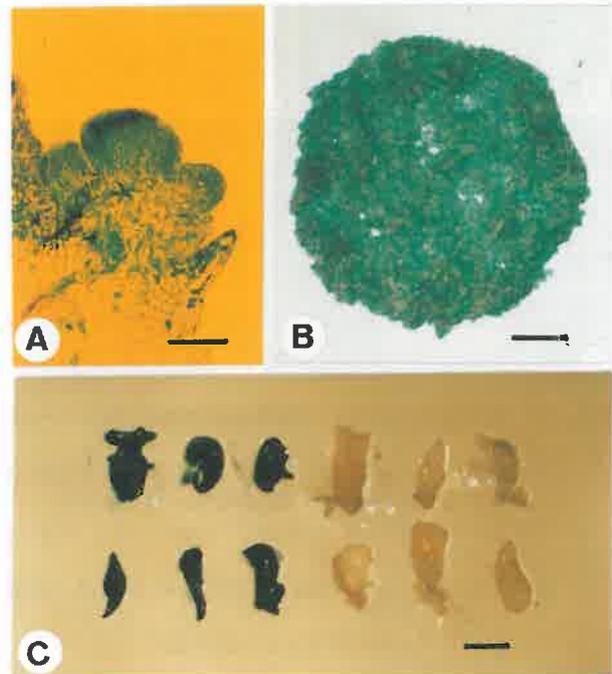


図2-8 形質転換植物を用いた多芽集塊・不定胚培養系の遺伝的安定性の観察  
 供試系統: HG17T 1, 青色が導入した GUS 遺伝子の発現を示す。  
 A: 多芽集塊の切片 バー: 100 $\mu$ m  
 B: 多芽集塊から誘導したEC, バー: 2 mm  
 C: 同不定胚 (右側の白色のものは対照の非形質転換体) バー: 1 mm

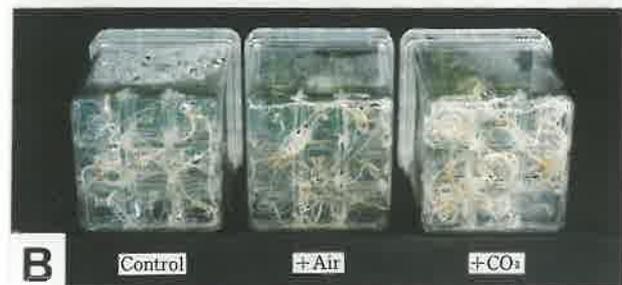


図2-11 炭酸ガス施用が不定胚からの植物体再生および発根に及ぼす影響  
 培養26日後 (供試系統: HG17)  
 control: 対照: 通気処理無し  
 +Air: 通気処理, +CO<sub>2</sub>: 通気+炭酸ガス施用

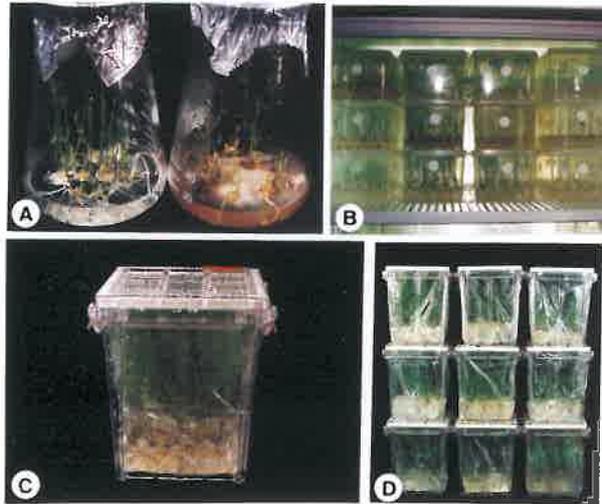


図2-12 簡易殺菌培養法と培養容器の大型化, 作業の効率化

- A: 培地への次亜塩素酸ナトリウムの加用が不定胚からの植物体再生および雑菌発生に及ぼす影響  
左: 次亜塩素酸ナトリウム加用(5 ppm), 右: 対照(無添加)
  - B: 大型容器による苗生産の効率化(1容器72~98本の植物体養成)
  - C: PCPフィルム容器による苗生産,
  - D: 大量生産
- ※B, Cは苗条5-10mm長の不定胚発芽実生を培地に移植し30日目の状況

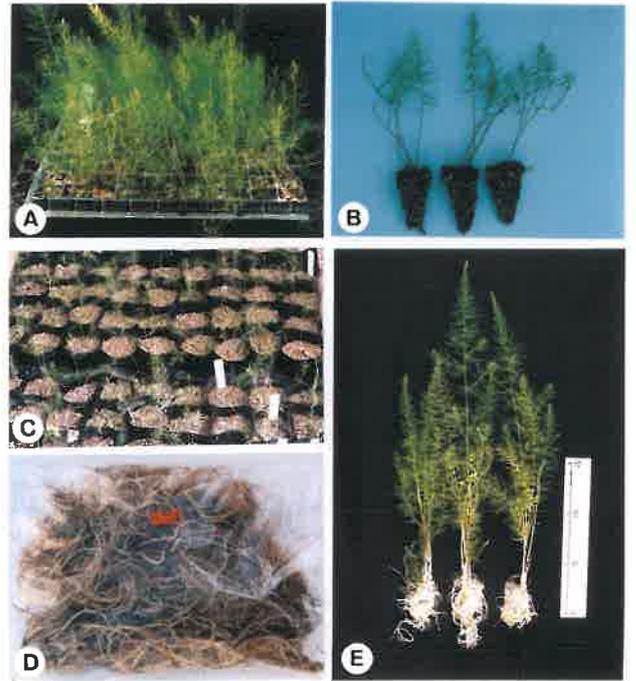


図2-13 培養苗の馴化養成と保存

- A: 200穴セル成型育苗箱で養成中の苗(馴化開始30日後)
- B: 同セル成型苗(培土1辺2cm)
- C: 黒ポリ鉢に移植して養成中の苗(鉢の直径9cm)
- D: ビニルパックで冷蔵保存する貯蔵根(100株単位)
- E: 72穴セル成型育苗箱で2ヶ月養成した苗(品種: Y6)

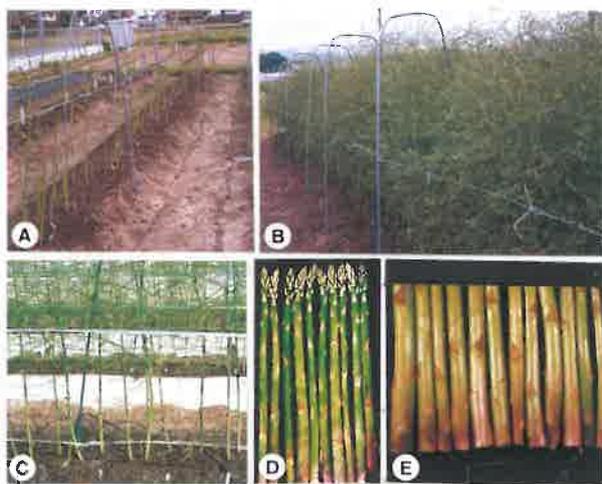


図3-1 アスパラガス不定胚再生株の栽培状況

- 系統: HG17, 栽培3年目
- A: 立茎開始後の萌芽状況(1994年5月10日)
  - B: 一斉開花(同6月14日)
  - C: 立茎中の親茎径の揃い(同5月16日)
  - D: 収穫した若茎形状(同8月)
  - E: 若茎基部のアントシアンの赤色発色の揃い



図3-3 選抜系統'Y6'と種子品種の萌芽時期と若茎形状の差異

- AB: 萌芽時期: 1997年4月28日, 収穫2年目
- A: Y6, B: ウエルカム
  - C: 若茎の形状: 1997年4月30日収穫
  - D: Y6, E: ウエルカム

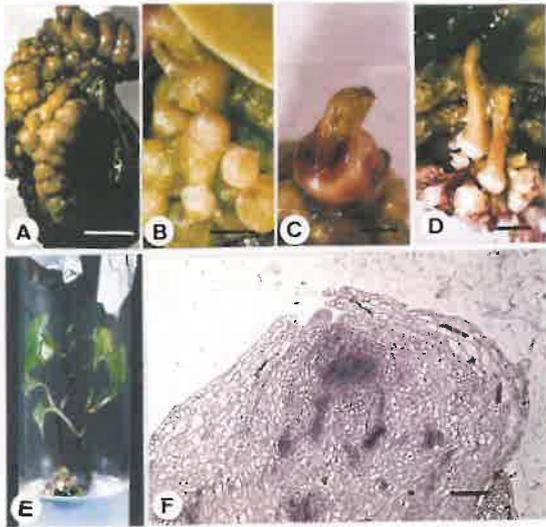


図4-1 未熟葉から誘導した多芽体からの苗条形成

- A: 多くの茎頂分裂組織形成部位 (meristematic regions) を含む多芽体形成初期の外観  
 B: 不定芽の形成, 発達すると頂芽部に突起状の組織を形成  
 C: 不定芽からの苗条の伸長  
 D: さらに伸長した苗条  
 E: 再生した植物体  
 F: 茎頂分裂組織が認められる不定芽の垂直切片  
 バーの長さ: 1cm (A, F), 2mm (B), 3mm (C, D), 0.2mm (E)

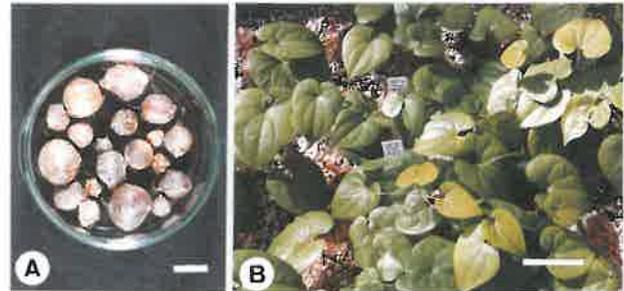


図4-2 培養中に形成した培養むかごとその再生植物

- A: 培養むかご バーの長さ: 1cm  
 B: 培養むかごから再生したウイルスフリー植物 バーの長さ: 5cm

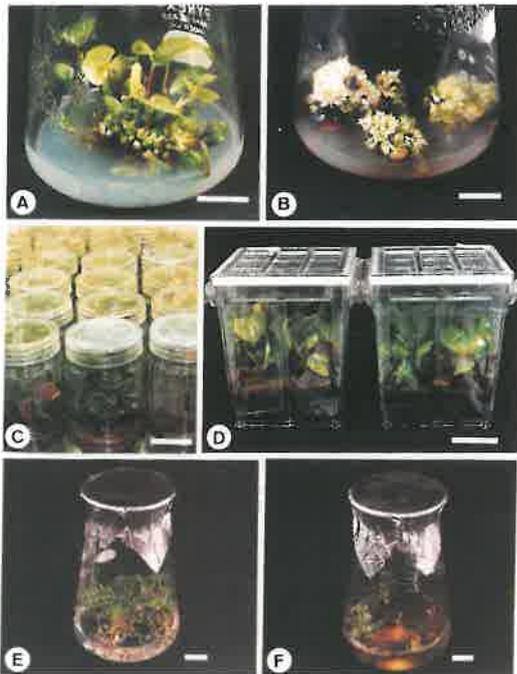


図4-3 ヤマノイモの多芽体誘導による大量増殖

- A: 葉片から誘導した多芽体  
 B: 多芽体の継代培養による増殖  
 C: 培養ボトルを用いた植物体再生  
 D: PCP容器を利用した効率的な植物体再生とむかご形成  
 E: 次亜塩素酸ナトリウムを用いた殺菌剤加用培養法の開発 (有効塩素 5 ppm)  
 F: 次亜塩素酸ナトリウム無添加 (対照)  
 バーの長さ: 1cm (A, B, E, F), 5cm (C, D)

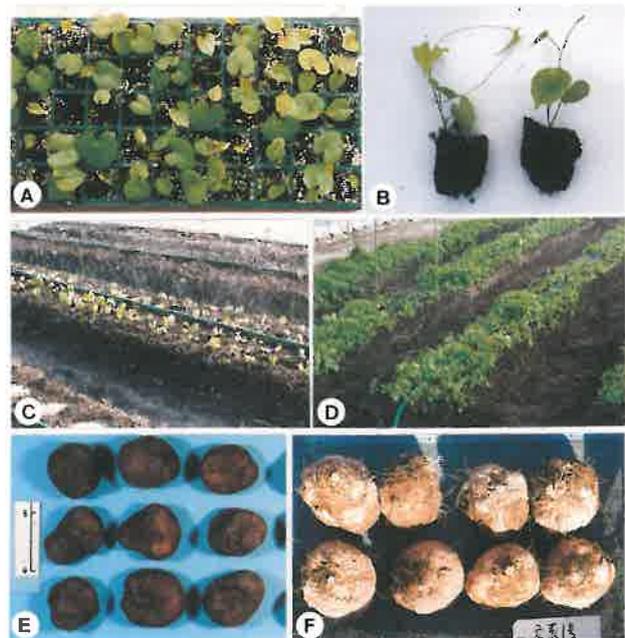


図4-4 ヤマノイモの培養むかごを利用した新種苗生産システム

- A: むかごのセル成型育苗箱播種による均一苗の育成  
 B: 養成した播種後36日の苗  
 C: 圃場への定植と灌水状況 (6月)  
 D: 生育状況 (8月)  
 E: むかごから養成した種芋 (約40g)  
 F: 培養むかごによる増殖が可能な多収系統 '広系1号'

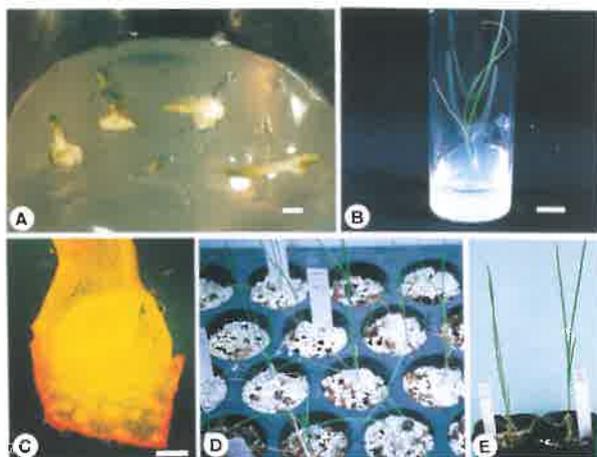


図5-3 超低温保存したワケギ茎頂からの植物体再生

- A: ガラス化法により $-152^{\circ}\text{C}$ 超低温冷凍庫に保存後再生中の茎頂培養5日後, 供試系統: 木原晩生1号  
バー: 1 mm
- B: 同再生植物体培養30日後 バー: 1 cm
- C: 培養3日目の茎頂切片のFDA, フェノサフラニン二重染色による蛍光顕微鏡観察 黄色部の細胞は生存, 赤色部の細胞は枯死 バー: 0.2mm
- D: セル育苗箱で順化養成中の超低温保存苗
- E: 黒ポリ鉢による養成

---

広島県立農業技術センター研究報告 第71号

平成14年3月29日 印刷  
平成14年3月29日 発行

編集 広島県農業技術センター  
発行  
〒739-0151 広島県東広島市八本松町原

印刷所 (株) 中本本店  
〒730-0004 広島市中区東白島町13-15  
☎ (082) 221-9181

---

