

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

甲村 浩之・長久 逸・池田 好伸

キーワード：アスパラガス，不定胚，胚様体，大量増殖，同調化，アブジジン酸，変異性

アスパラガス (*Asparagus officinalis* L.) 実生からの不定胚形成及び植物体再生については前報^{6,7)}で報告した。しかし、若茎から側芽培養して増殖した圃場株の組織からは実生の場合と同組成の培地でも **embryogenic callus** の誘導ができなかった。従って、収量性の高い優良品種として沖森らが育成した‘セトグリーン’ (4倍体)¹²⁾、‘ヒロシマグリーン’ (3倍体)⁹⁾には不定胚による増殖法が応用できない状況にある。

このため、本実験では、これら2品種の普及促進を目的として、圃場株で細胞生理活性が最も高いと考えられる若茎小側枝の茎頂組織を材料に用いた。この茎頂組織から **embryogenic callus** を誘導するためのホルモンとして実生で効果が認められた2,4-D添加を中心に、NAA やサイトカイニンであるベンジルアデニン (BA)、ゼアチン (zeatin) の効果を検討した。誘導した **embryogenic callus** からは不定胚形成時の培地やシヨ糖濃度による植物体再生率の差異を検討した。

また、**embryogenic callus** の継代中に形成し長期間放置した不定胚様組織から液体振盪培養中に形成した水浸状でない不定胚から植物体に再生する培地として、ゼアチンと胚の発達や再分化に関係するとされるアブジジン酸 (ABA) 添加を検討した。

さらに、‘ヒロシマグリーン’を親株として不定胚から再生した植物の変異性について、染色体数と形状変異を調査した結果、若干の知見が得られたので報告する^{9,10)}。

材料及び方法

1. 材 料

当農業試験場園芸部圃場に株保存されている‘セトグリーン’ (2n=40)、‘ヒロシマグリーン’ (2n=30) の若茎を5~7月に採取し、小側枝を含む頂芽から約10cm以内

の茎をよく洗浄し、長さ2cm程度に切断して70%エタノール (数秒)、有効塩素1%濃度のアンチホルミン液に15分振盪浸漬滅菌した。クリーンベンチ内でりん片葉を剥ぎ、実体顕微鏡下で茎頂を含む約1~2mmの組織を採取してカルス誘導の材料とした。

2. 培地の調整及び培養条件

基本培地はMS培地あるいはLS培地を用い、シヨ糖濃度は特に断らない限り3%とした。寒天は0.8%添加し、pH 5.8に調整してオートクレープで滅菌した。

カルスの誘導には、口径25mm長さ100mmのリップ付き試験管を用い、培地量は8mlとした。1試験管当たり1茎頂組織を移植した。カルス誘導後の継代培養や移植については各実験の項に記す。培養条件は、特に断らない限り、25℃、1,500~3,000lx、12時間照明とした。

3. 実験方法

実験1. 茎頂組織からの **embryogenic callus** 誘導のためのホルモン条件の検討

MS基本培地にピオチン (0.05mg/l)、葉酸 (0.5mg/l)、グルタミン (200mg/l) を添加し、2,4-D, NAA, BA をそれぞれ $0.5 \times 10^{-7} \sim 10^{-5} M$ の10水準 (Table 1, No.1~10) で添加した培地、またはLS培地に2,4-D を 10^{-6} から $10^{-5} M$ 、zeatin を 10^{-8} から $10^{-6} M$ を5水準 (Table 1, No.11~15) で添加した培地でカルスを誘導した。誘導したカルス及び球状胚は全てホルモン無添加のLS基本培地に移植して不定胚形成を試み、**embryogenic callus** の誘導を確認した。

実験2. **Embryogenic callus** からの不定胚形成培地及び不定胚からの再分化条件の検討

1) 不定胚形成のための培地濃度、シヨ糖濃度の検討

材料は、‘ヒロシマグリーン’の2,4-D $10^{-5} M$ 単独添

加培地で培養90日目に誘導されたembryogenic callusを用いた。これを1/4, 1/2, 1/1濃度のMS培地(シュ糖3%)あるいはピオチン(0.05mg/ℓ), 葉酸(0.5mg/ℓ), グルタミン(200mg/ℓ)等のビタミン類を添加したMS培地(シュ糖3, 5, 10%)計6水準の培地に移植して30日間継代培養した。継代培養後に得られた形状毎の不定胚及びカルスを6cmシャーレ(培地量5ml)に9個ずつ移植して植物体再生を検討した(Table 2)。

2) 液体振盪培養により増殖した不定胚からの植物体再生と培地濃度, ABA, zeatin 添加の効果

材料は, 'セトグリーン'の茎頂組織から $2,4-D10^{-5}M$, zeatin $10^{-7}M$ 添加のMS培地で誘導したembryogenic callusを用い, 180日後に $2,4-D10^{-5}M$ 単独添加のMS培地に移植した。移植後白色で肥大した長さ2~3mmの不定胚様の組織塊を形成したが, そのまま放置し計135日間培養すると固い光沢のある組織となった。これをホルモン無添加のMS培地に移植して30日間液体振盪培養(100rpm・23℃・500ℓx連続照明)した後, さらに同じ組成の培地に移植して振盪培養すると, 5日目には白色の球状胚を多数形成した(写真B左)。この球状胚はFig. 1に示すように2mmと1mm穴メッシュ(大阪飯田製作所製, THE IIDA TESTING SIEVE, 平板丸穴ステンレスメッシュ, 径80mm, 特別注問)に通してMS培地で数回洗浄した。その後, 1mmメッシュ上に残った同じ大きさの胚を採取し, さらに元の液体培地に戻して10日間振盪

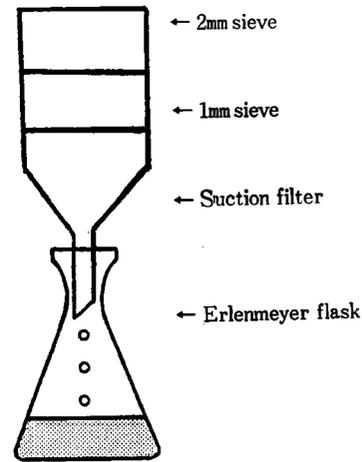


Fig. 1 Synchrony of globular embryo by sieving

培養すると棒状型(紡錘型)の胚に発達した(写真B右)。ほぼ均一な胚が多数得られたため, この胚からの植物体再生条件を検討した。

棒状型胚からの植物体再生は無菌シャーレ(径9cm)を用い, MSあるいは1/2 MS培地を基本として, ABAを0.1, 1.0mg/ℓ, zeatin $10^{-7}M$ 添加の8水準で行なった(Table 3)。

Table 1 Effect of hormone on embryogenic callus induction from apical meristem.

No.	Auxin		Cytokinin		'Setogreen'				'Hiroshimagreen'			
	2, 4-D	NAA	BA	Zeatin	Number of test	Number of induction			Number of test	Number of induction		
						Callus	Globular embryo	Embryogenic Callus		callus	Globular embryo	Embryogenic callus
1	—	10^{-5}	0	—	7	5	3	1*	7	7	3	0
2	—	10^{-5}	10^{-5}	—	7	5	1	0	7	7	2	0
3	—	5×10^{-6}	5×10^{-6}	—	7	4	1	0	7	7	0	0
4	—	5×10^{-6}	5×10^{-7}	—	7	4	0	0	7	7	2	1*
5	—	5×10^{-7}	5×10^{-7}	—	7	0	0	0	7	1	0	0
6	10^{-5}	—	0	—	7	1	0	0	7	6	3	0
7	10^{-5}	—	10^{-5}	—	7	5	1	0	7	7	7	0
8	5×10^{-6}	—	5×10^{-6}	—	7	5	3	0	7	7	1	0
9	5×10^{-6}	—	5×10^{-7}	—	7	4	3	0	7	7	0	0
10	5×10^{-7}	—	5×10^{-7}	—	7	0	0	0	7	1	0	0
11	10^{-5}	—	—	10^{-6}	10	9	8	0	8	8	6	0
12	10^{-5}	—	—	10^{-7}	10	10	10	1	8	8	8	1
13	10^{-5}	—	—	10^{-8}	10	9	2	1	8	8	5	0
14	10^{-6}	—	—	10^{-7}	10	10	0	0	8	8	0	0
15	10^{-6}	—	—	10^{-8}	10	10	0	0	8	8	0	0

No. 1~10 : After 62 day culture. No.11~15 : After 90 day culture.

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

実験3. 不定胚から再生した植物の変異性

親株が‘ヒロシマグリーン’ (3倍体, $2n=30$) である不定胚由来の再生植物124個体は、1990年7月15日に圃場に定植した。このうち40個体について若茎基頂組織の染色体数を調査した。また、一部の株の形状変異についても調査した。

結 果

実験1. 茎頂組織からの embryogenic callus 誘導のためのホルモン条件の検討

embryogenic callus の誘導は、培養62日後の調査結果で、培地No.1~10 (Table 1) の‘セトグリーン’では、 $NAA10^{-5}M$ 区で、‘ヒロシマグリーン’では $NAA 5 \times 10^{-6}M + BA 5 \times 10^{-7}M$ 区でそれぞれ7本中1本認められた。2,4-D単独区あるいは2,4-DとBAの組み合わせ区では誘導できなかった。しかし、NAAを用いて誘導した場合でも約60日目では embryogenic callus の確認は困難であり、カルスをホルモン無添加培地に移植すると不定胚を形成し植物体を再生したので、結果的に embryogenic callus を誘導していたと認めた。

また、培養90日後に調査したNo.11~15 (Table 1) の‘セトグリーン’では、 $2,4-D10^{-5}M + zeatin10^{-7}M$ 区と $2,4-D10^{-5}M + zeatin10^{-8}M$ 区で径2mm程度の embryogenic callus をそれぞれ10本中1本誘導した。これらは、ホルモン無添加培地に移植後、不定胚を形成し植物体に再生した。形成した不定胚数は、後者の zeatin $10^{-8}M$ 添加区が多かった。‘ヒロシマグリーン’では、 $2,4-D10^{-5}M + zeatin10^{-7}M$ 区の8本中1本で2個の球状胚を単離した。この球状胚はホルモン無添加のMS培

地に移植すると旺盛にカルスを形成し、次々と不定胚を形成後植物体を再生した。

実験2. Embryogenic callus からの不定胚形成培地及び不定胚からの再分化条件の検討

1) 不定胚形成のための培地濃度、ショ糖濃度の検討

$2,4-D10^{-5}M$ 単独添加のMS培地で誘導された径6mm程度の embryogenic callus は径2mm大に分割して6種類のホルモン無添加培地に移植した。この結果、無希釈のMS培地で最もよく増殖した。特にショ糖濃度3%では植物体再生も多かったが、MS培地濃度を1/2, 1/4に下げたり、ピオチン、葉酸、グルタミン等のビタミン類を加えショ糖を5%, 10%と高めた場合には植物体に再生するものが殆どなかった。しかし、ホルモン無添加培地で移植30日後に形成していた不定胚や増殖した embryogenic callus をホルモン無添加の培地に再移植した場合の植物体再生は、前培養でビタミンを添加したショ糖濃度5%の培地が最も良好であった。

2) 液体振盪培養により増殖した不定胚からの植物体再生と培地濃度、ABA, zeatin 添加の効果

不定胚様の組織塊をホルモン無添加のMS培地に移植して30日間液体振盪培養後、さらに同じ組成の培地に移植すると白色の球状胚を多数形成した (写真B左)。この球状胚は2mmと1mm穴メッシュで大きさのある程度均一にすることが可能であったので、1mmメッシュ上に残った胚をさらに元の液体培地に戻して振盪培養した。その結果、球状胚は棒状型の胚 (写真B右) に発達した。

この液体振盪培養で形成した白色で棒状型の胚からの植物体再生を検討した結果、培養40日後の調査ではホル

Table 2 Subculture on embryogenic callus propagation, embryo formation and plant regeneration.

No.	Subculture medium and plant regeneration*					Formed embryo type and plant regeneration**			
	Basic medium	Vitamine***	Sucrose (%)	Diameter of callus(mm)	Plant regeneration	Globular type	Banana type	Other type	Embryogenic callus
1	MS	—	3	15	7	0/9	3/9	1/7	3/6
2	1/2MS	—	3	15	0	—	—	1/9	2/9
3	1/4MS	—	3	8	0	—	5/18	1/9	6/9
4	MS	+	3	15	6	—	2/9	5/7	5/9
5	MS	+	5	15	1	4/9	5/9	4/9	9/9
6	MS	+	10	7	0	—	6/9	—	1/9

* : After 30 day culture. (MS hormone free medium)

** : After 20 day culture, embryo or callus were planted on MS hormone free medium with 0.7% agarose.

Size of embryo: globular type(1mm), banana type(2mm), the other type(3mm).

Numerator is number of plant-regeneration and denominator is number of test.

*** : + ; Biotine (0.5mg/l), folic acid (0.5mg/l), glutamine (200mg/l) were added.

Table 3 Effect of ABA or zeatin on plant-regeneration from somatic embryo.

No.	Basic medium	ABA (mg/ℓ)	Zeatin (M)	Number of test	Root formation*		Plant regeneration**	
					Root	White-root	40day	60day
1	MS	—	—	42	40	0	1	1
2	1/2MS	—	—	42	41	0	2	2
3	MS	0.1	—	42	42	1	5	5
4	1/2MS	0.1	—	42	41	0	3	5
5	MS	1.0	—	42	42	1	3	3
6	1/2MS	1.0	—	42	39	5	4	8
7	MS	—	10 ⁻⁷	42	36	2	4	4
8	MS	1.0	10 ⁻⁷	42	38	2	4	7

* : 'Root' is number of all rooted embryo.

'White-root' is number of only white-root rooted embryo, after 40 day culture.

** : Number of plant-regeneration, after 40 day and 60 day culture.

モン無添加区で、42個中1個のみ植物体に再生した。しかし、ABAやzeatin添加区では42個中3~5個体が植物体に再生した。また、培養60日後になると1/2MS培地、ABA 1.0mg/ℓ添加区では42個中8個体(再生率19%)の植物体再生がみられた。なお、この区では不定胚の中央部まで緑色化しているにもかかわらず、白色根を発生しただけの胚も多くみられた。

実験3. 不定胚から再生した植物の変異性

3倍体品種'ヒロシマグリーン'(2n=30)の不定胚からの再生植物体の染色体数を調査した。その結果、40個体中39個体は2n=30(写真F)で、1個体だけ2n=60の変異個体を確認した(写真H)。この個体は、生育当初は他の2n=30の個体と変わりのない生育をしたが、圃場に定植後擬葉の展開が抑制されて先端部が部分的に集塊状となる形状変異が認められた(写真G)。

考 察

アスパラガスの不定胚形成による大量増殖法は、収量性や品質等の優良な特性を持った株の増殖を目的として研究されている。Harada (1973)⁹⁾は、擬葉を材料として用い、BM基本培地に2,4-D, NAAを添加すると球状胚の他に不定芽、不定根しか分化しないカルス(non-embryogenic callus)が混在したカルスを誘導し、その中から球状胚だけを取り出して培養することにより不定胚による大量増殖が可能なることを報告した。しかし、Yangら¹⁰⁾が同じ年に報告したカルスを經由しない側芽培養による増殖法が実用化技術として採用されてきた。不定胚形成を基にする増殖法は、将来的には画期的な技術と認めながらも、プロトプラストからの植物体再生に

利用される等、育種利用として研究開発が進められてきたと考えられる。

1980年代の半ばになって、多くの作物で不定胚形成による増殖の報告例が増加してきた。アスパラガスの増殖法として、著者らの実生材料からの不定胚形成による増殖法は、馴化活着のよい白色根の発生率が高く、側芽培養法に替わる増殖法となる可能性を示した⁸⁾。

その後、栽培面積の全国的な拡大の気運を受けて、アスパラガスの不定胚形成の研究は、企業を含めて極めて活発化し、その中で平田ら⁵⁾は若茎莖頂組織を材料に用いることにより圃場株からのembryogenic callusの誘導を報告した。しかし、このカルスはNAA, BAを添加して得られた球状胚の他に不定芽、不定根しか分化しないカルスが混在したものであり、著者らが実生で2,4-Dを用いて誘導した黄白色でフライアブルなembryogenic callusとは異なるものであった。このため、著者らは圃場株の若茎莖頂を材料として用い、実験1で行なった方法で不定芽、不定根に分化するカルスを含まないembryogenic callusを誘導した。その後、不定胚を形成し植物体に再生したので優良品種の不定胚形成による増殖が可能となった。

本報告では、主として圃場株組織からの不定胚形成、液体振盪培養系と不定胚の発達および不定胚再生植物の変異性について考察する。

1. 実生及び圃場株組織からのembryogenic callus誘導と植物体再生の制御

アスパラガスの不定胚形成技術の開発は広島県で育成した先の倍数性優良品種を大量増殖し、早期普及を図ることにある。しかし、前2報はこの技術の確立を目的としていたために、細胞の活性が高く容易に扱える材料と

して、無菌播種して発芽した実生茎を用いた。

実生茎では、**embryogenic callus**の誘導が可能であったので、育成品種の側芽培養により増殖した苗条からの**embryogenic callus**の誘導を試みた。ホルモンの種類と濃度、 Sh_3 糖濃度等の種々の条件を検討したが、実生茎で誘導されたのと同様な黄白色でフライアブルなカルスは得られず、緑白色の硬いカルスや緑黄色で柔らかいが不定芽、不定根しか分化しないカルスの誘導が殆どであった。

そこで、圃場株で最も活性の高い組織として若茎の茎頂を直接用いる方法について検討した。しかし、60~90日の培養では、球状胚数個あるいは径2 mm程度の黄白色のカルスしか誘導されず、ホルモン無添加培地に移植して不定胚形成をみなければ**embryogenic callus**と確認できなかった。実生の場合には既に6~10mmのカルスに発達している時期で確認も容易であるが、圃場株からの**embryogenic callus**の誘導は多少緩慢である考えられた。

しかし、ホルモン無添加培地に移植後は不定胚を次々と形成するものがみられ、再移植することで植物体に再生した。このため、圃場優良株の不定胚による増殖の可能性が認められた。

次に、**embryogenic callus**をホルモン無添加の培地に移植した時の培地の濃度、ビタミン類の添加、 Sh_3 糖濃度とこれらの培地で形成した不定胚からの植物体再生を検討した。その結果、ホルモン無添加培地移植時に1/1の通常成分濃度のMS培地では Sh_3 糖濃度が3%と低いものでは次々と不定胚を形成し植物体を再生したが、 Sh_3 糖濃度5%、10%や培地濃度1/4では不定胚は形成するが植物体の再生にはホルモン無添加の培地に再移植することが必要であった。このことは、不定胚の生長制御による植物体再生の同調化の一手法として前報の結果と合わせ、 Sh_3 糖濃度や培地濃度を変化させることの有効性が示唆された。

2. 液体振盪培養系と不定胚の発達について

著者らの実験では、液体振盪培養で形成した不定胚が水浸状となり、植物体再生率が極めて低いことが問題となっている¹⁾。また、この問題は不定胚形成の研究者の間で一般的となっており、国武らの蒸留水処理法¹¹⁾、斉藤らの乾燥処理¹³⁾、および著者らによるアブジン酸の添加による不定胚の発達¹⁰⁾等、不定胚の水浸状回避の研究開発が行われているが、実用レベルに達していないのが現状である。

しかし、今回の実験(2-2)では、**embryogenic**

callusを誘導後、 $2,4\text{-D}10^{-5}\text{M}$ 添加のMS培地に移植することで白色の不定胚様組織を形成したが、この組織をホルモン無添加の液体培地移植時に形成された不定胚は水浸状とならず白色の胚に発達し植物体に再生した。このことは、不定胚様の組織が形成された時にそのままの培地で135日間も放置しており、培地はかなり乾燥し、培養組織も固く光沢があるなど乾燥していたため水浸状にならなかったと考えられた。このため、このような不定胚様組織を液体振盪培養の材料として、不定胚が水浸状とはならない系の開発も可能であると考えられる。

また、アブジン酸添加の効果については、**Ammirato**¹⁴⁾がヒメウイキョウやニンジンを材料に用いて不定胚の成熟に対する効果を初めて認めている。さらに、大豆やヒマワリ等でも成熟度が高くなる例が知られている²⁾。そのため、これまで不定胚からの植物体再生に効果の認められているゼアチンと共に、液体振盪培養で形成した白色の不定胚からの植物体再生について検討した。

その結果、アブジン酸やゼアチンの添加により白色根の発生や植物体再生が促進され、最高19%の植物体再生率であった。アブジン酸やゼアチン無添加区では植物体再生が殆どみられないことから、アブジン酸やゼアチンは不定胚形成と植物体再生に関与しているものと考えられる。

しかし、アブジン酸やゼアチン添加の効果については、今後不定胚が球状胚から棒状胚へ発達する効果、不定胚から植物体に再生する一連の系を確立する中で個々のホルモンによる同調化、再生率の向上についての検討を要する。

3. 不定胚再生植物の変異性

現在、アスパラガスの不定胚再生植物の変異性については、国武が12個体¹¹⁾、浦上が30個体¹⁵⁾のプロトプラスト培養系の不定胚再生植物の根端の染色体数を観察し、変異の出現度合いの調査を行なったが、実際に種苗として出荷する数千・数万の苗数のレベルでの変異に関する報告は皆無である。

国武、浦上の報告では、いずれも染色体数の変異は認められていないが、本実験では、前報と同様の茎頂細胞の観察で $2n=60$ の6倍体株が40個体中1個体観察され染色体数の変異が認められた。したがって、不定胚形成による増殖では、低率ではあるが変異の生じる可能性は考えられる。

培養変異の利用上の問題は、栽培上不利となる変異の程度と変異株の選別が可能かどうかである。今回、倍体変異として観察された $2n=60$ の株は不定胚からの

苗化時期には正常なものの特に変わらなかったが、苗条が20cm程度に伸長し、側芽が伸長し展葉する時期に頂芽部が集塊状に萎縮する形状変異が認められた。このような異常形態を示す再生植物は、栽培上問題となるので早期に発見して除去する必要がある。しかし、今回認められた変異株は、定植前における擬葉の展開の観察で選別できる範囲と考えられた。

なお、アスパラガスの変異の問題については、今後は萌芽時期の均一性、若茎の形状や色等、栽培や品質上問題となる特性について調査する必要がある。

摘 要

広島農試育成のアスパラガス‘セトグリーン’、‘ヒロシマグリーン’の2品種の圃場優良株の不定胚利用による増殖及び培養植物の変異性について検討した。

1. 若茎頂組織を材料とし、MS培地に2,4-D 10^{-5} Mと2,4-D 10^{-5} M+zeatin 10^{-7} ~ 10^{-8} M添加区で培養90日目にembryogenic callusを誘導できた。培養60日目ではNAA 10^{-5} MとNAA 5×10^{-6} M+BA 5×10^{-7} M添加区では、ホルモン無添加培地への移植でembryogenic callusの誘導を確認したが、2,4-Dの組合せでは誘導できなかった。

2. 不定胚は、embryogenic callusをホルモン無添加培地に移植して形成した。この培地にビオチン、葉酸、グルタミン等のビタミン類を添加し、ショ糖濃度を5%とした区で植物体再生率の高い不定胚を多く形成した。

3. 2,4-D 10^{-5} M添加のMS培地で形成し、135日間放置した不定胚様組織は、ホルモン無添加の液体培地に移植した。この組織から形成した棒状型不定胚は液体培地中でも水浸状にはならなかった。また、この不定胚からの植物体再生には、ゼアチン 10^{-7} Mとアブジン酸0.1~1.0mg/lの添加が効果的であった。

4. 培養株の変異性について検討するため‘ヒロシマグリーン’ (3倍体, 2n=30)を親株とした再生植物124個体を圃場に定植し、40個体の染色体数を調査した。その結果、39個体の染色体数は2n=30であったが、1個体は2n=60と変異が認められた。また、この変異株には擬葉が展開時に萎縮する等の形状変異が認められた。

謝 辞

本研究を進めるにあたり、広島大学総合科学部倉石晉教授、同理学部谷口研至講師から有益な御指導とご助言をいただいた。また当農試の生物資源開発部及び園芸部

の関係諸氏にも御助言、御協力をいただいた。ここに深く感謝の意を表す。

引用文献

1) AMMIRATO, P. V. : 1983. The regulation of somatic embryo development in plant cell cultures. *Bio/Technol.* 1 : 68—74.

2) ——— : 1989. Recent progress in somatic embryogenesis. *News letter. Interanatalinal Association for Plant Tissue Culture.* 57 : 2—16.

3) 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.

4) 長谷川繁樹・谷口義彦・沖森 當・寛 三男 : 1987. 倍数体アスパラガスの育成に関する研究 第2報 三倍体の育成とその特性. *広島農試報告.* 50 : 75—79.

5) 平田行正・荒木 肇・八鍬利郎 : 1988. アスパラガスの不定胚形成とその生長. *園学雑別*57(1) : 230—231.

6) 甲村浩之・長久 逸・池田好伸 : 1990. アスパラガスの不定胚形成による大量増殖 第1報 実生組織からの不定胚の形成と植物体再生. *広島農試報告.* 53 : 43—50.

7) ——— . ——— . ——— : 1990. ———. 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. *広島農試報告.* 53 : 51—61.

8) ——— . ——— . ——— : 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 不定胚の誘導法と植物体再生 *園学雑別*56(2) : 254—255.

9) ——— . ——— . ——— : 1989. ———. 第3報 圃場栽培株からの不定胚形成と植物体再生 *園学雑別*58(1) : 222—223.

10) ——— . ——— . ——— : 1990. ———. 第4報 不定胚の発達および植物体再生へのABAの効果 *園学雑別*59(1) : 272—273.

11) KUNITAKE, H and M, MII : 1990. Somatic embryogenesis and plant regeneration from protoplasts of asparagus (*Asparagus officinalis* L.). *Plant Cell Reports* 8 : 706—710.

12) 沖森 當・寛 三男・長谷川繁樹・谷口義彦 : 1984. 倍数体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.

13) 齊藤猛雄・西沢秀治・天野良彦・西村繁夫・松沢恒友 : 1989. ジェランガム濃度がアスパラガス体細胞胚の発達に及ぼす影響. 育学雑 39別2 : 72—73.

14) 浦上敦子 : 1990. アスパラガス葉肉単離細胞の培

養と体細胞胚經由による植物体再分化. 北海道農試研報 154 : 103—109.

15) YANG, H. J and CLORE, W. J : 1973. Rapid vegetative propagation of asparagus through lateral bud culture. HortScience 8 : 141—143.

Micropropagation of *Asparagus officinalis* L. through Somatic Embryogenesis.

3. Somatic embryogenesis and plant regeneration from spear of field crop.

Hiroyuki KOMURA, Suguru CHOKYU and Yoshinobu IKEDA

Summary

In order to develop micropropagation of *Asparagus officinalis* cv. 'Setogreen' and 'Hiroshimagreen', conditions of embryogenic callus induction, somatic embryo formation, plant regeneration and chromosome number of regenerated plant were investigated.

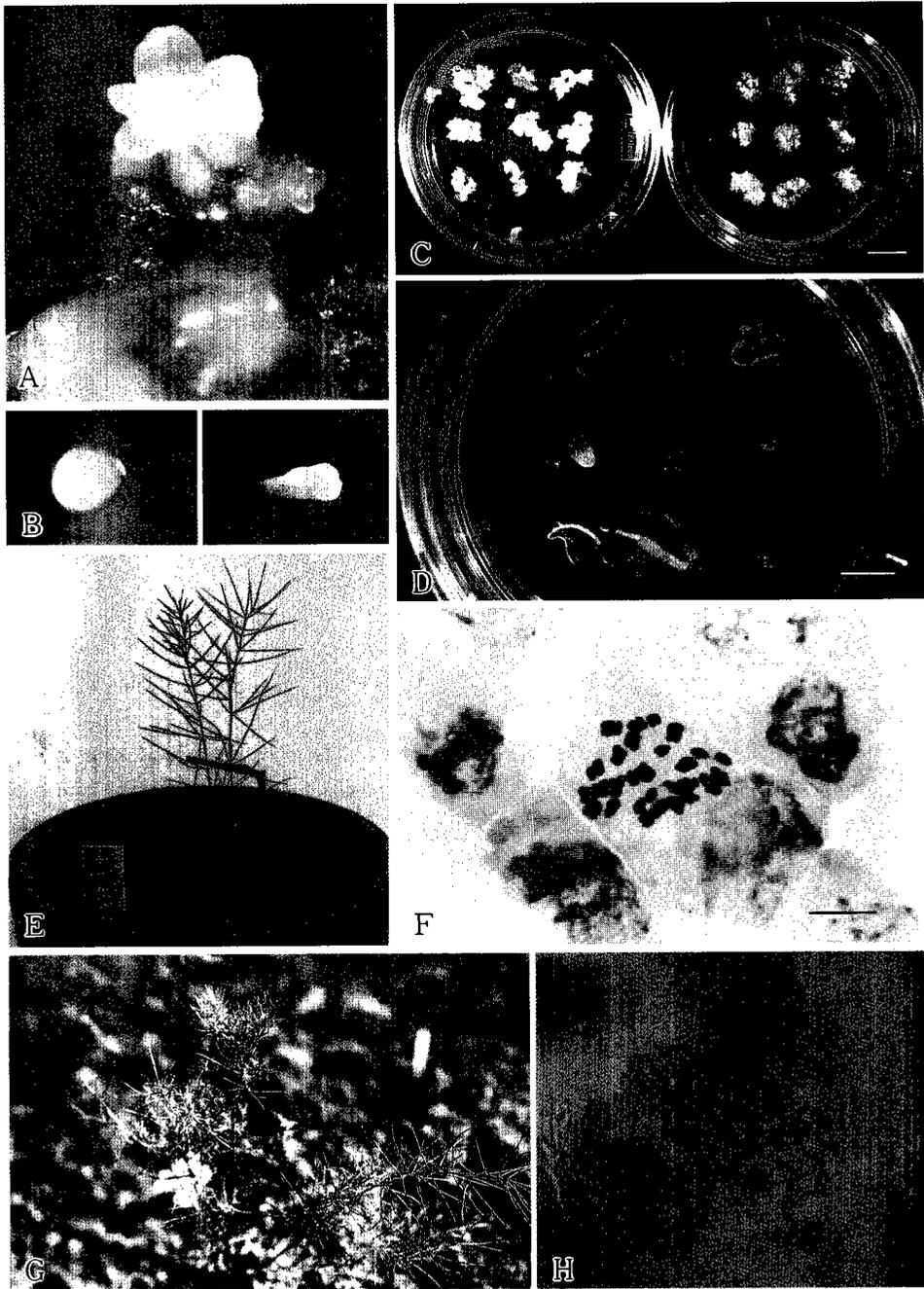
Embryogenic callus was obtained in MS medium supplemented with 10^{-5} M 2,4-D and 10^{-7} M zeatin from spear after 90 day culture.

Somatic embryo was efficiently formed in MS hormone free medium with biotine, folic acid, glutamine and 5% sucrose.

Somatic embryo like tissue were induced from embryogenic callus in solidified MS medium supplemented with 10^{-5} M 2, 4-D after 135 day culture. Almost all somatic embryo from it in liquid MS hormone free medium were not vitrified. Plantlets were efficiently regenerated in MS medium supplemented with 10^{-7} M zeatin and 0.1-mg/l abscisic acid from the embryo.

39 regenerated plantlets of 'Hiroshimagreen' ($2n=30=3X$) had chromosome numbers of $2n=30$ and only one had that of $2n=60=6X$. The 1st and 2nd lateral branch of $2n=60$ plantlet was partly withered.

Key words : Asparagus, somatic embryogenesis, micropropagation, synchrony, abscisic acid, chromosome number



A. Embryogenic callus with non-embryogenic callus. B. Globular and elongated embryo.
 C. Somatic embryo formation in MS hormone free medium with 5% sucrose.
 D. Plant-regeneration from somatic embryo on MS medium containing ABA and zeatin.
 E. Regenerated plant of 'Hiroshimagreen'. F. Chromosome of 'Hiroshimagreen' ($2n=30=3X$)
 G. Withered branch of $2n=60$ plant.
 H. Chromosomal change of regenerated plant of 'Hiroshimagreen' ($2n=60=6X$)
 Bars indicate 1mm (A, B), 1cm (C, D), 0.005mm(F, H)