

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・順化に及ぼす効果

甲 村 浩 之

キーワード：アスパラガス，不定胚，大量増殖，通気培養，炭酸ガス施用，エピクチクラワックス

著者らは、アスパラガス (*Asparagus officinalis* L.) 優良株の不定胚による大量増殖技術を開発し、苗生産に応用するための研究を行っている^{11,12,13,14,15,16}。

培養苗生産を実用化するためには、優良苗を種子苗と同様な方法で生産でき、コストも種子苗に近いものにするのが課題となる。そのためには、人工照明・高湿度条件下で養成される培養苗を外部環境下に取り出した時の乾燥ストレスへの耐性の強化や培養期間短縮のための苗の生育促進技術の開発が必要となる。

アスパラガスの培養苗生産については、1970年代から莖頂培養法^{8,20}、腋芽培養法^{28,29}が開発され、培養条件や順化法の改善により、活着率は90~100%に高められている³。不定胚再生苗についても、高湿度条件下(70%)での順化により、ほぼ100%の活着率が得られるようになった¹²。しかし、これらの報告はいずれも6~8週間の長期間培養した苗を順化したもので、苗の生産効率は低い。

そこで、本報告では培養苗の乾燥ストレス耐性の強化や培養期間の短縮を目的に、通気培養²³や炭酸ガス施用の効果¹⁸について検討した。その結果、不定胚移植から約1カ月で培養苗を容器から取り出し、これを種子苗生産に用いられるセル成型育苗箱(200穴)に移植し、順化養成する苗生産法を確立した。ここにその概要を報告する。

材料及び方法

供試不定胚

品種‘ヒロシマグリーン(2n=30)’、‘セトグリーン(2n=40)’、‘メリーワシントン500W(2n=20)’の優良株各々1個体及び‘ウエルカム(2n=20)’の3個体(Y6, O6, Y7)を供試し、前報^{15,16}の方法に基づいて不定胚を誘導した。なお、不定胚形成カルス(EC)については、1993年に多芽集塊から誘導し、寒天培地で2週間毎に継代維持して

いる正常なものを用いた。ECを液体振盪培養した後の細胞集塊については、0.2gずつ直径9cmの無菌シャーレ(寒天2.5%、培地量20ml)に移植し、これに前培養液を0.3ml添加してシャーレ全体に広げた。移植後は、シャーレを二重のパラフィルムで密封し、およそ1カ月間培養の成熟した不定胚(大きさ3-5mm)を以下の試験に用いた。

I. 培養苗の順化活着に及ぼす通気処理の影響

1. 不定胚移植から植物体再生時の通気処理の方法及び培養条件

培養容器(ポリカーボネート製、蓋TPX製、直径80×高さ100mm)の蓋中央部に直径8mmの通気孔を設け、無菌通気膜(ミリシール、日本ミリポア工業株製、直径18mm)を貼付した条件下で不定胚を培養する処理を通気培養区とした。なお、対照には無通気培養区を設けた。

通気培養区及び無通気培養区、それぞれ1培養容器当たりMS培地²¹(シヨ糖3%、ゲランガム0.2%、pH5.8)を50ml分注し、殺菌後、不定胚を移植した。不定胚の移植は1容器当たり20個とし、25°C・5000lux(65 μ molm⁻²s⁻¹)・16時間日長条件下で培養した。培養期間は1994年10月16日から同11月15日とし、30日間培養した苗を以下の試験に供試した。なお、試験期間中の培養室内の湿度は30~40%、空気中の炭酸ガス濃度は450~500ppmで推移した。無菌通気孔以外からの空気の流入を防ぐため、培養器の蓋の接合部は二重のパラフィルムで密封した。

2. 乾燥に対する苗の耐性状況調査

品種ヒロシマグリーンを供試し、通気及び無通気培養区から同じ程度に生育した正常な培養苗を容器外に取り出し、苗の根部を水に浸漬後、擬葉や苗条の萎縮の程度を24時間にわたり経時的に観察した。なお、調査は各区4苗を供試し、1994年11月15日に、23°C、湿度50%条件下の室内で実施した。

3. 生育及び順化活着状況調査

通気及び無通気培養区から、苗条長が50mm、白色根が30mm以上に伸長した培養苗を取り出し、市販の育苗専用培土(与作N150)を入れたセル成型育苗箱(96穴, 600×300mm, 1穴の直径35mm×深さ35mm)に移植した。これを水稻用育苗箱に置き、ビニールで被覆した電熱温床(150×350×50cm)内で管理した。なお、育苗温度は25°Cとし、ビニールの開閉は、グリーンソーラ制御盤(S&H 誠和㈱, 東京)により自動的に行った。供試品種はヒロシマグリーン, メリーワシントン500W及びウエルカム(O6, Y6)とし、各品種それぞれ20苗を用い、1994年11月15日の順化開始時に草丈、茎数を調査した。また、順化を開始した後、2日毎に手灌水を行い、同年12月15日に順化活着率を調査した。

4. 走査電子顕微鏡による培養苗の茎表面の観察

品種ヒロシマグリーンを供試し、1994年11月15日に通気及び無通気培養区から、苗の茎切片を採取した。これを4°CのFAA(ホルマリン:酢酸:50%エタノール=1:1:18混合液)液に1時間浸漬し固定した後、エタノール系列(90%まで4°C, 以後は室温)で各20分間ずつ脱水し、臨界点乾燥装置を用い、二酸化炭素で置換して乾燥した。金パラジウム合金コーティングは、イオンスパッタを用いて2~4分間行った。調査は走査型電子顕微鏡(日立S-510)の400~1000倍下で行い、茎表面のエピクチクラワックスの形成状態及び気孔の開閉状態を観察した。なお、供試苗数は各区4本とし、苗の採取時期は培養容器開封直後及び育苗土への移植10分後(順化開始10分)の2時期とした。

II. 培養苗の生育に及ぼす炭酸ガス施用の影響

1. 不定胚移植から植物体再生時の培養条件及び炭酸ガスの施用方法

前項の通気処理の試験と同様に無菌的に空気や炭酸ガスが流入する通気孔(直径8mm)を設けた培養容器(プラントボックス, Magenta ㈱シカゴ, 75×75×100mm高)内で不定胚を培養する時の処理を通気培養区及び炭酸ガス施用区とした。なお、対照として無通気培養区を設けた。

培養容器には、培養苗1本当りの培地条件が均一になるように厚さ約2mm、高さ約20mmの亚克力製のしきり板(1容器9マス, 一辺約18mm)を入れた後、MS培地(ゲランガム0.2%, pH5.8)を50mlずつ分注した。殺菌後、1マス当たり1個ずつ不定胚を移植し、25°C, 湿度50%~70%, 10,000lux(130 μ molm⁻²s⁻¹)・12時間照明のプログラム式人工気象器(日本医科㈱, BIOTRON-NC350 SC)内で培養した。供試品種はセトグリーン, メリーワシ

ントン500W, ウエルカム(Y7)及びヒロシマグリーンとし、前の3品種は1995年3月20日~4月19日までの30日間、ヒロシマグリーンについては1995年10月25日~11月20日までの26日間培養した苗を以下の試験に用いた。なお、無菌通気孔以外からの空気や炭酸ガスの流入を防ぐため、培養容器の蓋の接合部は二重のパラフィルムで密封した。

炭酸ガスは、明期(照明期間)にのみ1000~1500ppmの範囲で施用した。暗期及び炭酸ガスを施用しない処理(通気培養区)の人工気象器内の空気中の炭酸ガス濃度は400ppmに設定した。炭酸ガス施用区における空気中の炭酸ガス濃度の制御は、岩谷ガス産業㈱の炭酸ガス流量計(P-544)と富士電気㈱製の赤外線CO₂コントローラ(ZFP-9)により行った。

2. 生育調査

前述した期間の培養後に各処理区の苗を容器から取り出し、草丈、茎数、根長、根数、生体重、乾物重を調査した。生体重及び乾物重は、地上部(茎葉)と地下部(根及び鱗芽群)に分けて調査し、乾物重については、各試料を葉包紙で包み、70°Cで3日間処理したものを測定し、乾物重率で示した。なお、各品種の各処理の供試苗数は9~45本とした。

3. 順化法と順化後の生育調査

各処理区から健全な10~30苗を取り出し、育苗培土(与作)を入れたセル成型育苗箱(96穴及び200穴, 200穴は1穴上辺25mm・下辺10mm, 深さ40mm)に移植した。

これを水稻用育苗箱に置き、ガラス室内に設けたポリエチレンシート、底面吸水シート及びラブシートBKDを敷いた育苗ベンチ(100×200cm×高さ7cm)に移した。灌水は1日1~2回(1回約5分間)、自動灌水指令装置(DM-101, 竹村電機製作所㈱, 東京)で制御した噴霧型エバーフロー(Mタイプ, 三井石油化学㈱)で行った。なお、灌水時には約10mmの深さに滞水するようにした。

セトグリーン及びメリーワシントン500Wを供試した試験の順化期間は、1995年4月20日~5月24日までの34日間(春季試験)、ヒロシマグリーンを供試した試験の順化期間は11月21日~12月20日までの30日間(秋季試験)とした。順化終了後は、前項と同様に苗の生育調査を行った。なお、春季試験は通風のよいガラス室内で行い、温度制御は行わなかった。また、秋季試験については、25°C, 湿度80%, 照度2万lux・12時間照明(陽光ランプ)条件下のグロスチャンパー(広島設備開発 HSK-MRS-1)内で行った。

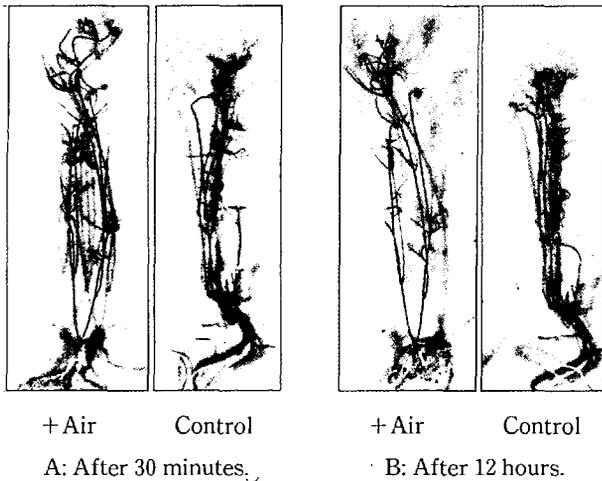


Fig.1 Withering degree of shoots and cladophylls after steeping the roots in water. Thirty minutes (A) and twelve hours (B) after transferring from the culture vessels (Hiroshima Green).
+Air: with ventilation. Control: without ventilation.

III. 培養苗の生育に及ぼす炭酸ガス施用と培地シヨ糖濃度の影響

1. 不定胚移植から植物体再生時の培養条件, 炭酸ガスの施用法及び生育調査

シヨ糖濃度(0, 1, 3, 6%)の異なるMS培地に, 不定胚を移植し, 炭酸ガスの施用を行った。対照として, それぞれのシヨ糖濃度の培地の無通気培養区と不定胚を移植しない区(無通気及び炭酸ガス施用)を設け, シヨ糖

の消費量を測定する際の基準とした。培養条件, 炭酸ガスの施用法及び生育調査は前項に従って実施した。なお, 供試品種はヒロシマグリーン, 各処理の供試苗数は18~27とし, 培養は1995年11月26日~12月25日の30日間とした。

2. 培地の brix 値及びシヨ糖濃度の測定

培養後の各処理区のゲランガムを取り出し, ゲランガム1g当りに2mlの蒸留水を加えた。なお, 各処理区とも3苗を供試し, そのゲランガムを用いた。これを24時間振盪(振盪培養器: 100rpm)後, 溶液部より0.3mlを採取し, デジタル糖度計(愛宕製作所, dbx-30)により brix(可溶性固形物)値を測定した。各試料の brix 値は, それぞれ不定胚を移植しない区(炭酸ガス施用及び無施用)の培地(シヨ糖濃度0, 1, 3, 6%)の brix 値を標準として比較した。また, 培地シヨ糖濃度が3%の炭酸ガス施用区の試料については, 上記の液を蒸留水でさらに10倍に希釈し, フィルター(0.45µm)でろ過後, 高速液体クロマトグラフ(日本分光㈱, HPLC-800 シリーズ)を用いて, シヨ糖濃度を測定した。

結 果

I. 培養苗の順化活着に及ぼす通気処理の影響

1. 乾燥に対する苗の耐性状況

通気培養区では, 苗を容器から取り出した30分後に擬葉がわずかに湾曲し始めた(Fig.1-A, +Air)。しかし,

Table 1 Effect of ventilation to the tissue-cultured plantlets in vessels and its additional effect to the acclimating plants after transplanting to soil.

Cultivar (Line No.)	Treatment ^z	Plant ^y height (cm ± SE)	No. of ^y shoots (±SE)	Ratio of viable ^x plantlets (% ± SE)
Hiroshima Green	Control	9 ± 0	1.6 ± 0.1	69 ± 1
	+ Air	9 ± 1	1.6 ± 0.1	91 ± 5
Welcome (Y6)	Control	9 ± 1	1.9 ± 0.2	95 ± 4
	+ Air	12 ± 1	2.6 ± 0.3	92 ± 5
Welcome (06)	Control	7 ± 1	1.9 ± 0.3	55 ± 6
	+ Air	11 ± 1	3.3 ± 0.8	74 ± 11
MW500W	Control	9 ± 1	2.1 ± 0.7	75 ± 8
	+ Air	10 ± 1	2.0 ± 0.3	93 ± 6

Twenty numbers of plantlets were tested for each treatment of each cultivar.

SE: standard error

^z Control: Cultured under without ventilation, + Air: Cultured under with ventilation.

^y Plant height and number of shoots were investigated at the time of transplanting to soil, at 30 days after plating of somatic embryos.

^x Ratio of viable plantlets was investigated after 30 days from transplanting to soil.

12時間が経過しても擬葉の萎縮の程度は軽く、幼茎は萎縮しなかった(Fig.1-B, +Air)。一方、無通気培養区では、苗を取り出した数分後に一部の擬葉が萎縮し始め、30分後には殆どの擬葉が萎縮した(Fig.1-A, Control)。1時間後には、長さ約2cmの幼茎も萎縮し始め、12時間後には完全に萎縮した(Fig.1-B, Control)。なお、両区とも24時間後には茎基部から新たな茎の伸長が認められた。

2. 生育及び順化活着状況

各供試品種とも通気培養区では、無通気培養区より草丈が高く、茎数がやや多くなる傾向があった。また、順化活着率も通気培養区では74~93%と総じて高い結果が得られた(Table 1)。なお、供試品種により生育に差があり、通気による草丈及び茎数の増加等の生育促進の程度も異なった。

3. 走査電子顕微鏡による培養苗の茎表面の観察

通気培養区の苗の茎表面には、幅約12 μ m間隔に並んだ

葉脈状の筋(Fig.2)に対して垂直方向に、長さ2~5 μ mの筋状のエピクチクラワックスが約2 μ m間隔で多量に形成されているのが観察できた(Fig.2-A)。これに対し、無通気培養区では、いずれの供試苗にもエピクチクラワックスの形成量が極めて少かった(Fig.2-B)。

Table 2 に示すように通気培養区(+Air)における苗の茎表面の気孔の開閉状態は、培養容器から取り出した直後及び順化開始10分後とも、大きく開放している状態(Open)のものはそれぞれ24%、14%と少なかった。また、閉じている状態の気孔は39%、38%と多かった。一方、無通気培養区(Control)では、大きく開放している状態の気孔がそれぞれ48%、58%と多く、閉じている状態のものは11%、8%と少なかった。

なお、通気培養区では、順化開始後に開いた状態の気孔の割合が24%から14%へと低下したのに対し、無通気培養区では48%から58%と高くなった。

Table 2 Observation of stomata on stem segments by scanning electron microscope.

Treatment ^z	Sampling ^y time (minute)	No. of stomata investigated	The ratio of stomata of different state		
			Open	Medium (% \pm SE)	Close
Control	0	85	48 \pm 5	41 \pm 1	11 \pm 4
	10	66	58 \pm 9	34 \pm 6	8 \pm 5
+ Air	0	59	24 \pm 11	37 \pm 7	39 \pm 8
	10	51	14 \pm 9	48 \pm 3	38 \pm 10

^z See table 1.

^y Samples were fixed by FAA solution just after taking out from culture vessels (0) or 10 minutes after transplanting to soil (10).

Eight to 12 numbers of stomata per stem segment were investigated for each treatment at each sampling time.

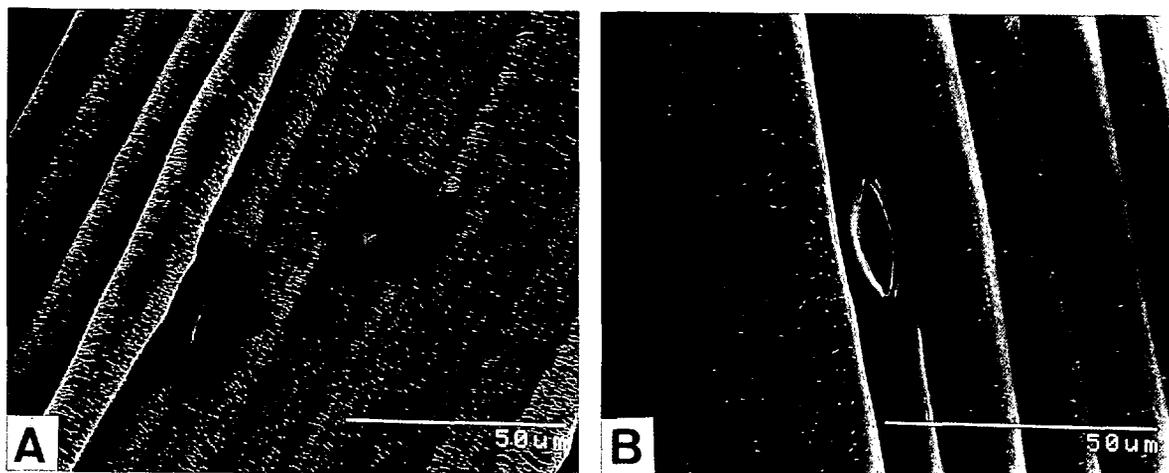


Fig.2 The scanning electron micrographs of the surface of stem segments of the plantlets regenerated from somatic embryos cultured under with or without ventilation. A: With ventilation. B: Without ventilation. Much of epicuticular wax was observed on the surface of stem of plantlets of Hiroshima Green cultured under with ventilation.

Table 3 Effect of CO₂ enrichment to the tissue cultured plantlets regenerated from somatic embryos:

Cultivar (Line No.)	Treatment ^z	No. of plants investigated	Plant height (cm ± SE)	No. of shoots (± SE)	Root length (cm ± SE)	No. of roots (± SE)
Seto Green ^y	Control	9	9±1	3.0±0.6	7±1	3.3±1.0
	+Air	9	11±0	2.1±0.2	8±1	4.7±0.8
	+CO ₂	9	10±1	2.9±0.5	8±1	5.9±0.9
Welcome ^y (Y7)	Control	10	10±1	2.8±0.6	6±1	7.3±1.7
	+Air	10	11±1	3.1±0.4	7±0	7.2±1.3
	+CO ₂	9	11±1	5.3±0.8	8±1	10.9±2.0
MW500W ^y	Control	18	11±0	5.4±0.9	11±1	6.8±1.0
	+Air	18	9±1	5.8±1.0	10±1	7.2±1.4
	+CO ₂	18	11±1	6.7±0.9	11±1	8.7±1.5
Hiroshima ^x Green	Control	36	8±1	2.0±0.3	8±1	2.9±0.5
	+Air	36	10±1	1.8±0.3	8±1	2.7±0.5
	+CO ₂	45	9±1	2.1±0.3	9±1	3.8±0.6

^z See table 1. +CO₂: Cultured under CO₂ enrichment (1000–1500 ppm under light condition, of 12 hours per day)

^y These cultivars were investigated at 30 days after plating of somatic embryos.

^x This cultivar was investigated at 26 days after plating of somatic embryos.

Table 4 Effect of CO₂ enrichment on fresh weight of underground parts and dry matter of the plantlets regenerated from somatic embryos.

Cultivar (Line No.)	Treatment ^z	FW of under ^y ground parts to whole plant(%)	Dry matter (% ± SE) ^x		
			Whole plant	Above ground	Under ground
Seto Green ^w	Control	44	12±1	16±0	7±1
	+Air	42	11±1	16±1	8±1
	+CO ₂	61	10±1	19±1	7±0
Welcome ^w (Y7)	Control	44	11±0	17±1	6±1
	+Air	63	10±0	16±1	7±1
	+CO ₂	61	11±1	18±1	7±1
MW500W ^w	Control	51	11±0	17±1	7±1
	+Air	44	12±1	16±1	6±1
	+CO ₂	59	12±0	18±1	7±1
Hiroshima ^v Green	Control	69	12±1	20±1	9±0
	+Air	69	12±0	21±1	8±0
	+CO ₂	79	13±1	26±1	11±0

^{zwv} See table 3. The number of plantlets measuring for fresh weight were indicated in table 3.

^y The ratio of fresh weight of underground parts (crown and roots) to whole plant.

^x Dry matter (%) = Dry weight / Fresh weight × 100

^v Six numbers of plantlets of Seto Green, Welcome(Y7), MW500W and twelve numbers of plantlets of Hiroshima Green were investigated.

II. 培養苗の生育に及ぼす炭酸ガス施用の影響

1. 苗の生育状況

Table 3 に示すように、各供試品種とも炭酸ガス施用区、通気培養区及び無通気培養区の間の草丈と根長に差は認められなかった(Fig.3)。茎数については、ウエルカム(Y7)及びメリーワシントン 500W の炭酸ガス施用区が、また、根数では各供試品種とも炭酸ガス施用区で最も多くなる傾向があった。なお、各供試品種の茎数は、セトグリーン、ヒロシマグリーンで2~3本、ウエルカム(Y7)で3~5本、メリーワシントン 500W で5~7本、根数はセトグリーンで3~6本、ウエルカム(Y7)で7~11本、メリーワシントン 500W で7~9本、ヒロシマグリーンで3~4本と品種間に差が認められた。

なお、培養中の苗の生育状況の差をみるため、ヒロシマグリーンを供試し、各処理区の不定胚移植1週間後の展葉状況を調査した。その結果、それぞれ供試した36苗のうち、炭酸ガス施用区では16個体、通気培養区では14個体、無通気培養区では10個体が展葉し、炭酸ガス施用区の展葉時期が早くなる傾向が認められた。

一方、生体重については、各品種とも炭酸ガス施用区(+CO₂)の苗が最も重かった(Fig.4)。各品種の無通気培養区(Control)の生体重を100とした場合、炭酸ガス施用区では、セトグリーンが191、ウエルカム(Y7)が128、メリーワシントン500Wが134、ヒロシマグリーンが143(全品種平均が145)となり、炭酸ガスの施用により、培養苗の生育は著しく促進された。なお、無通気培養区と通気培養区(+Air)の間には、4品種とも生体重に殆ど差がなかった。

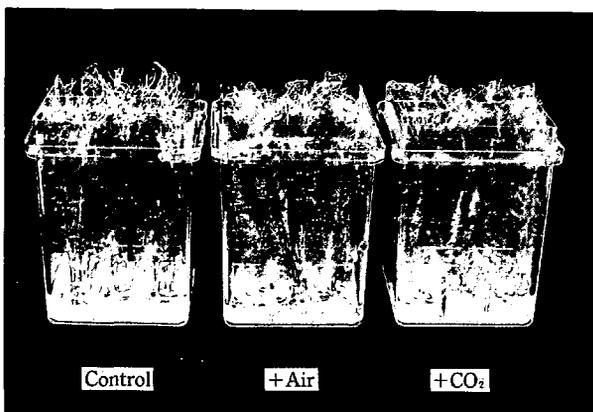


Fig.3 Plant regeneration from somatic embryos cultured under different conditions. Thirty days after transplanting of somatic embryos of MW500W. Control: without ventilation, +Air: with ventilation +CO₂: with ventilation and CO₂ enrichment (1000-1500 ppm under light condition of 12 hours per day.)

苗の全生体重に対する地下部(根及びりん芽群)生体重の占める割合は、セトグリーン、メリーワシントン 500W、ヒロシマグリーンの3品種では、炭酸ガス施用区が最も高く、他の処理区より8~1%高かった(Table 4, Fig.5)。

苗全体の乾物重率については、供試4品種とも無通気培養、通気培養、炭酸ガス施用の各処理間に大きな差はなかった。しかし、地上部の乾物重率についてはいずれの供試品種も炭酸ガス施用区で最も高くなる傾向があり、特にヒロシマグリーンの場合、炭酸ガス施用区の苗が無通気培養区、通気培養区に比べ乾物重率で5~6%も高くなった。また、ヒロシマグリーンでは地下部の乾物重率についても炭酸ガス施用区で1~3%高くなった(Table 4)。

2. 順化後の苗の生育状況

セトグリーン及びメリーワシントン500Wでは、炭酸ガス施用区の草丈及び茎数が無通気培養区や通気培養区より高くなる傾向があった(Table 5)。また、ヒロシマグリーンについては、草丈や茎数だけでなく根長や根数も炭酸ガス施用によって増加した(Table 6)。さらに、生体重は、炭酸ガス施用区が0.77gと無通気培養区や通気培養区の0.50、0.51に比べ1.5倍以上に増加した。全生体重に対する地下部生体重の割合は、炭酸ガス施用区と通気培養区では約50%、無通気培養区では45%であった。

III. 培養苗の生育に及ぼす炭酸ガス施用と培地シヨ糖濃度の影響

1. 苗の生育状況

炭酸ガス施用の有無に関わらず、培地のシヨ糖濃度が

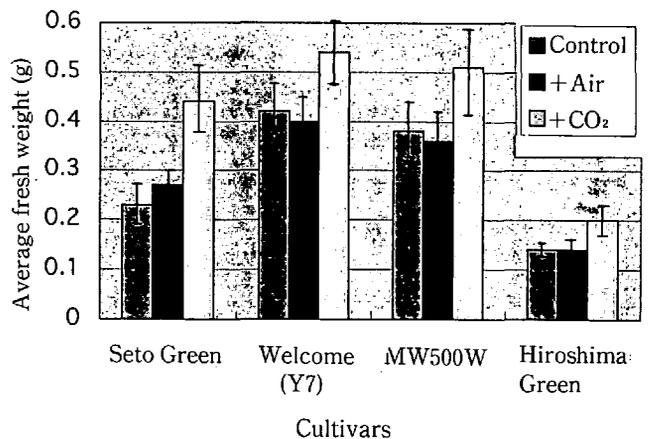


Fig.4 Effect of CO₂ enrichment on the fresh weight of the plantlets regenerated from somatic embryos. For culture condition, investigation method and culture period of each cultivar, see table 3. Bars indicate standard error.

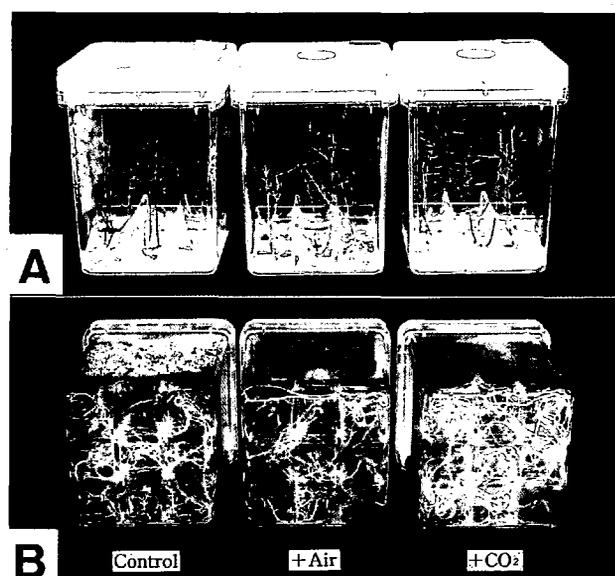


Fig.5 Plant regeneration from somatic embryos of Hiroshima Green in different culture conditions. Shoot growth (A) and root growth (B) of 26 days after transplanting of somatic embryos. Control: Without ventilation, +Air: with ventilation +CO₂: with ventilation and CO₂ enrichment (1000–1500 ppm under light condition of 12 hours per day.)

高いほど草丈及び根長が伸長する傾向があった。生体重も培地のシヨ糖濃度が高いほど重くなる傾向があったが、3%区(0.16~0.19 g)及び6%区(0.17~0.21 g)の差は小さかった。茎数はシヨ糖濃度3%区で最も多くなった。

炭酸ガス施用区では、いずれのシヨ糖濃度においても無施用区より苗の生体重が重くなった。なお、シヨ糖濃度0、1%区では、炭酸ガス施用区の苗の生体重が無施用区の2倍となり、炭酸ガス施用の効果が高かった。また、

Table 5 Effect of ventilation and CO₂ enrichment *in vitro* culture to the growth of plantlets after transplanting to soil.

Cultivar	Treatment ²	No. of plants investigated	Plant height (cm ± SE)	No. of shoots (± SE)
Seto	Control	9	13 ± 1	2.7 ± 0.3
Green	+Air	8	12 ± 1	2.3 ± 0.5
	+CO ₂	10	15 ± 1	3.4 ± 0.4
MW500W	Control	11	12 ± 1	4.9 ± 0.9
	+Air	10	11 ± 1	6.1 ± 0.7
	+CO ₂	11	13 ± 1	6.3 ± 0.9

These were investigated at 34 days after transplanting to soil of nursery tray (96 holes) in the opened green house.

² See table 3.

³ The shoots, over 2 cm in length were counted.

培地シヨ糖濃度が高くなるほど地下部生体重の割合が増加し、苗条、根の乾物重率も増加した (Table 7)。

2. 培地の brix 値及びシヨ糖濃度

炭酸ガス施用の有無にかかわらず、各処理区(培地シヨ糖濃度0~6%)の brix 値は、不定胚を移植していないそれぞれの標準となる試料の brix 値の83%であった。また、炭酸ガス施用区(培地シヨ糖濃度3%)における同試料の希釈液の高速液体クロマトグラフによる分析結果では、培地のシヨ糖の残存量は不定胚を移植しなかった培地のシヨ糖の総量の74.5%であった。なお、不定胚を移植した培地では、残存量に違いがあるもののいずれもブドウ糖や果糖のピークが出現した(データ掲載無し)。

Table 6 Effect of ventilation and CO₂ enrichment *in vitro* culture to the growth of plantlets of Hiroshima Green (17) after transplanting to soil.

Treatment ²	No. of plants investigated	Plant height (cm ± SE)	No. of shoots (± SE)	Root length (cm ± SE)	No. of roots (± SE)	Fresh weight (g ± SE)	Ratio of underground (%)
Control	21	23 ± 3	3.0 ± 0.4	11 ± 1	3.9 ± 0.7	0.50 ± 0.08	45.5
+Air	26	24 ± 3	2.9 ± 0.5	10 ± 1	3.7 ± 0.8	0.51 ± 0.09	50.8
+CO ₂	28	28 ± 2	4.0 ± 0.7	12 ± 1	5.6 ± 0.9	0.77 ± 0.16	50.3

² See table 3.

These were investigated at 30 days after transplanting to soils of nursery tray (200 holes) under control of temperature (25°C), humidity (70%), light intensity (20,000 lux) and automatic watering (8 times per day) in growth chamber.

Table 7 Effect of CO₂ enrichment to the growth of plantlets in different sucrose concentration medium after plating of somatic embryos.

Sucrose (%)	Treatment ^z	No. of plants investigated	Germination ^y rate (%)	Plant height (cm ± SE)	No. of shoots (± SE)	Root length (cm ± SE)	Fresh weight (g ± SE)	Ratio of underground (%)	Dry matter	
									Shoot (%)	Root (%)
0	Control	18	22.2	2 ± 1	1.0	0	0.02 ± 0.01	0	-	-
	+CO ₂	18	50.0	5 ± 1	1.0	3 ± 1	0.04 ± 0.01	54.8	-	-
1	Control	18	66.7	5 ± 1	1.2 ± 0.1	4 ± 1	0.05 ± 0.01	59.8	-	-
	+CO ₂	18	85.0	6 ± 1	1.5 ± 0.2	4 ± 1	0.10 ± 0.02	62.2	17.0	7.8
3	Control	18	61.1	7 ± 1	2.2 ± 0.5	8 ± 1	0.16 ± 0.05	72.1	-	-
	+CO ₂	27	85.0	7 ± 1	2.3 ± 0.4	7 ± 1	0.19 ± 0.03	72.9	20.5	9.2
6	Control	18	61.1	7 ± 1	1.5 ± 0.3	10 ± 0	0.17 ± 0.03	82.0	-	-
	+CO ₂	18	83.3	8 ± 1	1.8 ± 0.3	9 ± 1	0.21 ± 0.04	76.9	25.5	12.7

Hiroshima Green was used for this experiment. The plantlets were investigated 30 days after plating of somatic embryos.

^z See table 3.

^y The plantlets with shoots of over 5 mm in length were counted.

考 察

前報¹⁴⁾では、ECの液体振盪培養後の細胞集塊を寒天濃度の高い培地⁴⁾(不定胚成熟培地)に移植して成熟させることにより、不定胚や苗のビトリフィケーション(水浸状化)が回避でき、気密性の高い培養容器内においても外観上健全な苗が得られることを明らかにした。しかし、苗生産の効率をさらに向上するためには、1)湿度調整ができないハウス内においても効率的に順化ができる培養苗を育成する方法、2)培養期間を短縮するための苗の生育促進法等の開発が課題となる。

著者は、乾燥ストレス耐性の付与による培養苗の順化率の向上を目的とし、培養容器内の湿度の低減に着目して不定胚からの植物体再生時の苗に通気処理を行った。その結果、通気培養した苗は、容器から取り出した後も苗条の萎縮の程度が軽く、供試した4品種間に差はあるものの無通気培養の苗に比べると活着率が高くなった。培養容器内の湿度の低減には、乾燥剤(シリカゲル、ラノリン等)を封入する方法²⁶⁾、通気性のよい資材を培養容器の蓋に用いる方法¹⁾あるいは、培養容器の蓋に小孔を設け無菌通気膜を貼付する方法²³⁾等がある。著者はこれらの内、培養容器の大型化や処理の簡便さから、Saitoら²³⁾の無菌通気膜を用いる方法が最適と考え、本法による不定胚からの植物体再生時における通気処理により苗の順化活着率が向上することを明らかにした。

また、この通気処理が苗に乾燥ストレス耐性を付与する原因を明らかにするため、培養苗の苗条表面を走査型電子顕微鏡で観察した。その結果、通気培養の苗ではエ

ピクチクラワックスが多量に形成されていることを明らかにした。培養苗のエピクチクラワックスに関しては、Groutらがカリフラワー⁷⁾の、また、Sutterらがカーネーション²⁴⁾及び、キャベツ²⁵⁾の培養苗の葉の表面を詳細に観察している。それによると、培養苗のエピクチクラワックスの形成量がハウス栽培の苗より少ないのは、培養容器内の高い湿度が関与していると推測している。また、Wardleら²⁶⁾は、培養容器内の湿度とエピクチクラワックス形成量についてカリフラワーを用いて検討し、湿度を低減するとエピクチクラワックスの量が増加することを明らかにしている。著者の試験では容器内の湿度を測定していないが、通気培養では容器内の水滴の付着量が少ないことから、アスパラガスの培養苗は、通気による若干の乾燥処理で、エピクチクラワックス量が増加することを明らかにした。

さらに、本試験では、無通気培養の苗は、容器外に取り出した後も気孔を閉じる割合が低いことから、気孔の開閉機能が低下していることが推測された。このことは、培養苗では気孔開閉の調節機能が低下するとされているこれまでの報告^{7,24,25)}と一致した。一方、通気培養の苗では、閉じた状態の気孔の割合が高く、乾燥に対する防御反応としての気孔の開閉機能は無通気培養の苗のように低下していないと推測された。

培養苗の生育促進を目的とした炭酸ガスの施用に関して著者の行った試験では、不定胚からの植物体再生時の炭酸ガスの施用により、苗の生体重が無通気培養の約1.4倍(供試4品種の平均)に増加し、莖数、根数についても増加する傾向が認められた。また、炭酸ガスの施用に

よる生育促進効果は、地下部生体重や地上部乾物重率の増加に比較的顕著に表れた。培養苗への炭酸ガスの施用に関しては、富士原ら⁶⁾が培養容器内の炭酸ガス濃度の経時変化を詳細に測定している。その中で苗を通気性の悪い容器内で培養すると明期における器内の炭酸ガス濃度は100ppm以下(野外環境は一般に約300ppm)に低下し、光合成能力が著しく低下する。したがって、生育促進のためには炭酸ガスの施用が望ましいとしている。この報告を受けて、培養苗に炭酸ガス(いずれも1000~1500ppm)を施用し、古在らのスターチス¹⁸⁾を初めとして多くの作物でその効果が明らかにされている^{1,5,10,17,22)}。アスパラガスについても炭酸ガスの施用により苗条や根の伸長の促進²⁾や生体重、乾物重の増加¹⁹⁾が明らかにされており、著者の試験でも同様な生育促進効果が得られた。この結果、これまで不定胚からの植物体再生における培養期間を約45日としていた¹⁴⁾のを約30日に短縮しても、苗として十分順化できることを明らかにした。このように本試験での炭酸ガスの施用は、苗の乾物生産と貯蔵根の充実に大きく寄与したことは明らかであり、培養苗の水浸状化の軽減にもつながるものと考えられる。また、炭酸ガスの施用により、順化開始時の苗の生体重が無通気培養の約1.4倍に、さらに順化開始1カ月後には1.5倍以上となった。このように培養中の初期生育の促進が、順化開始後の苗の生育にも大きく影響することから、培養中の炭酸ガスの施用は、苗の生育を促進する有効な手段と考えられた。なお、アスパラガスの光合成能については、稲垣ら⁹⁾が種子実生を用い、光飽和点が約5万 lux、炭酸ガス飽和点が約1000ppm、温度20±5°Cが光合成に好適であるとしている。著者は、炭酸ガスの施用効果を単一の条件下で検討したが、植物の炭酸ガスの固定量は、光や温度条件によっても変わるのが一般的である。そのため、今後はこれらの条件をふまえた検討も必要と考える。

培養苗に対する炭酸ガス施用と培地シヨ糖濃度の相互作用に関する試験では、シヨ糖濃度を3%または6%とした場合の炭酸ガスの施用で苗の生体重が高くなり、シヨ糖濃度0%または1%では低かった。この結果と同様に、古在ら¹⁸⁾はスターチスを用いて炭酸ガスを施用(照度150 μmolm^{-2} 下)した場合、シヨ糖0%より同3%の苗の生育が優れることから、炭酸ガスとシヨ糖による光混合栄養的な苗の生長促進効果が認められたとしている。また、荒井ら¹⁾は、イチゴにおける炭酸ガスの施用(照度5000 lx)試験で、シヨ糖1.5%と同3%の苗の生育に殆ど差がなく、シヨ糖の減量は炭酸ガスの施用で解消できている。これに対し、Kozai ら¹⁷⁾は、カーネーション(照度150 μmolm^{-2})の場合、シヨ糖2%より、同1%の方

が生体重や乾物重が増加したとし、渡邊ら²⁷⁾も、スパテフィラムの場合、通気培養(強制通気)のみで、シヨ糖0%が同3%より生体重で優り、見かけの光合成速度も高かったとしている。このように炭酸ガスを施用する場合、植物の違いにより培地に添加するシヨ糖の適量は異なると考えられるが^{1,17,18,27)}、アスパラガスの培養苗については、古在ら¹⁸⁾のスターチスと同様、光混合栄養的な生長が必要であり、炭酸ガスの施用と培地へのシヨ糖の添加により相加的な生長促進効果が期待できるものと考えられる。

また、本試験では苗を培養した後の培地中のシヨ糖残存量を調査したが、炭酸ガス施用の有無に関わらず、シヨ糖の残存量は約75%と高く、ブドウ糖や果糖等の単糖に分解されて残っているものも相当量あった。これに関し、Kozai ら¹⁷⁾はカーネーションを用い、培養苗が培地から消費する糖の量は2~8%と少ないことを示しており、この報告と同様な例と考えられる。なお、アスパラガスでは培地に添加するシヨ糖の濃度が高い方が苗の生育がよかったにも関わらず、培養後の培地のシヨ糖残存量が比較的多かった。このことから、培地のシヨ糖濃度は発芽などの初期生育への影響が大きく、培養後の苗の生長差はこの初期生育の差によるもの大きいと考えられた。一般に、組織培養を行う培地には炭素源としてシヨ糖の添加が行われているが、光合成を行える植物の培養に対してのシヨ糖の添加はあまり必要でないものと推測される。今後、培養苗生産のさらなる低コスト化のためには、培養容器を大型化していく必要があり、雑菌抑制のためにも培地へのシヨ糖の添加量の低減あるいは無添加の方向で検討を進めていくことが望ましい。従って、植物の生育状態によってはシヨ糖を添加しない培養法を開発するなどのよりよい苗生産方法を検討したい。

広島県では、現在、品質や収量の高い優良雄株の選抜を進め、不定胚により増殖したクローン苗の生産力検定試験を進めている。また、培養苗の順化管理の効率化についても検討を重ねており、アスパラガスの効率的で低コストな苗生産の早期実用化により、農家の高収益・安定生産に貢献したい。

摘 要

アスパラガスの不定胚を利用した培養苗の大量増殖法について検討し、不定胚からの植物体再生時に通気培養や炭酸ガス施用を行うと、順化開始時の培養苗の乾燥ストレス耐性及びその後の順化活着率が高まった。また、炭酸ガスの施用は、培養苗の初期生育だけでなく、順化

活着後の生育も促進した。以下に結果の概要を述べる。

1. 不定胚移植からの植物体再生時に、通気培養を行うことにより、順化開始時の苗の茎葉の萎縮程度が軽減され、その後の順化活着率も高くなった。
2. 走査型電子顕微鏡による苗の茎表面の観察では、通気培養の苗に多量のエピクチクラワックスの形成が認められた。しかし、無通気培養の苗にはエピクチクラワックスの形成が殆ど認められなかった。
- また、通気培養の苗では閉じた状態の気孔の割合が高く、水分保持の体制を備え、無通気培養の苗と比べると気孔の開閉機能が高かった。
3. 不定胚からの植物体再生時における炭酸ガスの施用(1500ppm)により、苗の生体重は著しく増加し、無通気培養及び通気培養の苗に比べると、生体重が1.4倍(4品種の平均)に増加した。また、炭酸ガスを施用した苗については、地下部(根、りん芽群)の割合が顕著に増加するとともに、基数にも若干の増加傾向が認められた。
4. 炭酸ガスを施用した苗では、順化活着後の生育も無通気培養や通気培養の苗より優れており、初期生育の促進の重要性を明らかにした。
5. 培養苗に対する炭酸ガス施用と培地シヨ糖濃度の相互作用では、シヨ糖3%、6%の苗の生育が同0%、1%の苗より優れていた。また、培養後の培地中のシヨ糖残存量は元の総量の75%程度であった。
6. 以上の結果、不定胚移植からの植物体再生時における通気培養や炭酸ガスの施用は、アスパラガス培養苗生産の効率を著しく高めた。

謝 辞

本研究報告をまとめるに当り御指導をいただいた奈良県農業試験場の荒井滋氏、文献の提供をいただいた岩手大学の金澤俊成氏及び炭酸ガス培養装置をお借りした島根県農業試験場の松本敏彦氏に感謝の意を表す。なお、本研究は農林水産省の地域バイオテクノロジー研究開発促進事業によるものである。

引用文献

- 1) 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.
- 2) Cheetham, 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.
- 3) Chin, C.K.: 1982. Promotion of shoot and root formation in asparagus in vitro by ancymidol. HortScience 17(4): 590-591.
- 4) Deburgh, P., Y.Harbaoul and R.Leméur.: 1981. Mass propagation of globe artichoke (*Cynara scolymus*): Evaluation of different hypotheses to overcome vitrification with special reference to water potential. Physiologia plantarum. 53(2):181-187.
- 5) Deng, R., D.J.Donnely: 1993. In vitro hardening of red raspberry through CO₂ enrichment and relative humidity reduction on sugar-free medium. Can.J.Plant Sci. 73(4):1105-1113.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) Hasegawa, P.M., T.Murashige and F.H.Takatori: 1973. Propagation of asparagus through shoot apex culture. II. Light and temperature requirements, transplantability of plants, and cytohistological characteristics. J.Amer.Soc.Hort. Sci. 98(2):143-148.
- 9) 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, CO₂ 濃度及び温度の影響. 園学雑. 58(2) : 369-376.
- 10) Jin, B., H.R.Dong and X.H.Yang:1993. Influence of gaseous environment and light on growth of tissue-cultured carnation plants. Acta Horticulturae Sinica. 20(4):389-393
- 11) 甲村浩之・長久逸・池田好伸：1990. アスパラガスの不定胚形成による大量増殖 第1報 実生組織からの不定胚形成と植物体再生. 広島農試報告. 53 : 43-50.
- 12) ————・—————・—————：1990. 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順化条件の検討. 広島農試報告. 53 : 51-61.
- 13) ————・—————・—————：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. 広島農試報告. 54 : 33-40.

- 14) ———・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.
- 15) Kohmura, H., Chokyu, S and T.Harada: 1994. Effective micropropagating system using embryogenic calli induced from bud clusters in *Asparagus officinalis* L. Jap.J.Hort.Sci.63(1): 51-59.
- 16) 甲村浩之・重本直樹・井本征史：1995. アスパラガスの不定胚形成による大量増殖の研究 第8報 不定胚の発達制御及び体細胞変異について 園学雑. 64別1 : 202-203.
- 17) Kozai, T. and Y.Iwanami: 1988. Effects of CO₂ 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.
- 18) 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.
- 19) 国武久登・中島寿亀・森欣也・田中政信：1994. アスパラガスの胚様体利用による大量増殖(第2報)セル成形培養苗の生長と順化に及ぼすいくつかの培養環境要因の影響. 園学雑. 63別(1) : 246-247.
- 20) 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.
- 21) Murashige, T and F. Skoog: 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15: 473-497.
- 22) Navarro, C., C.Teisson, F.Cote and J.Garry: 1994. Effects of light intensity and CO₂ concentration on growth of banana plants (Musa AAA, cv. 'Petite Naine') in vitro and subsequent growth following acclimatization. Scientia Horticulturae. 60(1-2): 42-54.
- 23) Saito, T., S.Nishizawa, S.Nishimura: 1991. Improved culture conditions for somatic embryogenesis from *Asparagus officinalis* L. using an aseptic ventilative filter. Plant Cell Rep. 10: 230-234.
- 24) 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.
- 25) Sutter,E. and R.W.Langhans: 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
- 26) 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.
- 27) 渡邊浩一郎・渡邊幸雄・嶋田典司：1990. 通気培養におけるスパティフィラム小植物体の生育, 見かけの光合成およびリブローズ-1,5-ニリン酸カルボキシラーゼに及ぼす培地シヨ糖濃度の影響について. 植物組織培養. 7(2) : 74-79.
- 28) Yang,H.J. and W.J.Clore:1973. Rapid vegetative propagation of asparagus through lateral bud culture. HortScience 8: 141-143.
- 29) Yang,H.J. and W.J.Clore:1974. Improving the survival of aseptically-cultured asparagus plant in transplanting. HortScience. 9(3): 235-236.

Effect of ventilation and CO₂ enrichment on the growth of plantlets regenerated from somatic embryos in Asparagus (*Asparagus officinalis* L.)

Hiroyuki KOHMURA

Summary

In order to improve the plant growth and the rate of acclimatization of short-term culture (30days) plantlets regenerated from somatic embryos of asparagus, the effect of ventilation and carbon dioxide (CO₂) enrichment to the tissue-cultured plantlets were examined.

1. Observation with the scanning electron microscope revealed the presence of much structured epicuticular wax on the surface of plantlets cultured under with ventilation compared with those without it.
2. Scanning electron microscope observations also revealed that the rate of opened stomata was much higher on plantlets cultured under without ventilation than on those with it. The withering degree of shoots and cladophylls of regenerated plantlets cultured under without ventilation was earlier than of with it. Thus, the damage of stomata was supposed to be occurred on the plantlets cultured under without ventilation.
3. The ratio of viable plantlets after acclimatization was higher in the plantlets cultured under with ventilation than that of without it.
4. After short-term culture (30days), the average fresh weight of plantlets grown from somatic embryos with CO₂ enrichment (1500ppm) was 1.4 times greater than that of plantlets grown without CO₂ enrichment. The ratio of the fresh weight of underground part to the whole plant was much higher with CO₂ enrichment than without it.
5. The growth of the plantlets after transplanting to the soil was greater for plantlets that received the CO₂ enrichment treatment *in vitro* than it was for plantlets that didn't receive the treatment.
6. The suitable sucrose concentration of the culture medium was 3 to 6% in combination with CO₂ enrichment. In sugar analysis by HPLC, the residual sucrose in the medium after 30 days culture of plantlets was 75% that added initially.

Keyword: Asparagus, somatic embryogenesis, micropropagation, ventilation, carbon dioxide, structured epicuticular wax