

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

甲村 浩之・井本 征史

キーワード：アスパラガス，不定胚，大量増殖

アスパラガス (*Asparagus officinalis* L.) は広島県の振興作物として、急激に作付け面積が拡大しつつある。これに伴い、種子繁殖による種々の問題点が指摘されている。また、広島県農業技術センター育成の3倍体品種‘ヒロシマグリーン’の普及が要望されている。

Yang ら²⁰⁾は、優良で均質な個体を栄養的に大量増殖する手法として腋芽培養法を開発した。当県では、この方法を用いて育成品種のクローン増殖に取り組んだが、苗条の増殖が安定せず、しかも発根率が極めて低かった。このため、著者らは1987年に実生組織を用いた不定胚形成を利用した大量増殖法を報告した。この方法によると白色根(以後、貯蔵根様白色根とする)の発生率が高く、順化活着も効率的であることに着目して研究開発を進めてきた⁵⁻⁷⁾。また、1991年には不定胚形成が‘ヒロシマグリーン’や‘セトグリーン’等の優良品種にも適用できることを報告した⁹⁾。

しかし、embryogenic callus (不定胚形成カルス、以下 EC とする)を必要時に安定的に誘導し増殖する方法及び液体振盪培養を培養系に組み込むことによる不定胚形成の効率化、同調化の問題が未解決であった。

その後、前者については、長久ら²⁾の報告した多芽集塊を材料として EC を誘導し、安定的に不定胚を誘導できる細胞系統 (embryogenic cell line) を選抜する方法を開発した^{11,12)}。しかし、後者については、液体振盪培養後に不定胚が水浸状化し、植物体再生率が低下する問題^{6,7)}を残していた。

このため、本報告では、液体振盪培養系を利用した不定胚形成の効率化、同調化方法及び寒天培地を利用した不定胚の水浸状化の回避と成熟について、また、不定胚からの効率的な植物体再生のための栄養条件、不定胚の培養容器への移植密度及び再生植物が順化可能となる培養

期間について、さらに、セル成形成育苗箱を用いた順化養成に適切な培土の種類や一斉出荷のための短期貯蔵条件についても検討したので報告する。

材料および方法

Embryogenic callus (EC)の誘導

当農業技術センター圃場に株保存されている‘ヒロシマグリーン’ (2n=30, 13年生, ♂17系統)の若茎を1989年5月に採取した。著者らの方法^{2,13)}により、この若茎の茎頂組織を無菌的に採取し、Murashige & Skoogの培地 (MS培地)¹⁵⁾にアンシミドール10mg/ℓを添加した培地に移植して回転培養し、多芽集塊を誘導した (Fig.4-A)。約1か月毎に継代培養を続け、2年間安定的に維持増殖し、EC誘導の材料とした。この多芽集塊を2mm角片に分割し、MS培地を基本として2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D)を 10^{-5} M, ショ糖30g/ℓを添加し、pH5.8に調整した寒天培地 (寒天8g/ℓ, 培地量5ml)に移植した。培養条件は、25°C, $40\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ の16時間日長で行った。ECは多芽集塊移植後約60日で誘導された。さらに、このECは同組成の寒天培地で2週間毎に継代培養を行いながら増殖するとともに、安定して不定胚が誘導できる細胞系統 (embryogenic cell line, Fig.4-B)を選抜し、本試験に供試した¹²⁾。

なお、本研究で用いた一連の大量増殖は Fig.1 に示した方法で行った。

1. 液体振盪培養による不定胚の同調化のための embryogenic cell 密度の影響

液体振盪培養系を用いて、大きさや生育ステージの揃った不定胚を効率的に形成させるために、ECの液体培地への移植密度を検討した。供試したECは、0.015, 0.03, 0.06及び0.1gの4密度水準を設定し、4反復で実施した。ECの生重量は、電子天秤で秤量後、2,4-D無添加のMS液体培地 (ショ糖30g/ℓ, pH5.8, 培地量30ml)に移植

※本研究は農林水産省地域バイオテクノロジー研究開発促進事業による成果である。

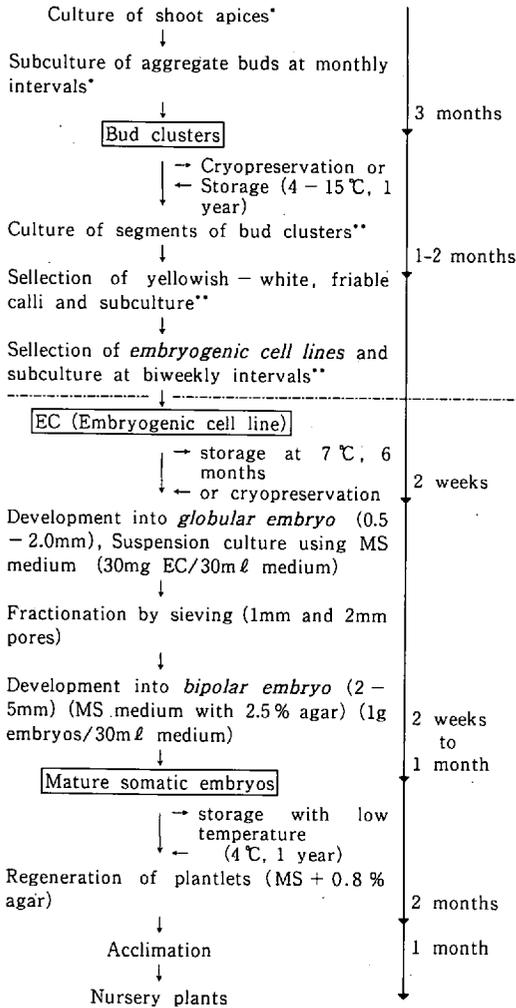


Fig.1 Procedure of micropropagation system using embryogenic calli induced from bud clusters in asparagus.¹¹⁻¹³⁾

* : MS medium supplemented with 10mg/l ancyimidol.

** : MS medium supplemented with 10^{-3} M 2, 4-D.

し、 $25^{\circ}\text{C} \cdot 10\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ 連続照明下において100rpmで振盪培養した。旋回式振盪培養装置は、New Brunswick Scientific社のModelG33を用いた。2週間培養後、不定胚の発達程度を調査した。

II. 液体振盪培養後の不定胚の成熟化のための寒天濃度の効果及び不定胚の同調化

前述の実験で、0.03gのEC密度区で増殖させた2週間

目の細胞塊を供試した。この細胞塊中の多くは球状胚(短径約0.5-2mm)であった。今回は、この細胞塊から成熟した不定胚と考えられる芽と根になる原基の双方が認められる棒状あるいはバナナ型不定胚(以後、双極胚とする)へ成熟させるための培地の寒天濃度を検討した。試験は0.8、2.0、2.5及び3%の4水準の寒天濃度の処理区を設定し4反復で実施した。MS培地に所定の寒天とショ糖30g/lを加えてpH5.8に調整し、30mlずつ分注した(井内盛栄堂社製カルチャーボトル、 $\phi 80 \times 100\text{mm}$)。細胞塊は、1容器当たり生重量で約1g(PCVで約2ml)ずつ、スパチュラで広げて移植した。また、液体振盪培養した細胞塊は、2mmと1mm穴のステンレス製篩やFicoll(400)を用い、球状胚の大きさを揃える同調化操作も検討した。この操作後は同様に前述のカルチャーボトルに移植した。

得られた不定胚の大きさや形状についての調査は移植60日後に行った。さらに、植物生長調節物質が無添加のMS培地(ショ糖30g/l、寒天8g/l、pH5.8)に移植し、60日後の植物体再生率を調査した。

なお、これらの試験はいずれも $25^{\circ}\text{C} \cdot 40\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ 、16時間照明下で行った。

III. 不定胚からの効率的苗化のための培地濃度・ショ糖濃度の影響および移植密度、順化時期

不定胚は、球状胚を含む細胞塊を寒天濃度2.5-3%の培地に移植し、1か月後に得られた長さ2-3mmの正常な双極胚を本試験に供試した。苗化は、MS培地(寒天濃度0.8%、pH5.8)を基本とした培地を用いた。試験はまずMS培地濃度の検討のために、1/1、1/2、1/4強度の3水準、移植密度は前述のカルチャーボトル1容器当たりの不定胚移植数が10、20、30個の3水準を組み合わせで行った(Table 4)。なお、不定胚の移植密度の効果についてはMS培地濃度1/1区において検討し、1/2、1/4区は10個の処理だけで各区4反復実施した。

不定胚からの発芽・苗化に適当なショ糖濃度の検討では、0-12%の10水準を設定して各区5個体・10反復実施した(Fig.2)。なお、この時は $\phi 25 \times 100\text{mm}$ 試験管を用い、培地量10mlとした。

各試験区的不定胚からの苗化については、培養45日後に植物体再生率、苗条長、根長等を調査して検討した(Table 4, Fig.2)。なお、不定胚を30個体移植した培地強度1/1区のカルチャーボトルにおいては、0-60日の培養期間中、15日毎に苗条長、根長を調査し、効率的な順化時期設定の目安とした(Fig.3)。培養条件はいずれも $25^{\circ}\text{C} \cdot 40\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ 連続照明下で行った。

Table 1 Development to globular embryo from different contents of embryogenic calli in liquid culture.

Initial EC weight A (g)	Yielding B (g ± SE) ¹	Proliferation rate B/A	Diameter of embryos (mm ± SE)	Rating of diameter of formed embryos (%)			
				<1mm	1<<2	2<<3	3mm<
0.015	2.6±0.3	173.3	1.9±0.2	16	44	36	4
0.03	2.9±0.2	96.6	1.9±0.2	8	56	24	12
0.06	2.4±0.1	66.7	1.3±0.1	28	60	12	0
0.1	1.6±0.1	16.0	1.0±0.1	64	28	4	4

¹: Fresh weight of total cell clusters cultured after 14 days.

SE: Standard error

IV. 順化時の苗の大きさと順化培土及び短期貯蔵の検討

不定胚から再生した幼植物を試験管から採取し、順化可能な植物体の大きさと順化に適当な培土の種類等の順化条件を検討した。順化には、96穴式(φ35mm×35mm)及び51穴式(φ50mm×50mm)の2種類のセル成形育苗箱を用いた。これらは水稲用の育苗箱上にポリ塩化ビニルシートを敷き、その上に置床した。

順化培土の種類は、市販の園芸育苗用培土 (EC 500~600μS/cm, pH6.0~6.5)、パーミキュライト、パーライト単用区と園芸育苗培土:パーミキュライト:パーライト=1:1:1 (EC 592μS/cm, pH6.7)の三種混合培土の4水準を設定した。順化可能な植物体の大きさは、苗条と白色根(太さ2mm以上)の長さ別に3水準とし、計8水準設定した (Table 5)。供試数は苗条1cmと2~3cm区で各16株、苗条が5~10cm区で51株とした。

順化は室温25℃、自然光の20~25%照度に調整された順化用ガラス室で行い、2~3日毎に灌水を行った。順化移植2か月後に活着率、草丈や根長等を調査し、順化時の苗の大きさと培土の種類別の順化に及ぼす影響について検討した。

また、順化のための施設利用の効率化と苗の一斉出荷のための活着後の植物体の低温短期貯蔵法を検討した。不定胚から再生し、順化活着後(移植2か月後)の苗をセル成形育苗箱の灌水を打ち切って培土を乾燥させた後、塩化ビニルシートにくるみ、5℃の低温貯蔵庫に1~3か月間貯蔵した。各貯蔵期間後、順化室に戻して灌水し、1か月後の株の再萌芽率から生存率を調査した。

結 果

I. 液体振盪培養による不定胚の同調化のための embryogenic cell 密度の影響

液体培地へのECの移植量(細胞密度)と不定胚の発達との関係を検討した。その結果、細胞塊の収量は30mlの

液体培地に0.015~0.03gのECを移植した場合に高く、球状胚の平均長径も最大値を示した。また、細胞塊の収量は、ECの移植量を0.06g、0.1gに増加しても低くなり、球状胚への発達割合も小さかった (Table 1)。

II. 液体振盪培養後の不定胚の成熟化のための寒天濃度の効果および不定胚の同調化

液体振盪培養後の異なる寒天濃度において、球状胚から双極胚へ発達した不定胚の数は、寒天濃度2%培地区で最も多く、1ボトル当たり平均330個であった。この区では、成熟した双極胚(約2mm以上で一部緑色化した水浸状でない不定胚)が得られ、このうち長さ5mm以上に発達した不定胚が平均100個得られた (Table 2)。寒天濃度2.5%及び3%区では、2%区と比較して双極胚数は若干

Table 2 Maturation of somatic embryo on different agar concentration.

Agar (%)	Number of bipolar embryo ² (± SE)		
	2-5mm	5mm <	Total
0.8	55±13	22±6	77±19
2.0	232±63	100±25	332±87
2.5	140±14	84±23	224±37
3.0	68±4	18±3	86±6

0.03g of subcultured embryogenic calli were put into liquid, growth regulator free medium and cultured on reciprocal shaker (100rpm). After 2 weeks, about 1g of cell clusters were put into MS medium solidified with different agar concentration and cultured at 25℃, 80 μmol m⁻² s⁻¹. SE: Standard error

²: White or green colored, bipolar embryos (More than 2mm in length) were calculated after 2 months culture. Vitrified embryos were not calculated.

Table 3. Plant regeneration rate from globular or bipolar embryos formed on different agar concentration.

Agar concentration on preculture medium (%)	Plant regeneration rate (%)	
	Globular embryos	Bipolar embryos
0.8	0 (48) ^a	3.1 (32)
2.0	22.7(22)	81.9(332)
2.5	54.2(24)	84.4(461)
3.0	45.8(24)	66.7(84)

^a: () ; Number of tested embryos

少ないが、水浸状の程度は低かった。なお、寒天濃度3%区では、移植時に小さかった球状胚は褐変枯死し、結果的に得られた不定胚数が少なかった。寒天濃度0.8%の培地では、不定胚が水浸状になり、1ボトル当りの双極胚数は77個で2%区の約1/4であった。

次に、これらの異なる寒天濃度の培地で得られた不定胚を形状別に苗化培地に移植した場合の苗化率を調査した。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 (Table 3)。一方、未熟な球状胚からの苗化率は寒天濃度2.5%区の54%が最高で、全体的に低かった。2%区で得られた双極胚は、苗化時に2次的なカルス形成が若干認められた。しかし、2.5~3%区ではカルス形成や、水浸状化した苗条も殆ど認められず、多くは健全に生育した。

なお、液体振盪培養後に、2mmと1mmの篩による分画

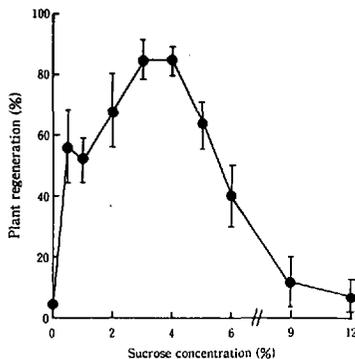


Fig.2 Effect of sucrose concentration on the plant regeneration from bipolar embryos.

5 numbers of bipolar type embryos (3-5 mm in length) were tested for 10 times replicates. The plants with vigorous shoot and root more than 2 cm were calculated.

操作によって、ごく小さな球状胚やカルス、残渣の除去ができ、不定胚の大きさある程度同調化できた (Fig.4-C, D)。また、液体振盪培養後に Ficoll-400 を用い、8%濃度で10~15分間、800~3,000rpm の遠心分離を行った後、沈澱した EC を再度、液体振盪培養 (EC50mg/30ml) することにより不定胚の大きさと形状も同調化できた。これらは培養2週間~1か月後に2.5%の寒天培地に移植し、1週間後には水浸状化の認められない正常な双極胚に発達した (データ掲載無し)。

III. 不定胚からの効率的苗化のための培地濃度・ショ糖濃度の影響及び移植密度、順化時期

不定胚からの発芽、苗化時の MS 培地濃度は、通常の 1/1 強度の MS 培地濃度区の草丈と貯蔵根様白色根の発生率が最も高かった。不定胚の移植密度と苗化率の関係では、1容器当り10, 20, 30個体の範囲では、密植するほど苗化率が高まった (Table 4)。

ショ糖濃度と発芽・苗化率の関係をみると、3~4%区で最も発芽・苗化率が高く84%であった (Fig.2)。しかし、0%区では殆ど発芽せず、0.5, 1.0%区でも発芽後の生育量が少なかった。ショ糖濃度が5%以上の区では、苗化率は徐々に低下し、明らかに苗化が抑制された。さらに、12%の高い濃度では発根が旺盛であったにもかかわらず、発芽率は低く苗条伸長が抑制された。

不定胚を苗化培地に移植して培養60日間の草丈と発根率を調査した結果では、45日目まで発芽後の苗条伸長が認められ、その後は容器内で繁茂した。発根は苗化しない個体でも培養45日後には約90%の個体で認められ、60日後には全個体が発根した (Fig.3)。発芽率は培養30日目

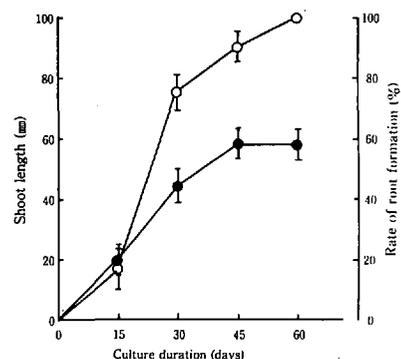


Fig.3 Growth of shoots and roots formed from bipolar embryos in the course of 60 days. (●) ; Shoot length, (○) ; Root formation Average data include the embryos that did not form the shoot.

Table 4. Plant regeneration from bipolar embryos in different strength of MS medium and density of embryos transferring to medium.

Medium strength	Density of embryos	Plant ² regeneration rate (%±SE)	Shoot length (mm±SE)	Rate of vigorous root length (%) ¹		
				>20mm	10<<20mm	Total
1/1	10	75±5	50±4	7.5	45.5	53.0
1/1	20	80±9	54±6	18.3	20.0	38.3
1/1	30	87±6	58±5	20.0	35.6	55.6
1/2	10	70±9	42±5	7.5	30.0	37.5
1/4	10	70±11	41±4	5.0	30.0	35.0

Investigated after 45 days culture. 4 replicates. SE: Standard error

¹: Number of plants, which have both shoots and vigorous roots were calculated.

²: Number of plants, which had vigorous roots of more than 2mm in diameter were calculated.

に87%に達し、45日目と差はなかった。貯蔵根様白色根は、30日までは、20mm長の個体が認められるものの直径1mm程度の細根であった。45日後では、直径2mm以上、長さ10mm以上の白色根をもつ株の割合が30~50%になった (Table 4)。

IV. 順化時の苗の大きさと順化培土及び短期貯蔵の検討

不定胚から再生した植物体の大きさ及び順化に適切な培土の種類について、順化後の活着に及ぼす影響を検討した (Table 5)。苗条5~10cm、貯蔵根様白色根3~5cmの大苗では、培土の種類にかかわらずいずれも活着率が高く82.4~96.1%であった。また、苗条2~3cm、白色根2cm区でも87.5~93.8%の高い活着率を示した。し

かし、苗条1cm、白色根1cmの小苗では活着率が約30%にとどまった。

順化培土の種類と順化率の関係では、園芸用育苗培土単用の82%を除き、供試した培土のいずれも90%以上の高い活着率が得られた。なかでも、三種混合培土 (園芸用育苗培土、パーミキュライト、パーライト=1:1:1)における順化活着率が最も高く96%であった。なお、パーミキュライト、パーライト単用区では、2か月後の生存株率が低く、60%程度となった。

順化活着苗の5℃低温による短期貯蔵試験では、期間が1か月から3か月までは、それぞれ96.6、85.3及び88.9%の高い再萌芽率が維持された。

Table 5. Effect of size of nursery plants and kinds of soils for the acclimation.

Size of nursery plants ² (cm)		Kind of soils ¹	Resprouting plants (%)	Plant ³ height (cm±SE)	Vigorous root		Survival rate ⁴ (%)
Shoot	Root				Length (cm)	Number	
1	1	Nursery soils	37.5	1.1±0.5	0.8	0.6	0
1	1	Mixed soils	31.3	0.9±0.5	0.7	0.7	0
2-3	2	Nursery soils	87.5	5.3±1.1	3.7	1.2	12.5
2-3	2	Mixed soils	93.8	9.1±1.6	4.2	1.4	43.8
5-10	3-5	Nursery soils	82.4	12.3±0.7	6.6	1.9	78.4
5-10	3-5	Mixed soils	96.1	13.0±0.5	6.5	1.9	92.2
5-10	3-5	Vermiculite	94.1	10.5±0.6	6.6	1.7	60.8
5-10	3-5	Parlite	92.2	10.4±0.5	7.5	2.0	64.7

¹: Different nursery trays were used; 96 holes (3cm in diameter) used to plant of 1 and 2-3cm shoot length, 51 holes (5cm in diameter) used to plants of 5-10cm shoot length.

²: Nursery soils was used singly.

Mixed soils; Nursery soil: Vermiculite: Parlite=1:1:1

³: Average shoot length that renewly sprouted on the soil. SE: Standard error

⁴: Survival rate of plant acclimated after 60 days.

考 察

本研究の目的は、著者らがこれまでに開発した不定胚形成を利用した大量増殖を、より効率的、同調的に行うために、液体振盪培養系を組み込んだ培養系の確立を図ることであった。しかし、液体振盪培養を導入するためには、培養中に不定胚が水浸状化し苗化率が低下するなどの問題点を解決する必要があった^{6,7)}。

そこで、液体振盪培養を利用した効率的な EC からの球状胚の誘導、高い寒天濃度培地を利用した不定胚の水浸状化の回避、成熟した双極胚への誘導と苗化について検討し、効率的かつ同調的な大量増殖技術の開発を試みた。さらに、順化に適切な植物体の大きさ、順化培土の種類及び苗の短期貯蔵条件について検討し、順化施設を効率的に利用し、一斉出荷を行うための条件を明らかにしようとした。

1. 液体振盪培養による不定胚形成の効率化及び不定胚の水浸状化の回避

EC を液体振盪培養して得られた球状胚を含む細胞塊を各種濃度の寒天培地上に移植して、不定胚の発達を検討した。その結果、2.5%の高い寒天濃度で得られた双極胚は水浸状でなく、0.8%の寒天濃度で得られた水浸状の不定胚に比べて、高く安定した苗化率が得られた。また、液体振盪培養後に篩や Ficoll 分画等で不定胚の同調化操作を行うと、形状や大きさの揃った不定胚が得られた。

Fujimura ら⁹⁾は、不定胚形成の効率化には液体振盪培養系を利用することが有効であるとし、中村¹⁷⁾や Saito¹⁸⁾は、アスパラガスの EC 誘導や増殖に適応する手法を開発している。しかし、EC の液体振盪培養による増殖では倍加変異が起きやすいことが知られている¹⁷⁾。

著者らは、2,4-D 10^{-5} M を添加した MS 寒天培地を利用して、変異発生が少ないと考えられる多芽集塊^{2,13)}から EC を誘導し、継代維持する培養法^{11,12)}を開発した。この手法は 2 週間毎に約 2 年間継代しても再生植物の形態的な変異、染色体数の変異は認められず、優良な EC の維持には実用的な手法であると考えられる (Fig.1)。しかし、寒天培地をみの培養系では、不定胚形成を阻害すると考えられている 2,4-D を細胞内から効率的に除去し、不定胚を同調的に発達させることが困難であるため、液体振盪培養法を培養系に組み込むことを検討した。液体振盪培養は EC から球状胚に発達させる時期に用いたが、新たに不定胚が水浸状化し、植物体再生率が低下する問題が生じた。Saito ら¹⁸⁾はミリラップで密栓した場合に培地中のゲ

ルライト濃度を高めると水浸状不定胚の発生率が低下することを報告した。すなわち、通常のゲルライト濃度 0.2% を 1% に高めることで水浸状化していない胚の出現率を約 10% から 40% まで増加できたとしている。著者らは Saito ら¹⁸⁾の方法によらず、培地の支持体として一般的に用いられている寒天を通常濃度より高め、より簡易に水浸状不定胚の出現を低減させようと試みた。その結果、寒天濃度 2.0~2.5% の培地を用いることで従来の 0.8% 区と比較して約 3~5 倍の正常な不定胚が得られた。また、これらの方法で誘導した双極胚は、寒天濃度が 0.8% の MS 培地 (植物生長調節物質も無添加) へ移植すると、80% 以上が植物体に再生し、水浸状の苗条や二次的なカルス形成も殆ど認められなかった。

そのため、液体振盪培養後の不定胚 (球状胚) を高い寒天濃度の培地に移植して徐々に双極胚に発達させることは極めて重要で、本研究では実用的な不定胚形成、植物体再生系が確立されたと考える。

2. 効率的な優良苗生産システム

不定胚の発芽と生長には 3~4% (w/v) 濃度のショ糖が適当であった。また、植物体再生後に培養容器から出して順化する時期は、苗条 2 cm、貯蔵根様白色根 2 cm 以上の個体の割合が高くなる移植 45~60 日が適当であった。また、順化活着後は、3 か月までの 5℃ 冷蔵保存が可能であることを明らかにした。

不定胚からの苗化は、低いショ糖濃度 (0~1%) では発芽率が低く、生育量も劣った。ジャガイモやヤマノイモなどいも類の芋形成時の培養には、3% より高いショ糖濃度の添加が効果的とされており^{14,19)}、アスパラガスも貯蔵根の発達が重要であることから、さらに高濃度のショ糖添加を検討した。その結果、5% 以上では発芽が抑制され、苗数は減少した。したがって、苗化に適したショ糖濃度は、浅尾ら¹⁾の報告と同様に 3~4% 程度と考えられた。しかし、ショ糖濃度 6% で発芽した個体の生育と白色根の生長は旺盛であったことから、3~4% 濃度で発芽させた後に CO₂ 施用などの新たな炭素源の添加法の開発が必要と考えられた。

次に、不定胚の移植密度と植物体再生の効率化、順化の関係を検討した。1/1 強度の MS 培地にショ糖を 3% 添加した寒天培地を用い、1 容器 (カルチャーボトル) 当たり約 30 個の不定胚を移植して 45~60 日養成すると、苗条 2 cm、貯蔵根様白色根 2 cm 以上の割合が高くなり、80% 以上の高い順化活着率が得られた。この方法によると、1 容器当たり 20~30 本の苗が養成できる。しかも、カルチャーボトルは重ね置きができることから、培養室を有効

に活用できる効率的な養成法といえる。

Fig.1 に示した培養系を用いると、'ヒロシマグリーン' では多芽集塊から誘導・選抜して得られた優良な EC 1 g から4か月で25,000本の苗をほぼ確実に順化養成することが可能である(0.03 gのECをホルモン無添加の液体振盪培養後、細胞塊1g当り300個の双極胚を形成、発芽苗化率、順化率がそれぞれ80%として計算)。

なお、アスパラガスの大量増殖システムに重要な EC¹⁰⁾ や不定胚¹⁰⁾は、低温による半年以上の保存が可能であることが明らかにされており、また、活着後の苗の短期低温貯蔵も可能なことから、アスパラガス優良種苗の供給調節が可能と考えられる。

著者らは、既にアスパラガスの不定胚再生苗は、生育や品質が揃うことを報告している⁹⁾。広島県では、高品質、高収量で耐病性のある優良雄株の選抜事業を進めており、本技術の適用により農家の高収益・安定生産に貢献できると考える。

摘 要

本研究において、アスパラガスの優良株から誘導した embryogenic callus を用い、液体振盪培養を組み込んだ効率的で簡易な培養系を確立した。

1. アスパラガスの 'ヒロシマグリーン' ($2n=30$) の安定した不定胚形成が認められる embryogenic cell line を材料として用い、液体振盪培養系を組み込むことにより、効率的に大きさや形状の揃った不定胚が得られた。

2. 液体振盪培養後の球状胚は、寒天濃度 2~2.5%濃度の MS 培地に移植すると、約1か月で200~300個の正常な双極胚に発達した。これらの植物体再生率は約80%以上と極めて高く、苗条の水浸状化や2次的なカルス形成も殆ど認められなかった。

3. 不定胚(双極胚)からの植物体再生には、培地のショ糖濃度は3~4%が適当であった。

4. 再生植物体の順化時期は、高い活着率の得られる苗条 2 cm、貯蔵根様白色根(径 2 mm) 2 cm以上の大きさの個体の割合が高い移植45~60日後が適当であった。順化培土は、園芸育苗培土、パーミキュライト、パーライトの混合培土が適当であった。

5. 順化2か月後の苗は約3か月の短期低温貯蔵が可能であった。

謝 辞

本研究報告をまとめるに当り御指導や協力をいただいた

た農業技術センターの前重道雅所長、中沢啓一次長、生物工学研究所の上本哲所長、土屋隆生主任研究員及び重本直樹研究員に感謝の意を表する。

引用文献

- 1) 浅尾浩史・荒井 滋・小島博文：1991. アスパラガスの不定胚利用による大量増殖. 奈良農試研報22：1-8.
- 2) 長久 逸・甲村浩之・池田好伸：1991. アスパラガス的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) Fujimura, T. and A. Komamine：1979. Synchronization of somatic embryogenesis in a carrot suspension culture. *Plant. Physiol.* 64：162-164.
- 4) 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.
- 5) 甲村浩之・長久 逸・池田好伸：1987. アスパラガスの体細胞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. 園学雑56 別2：254-255.
- 6) ——：1988. アスパラガスの胚様体利用による大量増殖. 農業技術. 43(3)：115-119.
- 7) ——・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.
- 8) ——・——・——：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.
- 9) ——・伊藤徳右・重本直樹・井本征史：1992. アスパラガスの不定胚増殖株の特性. 園学雑61 別2：270-271.
- 10) ——・井本征史：1993. アスパラガスの Embryogenic callus・多芽集塊の低温培養による短期保存. 園学雑62 別1：198-199.
- 11) Kohmura, H., Chokyu, S：1993. Application of new micropropagating system involving somatic embryogenesis and induction of bud clusters in asparagus. 8th International asparagus symposium. New Zealand meet.
- 12) ——・——, and T. Harada：1994. An effective micropropagating system using embryogenic calli induced from bud clusters in *Asparagus officinalis* L. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 63(1)：in

press.

- 13) Kohmura, H., Sakai, A., Chokyu, S. and T. Yakuwa : 1992. Cryopreservation of *in vitro*-cultured multiple bud clusters of asparagus (*Asparagus officinalis* L. cv Hiroshimagreen(2n=30) by the techniques of vitrification. *Plant Cell Rep.* **11** : 433-437.
- 14) Mes M. G. and Menge I : 1954. Potato shoot and tuber cultures *in vitro*. *Physiol Plant* **7** : 639-649.
- 15) Murashige, T and F. Skoog : 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* **15** : 473-497.
- 16) 中島寿亀・国武久登・田中政信 : 1992. アスパラガスの胚様体利用による大量増殖 第1報 低温による胚様体の短期貯蔵と発芽率の向上. *園学雑*61別1 : 234-235.
- 17) 中村由紀・嵯峨均. 1992. アスパラガスのクローン苗生産. *化学と生物.* **30**(1) : 10-11.
- 18) 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.
- 19) 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) : 21-24.
- 20) Yang, H. J and Clore, W. J : 1973. Rapid vegetative propagation of asparagus through lateral bud culture. *HortScience* **8** : 141-143.

Simple and Effective Micropropagation System Through Somatic Embryogenesis in Asparagus (*Asparagus officinalis* L.)

Hiroyuki KOHMURA and Masashi IMOTO

Summary

In this study, development of somatic embryos, plant regeneration and efficiency of acclimation were investigated by using stable embryogenic cell lines of *Asparagus officinalis* L. 'Hiroshima Green'(2n=30).

1. Synchronized globular embryos were obtained after filtration with mesh from 2 weeks liquid suspension cultured embryogenic calli using MS medium without growth regulators.
2. Globular embryos developed to bipolar embryos on MS medium supplemented with 2-2.5% agar. The yield of the bipolar embryos was 200-300 per culture bottle. The rate of plant regeneration with vigorous white root from these bipolar embryos were about 80%. There were little vitrified plants and secondary callus-formed plants.
3. For the vigorous plant regeneration from bipolar embryos, 3-4% of sucrose concentration was effective.
4. For the habituation, the adequate periods of culturing *in vitro* was 45-60 days. The plants with shoot of more than 2cm and with vigorous root of more than 2cm were able to acclimate at high rate (80%) under the 1/5 strength of natural light at 25°C.
5. The acclimated plants were able to preserve at low temperature (5°C) for 3 months.

Key words : Asparagus, somatic embryogenesis, micropropagation

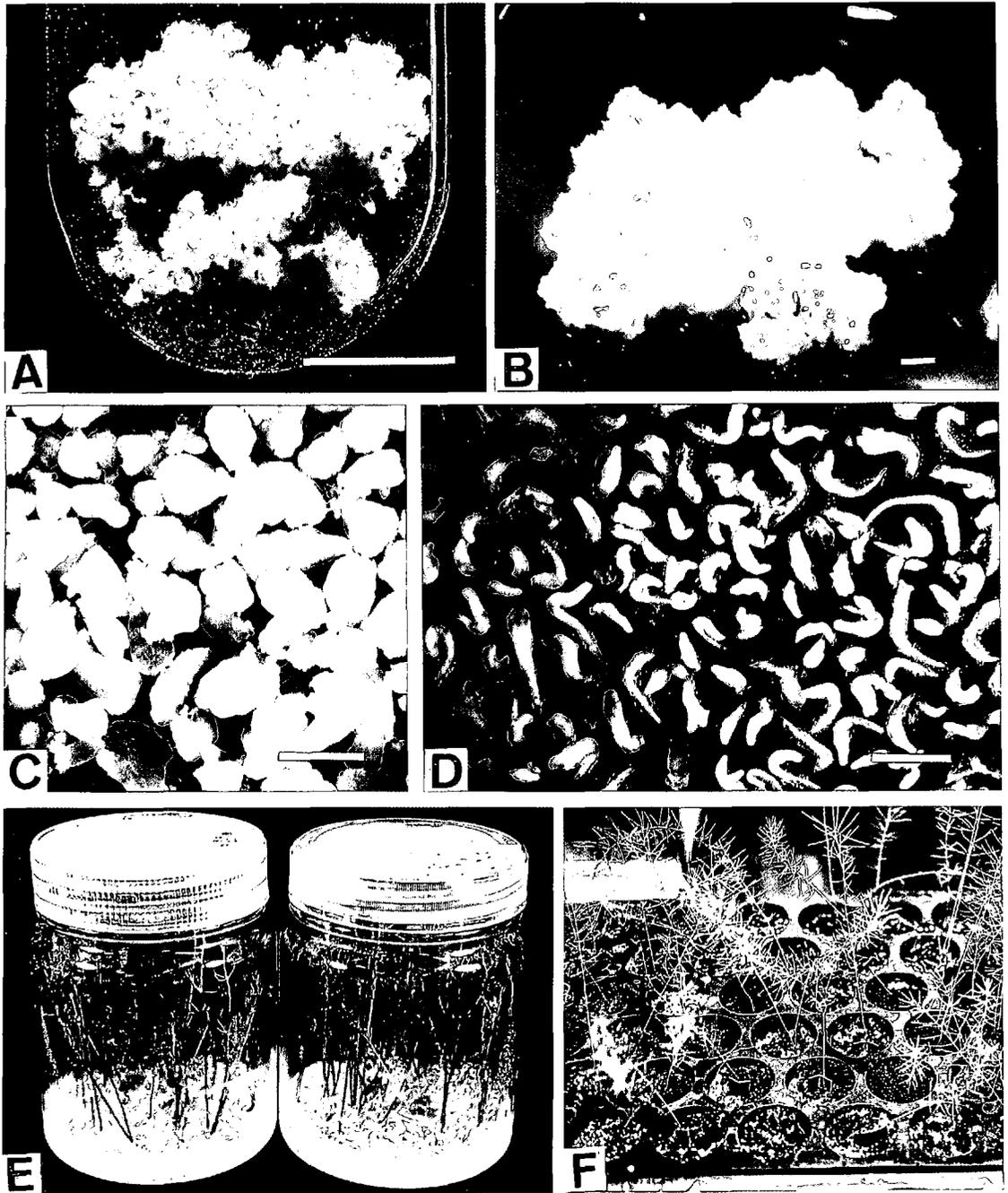


Fig.4 - A. Multiple bud clusters of 'Hiroshima Green' Sacle: 1cm
 B. Embryogenic calli (EC) of superior cell line of 'Hiroshima Green' Scale: 1mm
 C. Filter-synchronized globular embryos developed from EC in the course of 2 weeks liquid suspension culture using MS medium without growth regulators. Scale: 2mm
 D. Bipolar embryos developed from globular embryos. Scale: 1cm
 E. Plant regeneration from bipolar embryos with vigorous roots, without vitified shoots and secondary callus.
 F. Acclimation of plantlets using nursery-cell trays.