



# アスパラガスの体細胞胚誘導に関する研究

齊藤, 猛雄

---

(Degree)

博士 (農学)

(Date of Degree)

1998-03-11

(Date of Publication)

2014-02-04

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2221

(JaLCD0I)

<https://doi.org/10.11501/3141266>

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002221>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



神戸大学博士論文

アスパラガスの体細胞胚誘導  
に関する研究

平成 10 年 1 月

齊藤 猛雄

# 目 次

略号説明

|  |     |
|--|-----|
| 緒 論  | 1   |
| 第1章 アスパラガスにおける安定かつ効率的な体細胞胚誘導法の確立                         | 9   |
| 第1節 アスパラガス embryogenic callus (EC)の誘導, 維持及び増殖法の確立        | 9   |
| 第2節 アスパラガス体細胞胚の効率的誘導法の確立                                 | 17  |
| 第3節 アスパラガスで確立した体細胞胚誘導法の他作物への応用<br>－ナスにおける安定かつ効率的な体細胞胚誘導－ | 28  |
| 第1章の要約   | 37  |
| 第2章 アスパラガス体細胞胚の発芽率向上及び斉一的発芽を目指した培養条件の検討                  | 39  |
| 第1節 アスパラガス体細胞胚の成熟を促す培養条件の検討                              | 40  |
| 第2節 アスパラガス体細胞胚と接合胚におけるタンパク質泳動パターンの比較                     | 56  |
| 第2章の要約   | 66  |
| 第3章 アスパラガス体細胞胚誘導時に発現する遺伝子の解析                             | 67  |
| 第1節 アスパラガス体細胞胚誘導時に乾燥条件下で発現する遺伝子の解析                       | 68  |
| 第2節 アスパラガス体細胞胚誘導時に湿潤条件下で発現する遺伝子の解析                       | 81  |
| 第3章の要約   | 92  |
| 第4章 総 合 考 察  | 93  |
| 摘 要  | 98  |
| 謝 辞  | 102 |
| 引用文献   | 103 |

## 略号説明

|                 |  |
|-----------------|--|
| ABA             | abscisic acid  |
| BA              | benzyladenine  |
| bp              | base pair  |
| DIG             | digoxigenin  |
| dNTP            | mixture of ATP (adenosine 5'-triphosphate), CTP (cytidine 5'-triphosphate),<br>GTP (guanosine 5'-triphosphate) and TTP (thymidine 5'-triphosphate) |
| EC              | embryogenic callus   |
| GA <sub>3</sub> | gibberellin A <sub>3</sub>   |
| IAA             | indole-3-acetic acid   |
| IBA             | indole-3-butyric acid  |
| KD              | kilodalton   |
| KIN             | kinetin  |
| LS              | Linsmaier & Skoog's medium (Linsmaier & Skoog, 1965)   |
| MS              | Murashige & Skoog's medium (Murashige & Skoog, 1962)   |
| NAA             | $\alpha$ -naphthaleneacetic acid   |
| PAGE            | polyacrylamide gell electrophoresis  |
| PCR             | polymerase chain reaction  |
| SDS             | sodium dodecyl sulfate   |
| SSC             | 0.15 M sodium chloride, 0.015 M sodium citrate buffer  |
| TAE             | Tris- acetate, EDTA buffer   |
| TBE             | Tris- borate, EDTA buffer  |
| TE              | Tris- HCl, EDTA buffer   |
| TIBA            | 2, 3, 5-triiodobenzoic acid  |
| 2,4-D           | 2,4-dichlorophenoxyacetic acid   |

## 緒 論

アスパラガス(*Asparagus officinalis* L.)は、ユリ科、アスパラガス属に属する地中海東部地域原産の野菜で、世界で約 300 種あるアスパラガス属の中で食用として栽培されている唯一の種である。

ヨーロッパ地域では、古くから栽培が行われ、11 世紀フランスにおける修道院の記録に初めて野菜としてのアスパラガスが記載されている。アメリカ大陸へは移住民によって伝えられ、現在ではカリフォルニア地域を中心に世界的産地となっているほか、ニュージーランドやオーストラリアでも栽培されている。アジア地域では、台湾、タイ、中国、インドネシアなどの国々で栽培が行われている。

我が国へは江戸時代に導入されたが、この当時は観賞用（オランダキジカクシ）として植えられていたに過ぎない。その後、明治時代にはアメリカ合衆国から導入された食用アスパラガスが北海道で栽培され、大正時代から本格的な栽培が始まった。北海道ではその後も栽培面積が増加したが、第 2 次世界大戦によって大幅に減少した。戦後は、北海道、東北、中部高冷地を中心に缶詰用のホワイトアスパラガスの栽培面積が増加し、近年では、食生活の洋風化・多様化により、グリーンアスパラガスの需要が増加し、また、農家の高齢化に伴う作付け変更によって、四国、九州等の西南暖地でもグリーンアスパラガス栽培が盛んとなり、栽培面積が急激に増加している。さらに周年供給に向けて栽培様式は分化する傾向にある。

アスパラガスの作型は、露地栽培が主体で、これにトンネル栽培、ハウス栽培や近年、広島県で開発され、西南暖地で主に取り入れられている母茎留茎栽培（全期立茎栽培）(伊藤ら, 1994)など、作型が多様化しているが、いずれの栽培法においても生産量及び品質は、定植した株の能力に左右される。したがって、高品質かつ高収量を得ることができる株のみを定植することが望まれている。しかしながら、アスパラガスは基本的に雌雄異株性であるため自殖が不可能であること、株分け（可

能であるが増殖率が低い), 挿し木または取り木等の栄養繁殖が困難であること, 及び永年性のため収量性の評価には播種後 5~8 年程度を要する(浦上ら, 1995) ことから, 諸形質の遺伝性についてはほとんど明らかにされていない。そのため, 効率的な育種は遅れており, 同一品種内でもヘテロ性が高く, 品質及び収量性に優劣のある株が同一圃場内に混在しているのが現状である。

アスパラガスの植物としての特性及びこれまでに行われてきた育種について概観すると, アスパラガスは性比が 1 : 1 の雌雄異株であり, 性の遺伝は性染色体上にある一对の性決定遺伝子によって支配されている。雌株の性決定遺伝子はホモ(XX), 雄株はヘテロ(XY)で(Rick & Hanna, 1943; Reinmann-Philipp *et al.*, 1959), 雄株の花は雌ずいの退化度により雄から両性花まで種々の花型を持つことが報告されている(Franken, 1970)。両性花を持つ雄株(雄性同株)は自殖, 他殖ともに可能であるが, その出現頻度は極めて低い。植物ホルモンを処理して両性花を形成させる試みも行われたが, 稔性あるものは得られていない(Lazarte & Garrison, 1980)。これらのことから, アスパラガスはほぼ完全な他殖性であるといえる。個体内及び集団内における遺伝的な雑ばく性が高い(Lallemand *et al.*, 1994)ことに加えて, 自殖してホモ性を高めると強い自殖弱勢を示すことから種々の形質の遺伝性はほとんど明らかにされておらず, 特定の形質付与を目的とした積極的な交配育種はあまり進んでいない。現状でも, 集団内で長期間にわたって品質及び収量性の高かった株を優良株として選抜し, それらを交配親として優良株同士の一代雑種を作出するという育種法がアスパラガス育種の主流である。この方法で育成された‘Limbras’という品種は育成開始から 20 年以上の年月を要した(Reuther, 1983)という例からも明らかなように, 長期間を要する上に品種内の均一性が高くない。多元交配によって優良遺伝子を集積するとともに育種年限を短縮する方法が Corriols-Thevenin (1979)によって考案されたが, この方法によっても商業ベースでの種子生産までに約 10 年を要する上に品種内の均一性に問題が残る。このように品種内及び育種過程における交配親系統の均一性を高めることがアスパラガス育種では重要である。

前述したように, アスパラガスは基本的に雌雄異株であることから雄株と雌株の性状比較(収量・

茎の太さ・茎数等)が検討されてきた(Franken, 1970). 一般的に, 同一集団内においては雄株のほうが雌株よりも株当りの発生茎数が多くて収量性が高く, 早生性が強い. 茎の太さは雌株のほうが一般的に太いが, 商品としての太さは雄株が雌株よりも適当な太さで揃いも良い傾向にある. したがって, 雄株の多収性と, 雌株の実生による雑草化の問題から, 雄株のみを圃場へ定植することが望まれている. アスパラガス性染色体は  $L_5$  染色体であることが 3 倍体を用いたギムザ染色法によって同定されているが(Loptien, 1979), 性染色体観察による 2 倍体の性判別は成功していない. 最近, アスパラガスの性を決定する遺伝子に近い RFLP プローブ 1 個が見出されたが(Restivo *et al.*, 1995), 花芽分化期前である定植時に雌雄を判別するには至っていない. アトラジン類の処理によって定植前の実生苗を開花させる試み(Abe *et al.*, 1987)やアイソザイム分析によって雌雄を判別する試み(Maestri *et al.*, 1991)も行われているが, 実用化には至っていない. 以上のように, 雄株のみを本畑に定植するという方法は確立されていない. そこで, 雄株のみの品種(全雄性品種)の育成が古くから試みられている(Sneep, 1953a, b). 出現頻度は低いが, 両性花を有する雄株(XY)を自殖して YY の遺伝子型を有する株を作出する. この株は超雄株と呼ばれ, 形態的には雄株と同じ形の花器を持ち, 雌株(XX)に超雄株(YY)を交配すると, その  $F_1$  はすべて雄株(XY)となる. しかし, 両性花を利用する方法では特定の株からの超雄株作出が困難なため薬培養を用いた半数体作出による純系雄株(YY: 超雄株)と純系雌株(XX)の育成が試みられているが(Hondermann & Wilberg, 1973), 実用化には至っていない.

個体の遺伝的な雑ぱく性を解消するためには, 両性花の自殖や薬培養による半数体の作出・倍化が考えられる. また, アスパラガスでは半数体を得る手段の一つとして多胚種子の利用が試みられたが(Marks, 1973), 出現率が極めて低く, 特定の個体から半数体を得ることは困難であった. そこで薬培養による半数体・ホモ 2 倍体の作出が検討されてきた(八畝ら, 1972; Inagaki *et al.*, 1983; Wolyn & Feng, 1993). しかしながら, 個体のホモ性を高めると弱勢が強くと現れ, 雑種強勢育種として  $F_1$  を作出しても効果が得られない場合もある(Ito & Currence, 1964). したがって, 組合せ能力の検定を行

い、優良組合せを見出すことが最も重要となる。

このような状況の中で、より品種内の均一性を高めるため、またはホモ化を進めて弱勢が生じ、採種が困難となった交配親を維持・増殖するために効率的な栄養繁殖法が検討されてきた。それらの中で、株分けは可能であるが増殖率は高くても数倍程度と低い。地上茎の節部に鱗芽群(aerial crown)の誘導を試みた例もあるが、実用化には至っていない(Yang & Clore, 1973)。そこで、古くから組織培養による大量増殖が有望と考えられ、茎頂培養法を中心に数多くの検討が行われてきた(Loo, 1946; Galston, 1948; Andreassen & Ellison, 1967; Murashige *et al.*, 1972; Morel, 1972; Hasegawa *et al.*, 1973; Matsubara, 1973; Yang & Clore, 1974a, b, 1975; Yang, 1977; Chin, 1982; Desjardins *et al.*, 1987; Khunachak *et al.*, 1987; Shigeta *et al.*, 1996)。しかしながら、茎頂培養法では1つの外植片から数個体しか増殖できない。さらに、培養幼植物の培養容器外への移植から順化にかけての生存率が低いために、増殖率は低い。茎頂培養法以外にはカルスを誘導して不定芽や不定根を再分化させる方法(Gorter, 1965; 八鍬ら, 1971a, b; 原田&八鍬, 1973)、葉肉単離細胞(浦上, 1990)やプロトプラスト(Bui Dang Ha & Mackenzie, 1973; Bui Dang Ha *et al.*, 1975; Kong & Chin, 1988; Kunitake & Mii, 1990)からの植物体再生も報告されているが、効率よい再分化系は確立されておらず、実用化には至っていない。

組織培養を利用して植物の大量増殖を行う場合、脱分化の過程を経ずに器官から直接的に芽や根を生長させる方法と脱分化させてカルスを増殖させた後に不定器官を分化させる方法に大別される。前者の方法には茎頂培養法が含まれ、後者の方には不定芽、不定根または不定胚誘導法が含まれる。一般的に前者の方法は技術的に容易で適用可能な植物種も多く、遺伝的に安定する傾向にあるという利点がある一方で、労力の割に増殖率が低く、その結果として苗の生産コストが高くなるという欠点を持つ。これに対して後者の方は、供試材料や培地へ添加する植物ホルモン類の種類や濃度等の再分化条件について詳細に検討する必要がある、前者の方法よりも技術的に難しい。しかしながら、増殖率は非常に高いという利点を有する。苗の価格が比較的高くても流通が可能な高級花き類や観葉植物等では生産コストのかかる茎頂培養法でも実用化されているが、苗及び種子の価



格が安い穀類や野菜類ではよほどの付加価値を付与しない限り茎頂培養法程度の増殖率では実用化は不可能である。不定胚誘導法は、茎頂培養法よりも増殖率を飛躍的に高くすることができるため、コストダウンを図ることができる。また、液体培養しやすいことから装置の大型化、培養の自動化が可能であり(Preil & Beck, 1991)、人工種子の内容物としても適している(Gray, 1991)ことから、穀類や野菜類の大量増殖法として注目されている。

これらのことから、本研究ではアスパラガスを栄養繁殖的に大量増殖するための方法として不定胚誘導法の検討を試みた。なお、不定胚という用語には生殖細胞由来の胚、例えば花粉からの半数性胚も含まれる。ここでは優良な植物のクローン増殖のための体細胞からの不定胚誘導を目的としているため、以降、体細胞胚(somatic embryo)または体細胞胚形成(somatic embryogenesis)という用語を用いることとする。

以下に、体細胞胚誘導の進捗状況を概観すると、1958年にニンジンで初めての体細胞胚形成が報告されて以来(Reinert, 1958; Steward *et al.*, 1958)、体細胞胚形成に関する研究は世界各国の多くの研究者たちによって進められてきた。1975年までに体細胞胚誘導に成功した植物は、セリ科の8種の他に双子葉植物で13種、単子葉植物で2種の合計23種にすぎなかったが(西村ら, 1990)、1980年頃から多くの植物で体細胞胚誘導に成功し始めた。この理由の一つは材料部位の選択を詳しく検討したことである(Ammirato, 1989)。1980年頃からの約10年間に体細胞胚誘導に成功した植物種の数は飛躍的に増加した。1989年には56科161属243種の植物で成功し(西村ら, 1990)、現在も増加中である。著者がアスパラガスの効率的な体細胞胚誘導系の確立に関する研究に着手した1986年当時、約80種の植物で体細胞胚誘導が報告されていたが(Williams & Maheswaran, 1986)、容易に体細胞胚誘導が可能であったのはニンジン(鎌田 & 原田, 1979)やセロリ(平林, 1990)等のセリ科植物に限られていた。

アスパラガスの体細胞胚誘導については、1968年に初めて報告されて以来(Wilmar & Hellendoorn, 1968)、1986年当時までに2つの報告がみられた(Steward & Mapes, 1971; Reuther, 1977)。これらの報

告では、用いられた基本培地が LS (Linsmaier & Skoog, 1965) (Wilmar & Hellendoorn, 1968; Reuther, 1977) または MS (Murashige & Skoog, 1962) (Steward & Mapes, 1971) で、組成に大きな違いはないが、供試部位は、無菌実生の胚軸 (Wilmar & Hellendoorn, 1968)、若茎の茎頂部や側芽部 (Reuther, 1977) または茎切片 (Steward & Mapes, 1971) と異なっているほか、培地中へ添加する植物ホルモンも 2,4-D と KIN (Wilmar & Hellendoorn, 1968)、NAA (Steward & Mapes, 1971)、NAA と KIN または IAA と BA (Reuther, 1977) と異なっており、一定の規則性は見出されていなかった。さらに、これらの方法は再現性に乏しく、偶然的に体細胞胚形成が観察されたと思われる報告もある。このように 1986 年当時としては大量増殖に利用しうる安定的なアスパラガス体細胞胚誘導系は確立されていなかった。

安定的に体細胞胚を誘導する培養系が確立された場合、次のステップとして体細胞胚の形成と発育の同調化ならびに発芽率の向上が実用上極めて重要となる。液体培地で増殖中のニンジンカルスをふるいを用いて大きさを揃え、さらにそれらの集団から密度のよく似た集団を遠心法を用いて集め、これらの性質の似た細胞を再分化させることによって体細胞胚の形成・発育の同調度をかなり高めることに成功した例 (Fujimura & Komamine, 1979) や ABA を添加して体細胞胚の発育を正常化し、早生発芽 (precocious germination) を抑えたり (Kamada & Harada, 1981; Ammirato, 1983a)、体細胞胚を乾燥させることで正常な発芽を促した例もある (Gray, 1987; Carman, 1988; Parrot *et al.*, 1988)。しかしながら、これらは各々の材料に対しては効果的であっても材料が異なれば効果が見られない場合も多い。汎用性の高い培養条件を検索するには、正常に発芽するか否かという現象面のみに注目するのではなく、ある条件に対して体細胞胚が質的にどのような変化を示すかという生理的、生化学的な研究が必要である。このような観点から、体細胞胚の内生 ABA 及び IAA の含量を測定したり (Etienne *et al.*, 1993b)、タンパク量を測定して (Lecouteux *et al.*, 1993)、種子中の接合胚と比較する (Hakman, 1993) 等の研究が開始され始めた。このように、体細胞胚の形成に関して内的な解析が始められたが、アスパラガスに関してはこのような研究例は皆無であった。

体細胞胚誘導には、まず体細胞胚形成能力の高いカルス (embryogenic callus; EC) を誘導することが

不可欠であるが、それを誘導するための培養条件は明らかとなっておらず、少なくともオーキシンは不可欠であるといわれている(Fujimura & Komamine, 1980). 一般的に、高濃度のオーキシンにより体細胞胚形成能力を有するカルスを誘導し、低濃度のオーキシンとサイトカイニンもしくは植物ホルモンのない状態で体細胞胚を形成させる。また、培地中の窒素源として還元型窒素が必要とされている(Kamada & Harada, 1979; Walker & Sato, 1981; Gleddie *et al.*, 1983). 多くの研究例の中で共通しているのは上述の 2 点程度で、例外も多く、統一的な法則性は見出されていないといえる。そのために、体細胞胚を誘導するにはその都度、試行錯誤的に培養法の検討を行う必要があり、その過程で要する労力は極めて大きい。アスパラガスに限らず、種々の植物の大量増殖に体細胞胚誘導を利用するには、体細胞胚誘導の機構を解明し、普遍的な法則性を明らかにする必要がある。

近年、遺伝子工学的手法を利用して、植物分野でも種々の現象の機構が生化学的、分子生物学的に明らかにされつつある。体細胞胚誘導に関しては、体細胞胚形成能力を有する細胞(群)を同定するための生化学的マーカーが明らかにされた(Everett *et al.*, 1985; Stirn & Jacobsen, 1987; Chibbar *et al.*, 1988; Fransz *et al.*, 1989; Coppens & Dewitte, 1990; Martinelli *et al.*, 1993). さらに、胚発生過程で発現しているタンパク質(Chen & Luthe, 1987; de Vries *et al.*, 1988; Boyer *et al.*, 1993)、胚で特異的に発現するタンパク質(Sung & Okimoto, 1981; Hahne *et al.*, 1988; Kiyosue *et al.*, 1991, 1992; Hilbert *et al.*, 1992) や EC 誘導時に発現する遺伝子(Momiyama *et al.*, 1995)が明らかにされ、体細胞胚形成時に特異的に発現している遺伝子が単離されつつある(Borkird *et al.*, 1986; Choi *et al.*, 1987; Wilde *et al.*, 1988; Aleith & Richter, 1990; Ulrich *et al.*, 1990; Kawahara *et al.*, 1992; Kiyosue *et al.*, 1992, 1993; Wurtele *et al.*, 1993; Mizobuchi-Fukuoka *et al.*, 1996). 特に PCR 法(Saiki *et al.*, 1988)が普及して以降は、かつては検出が困難であった微量な変化を簡便にとらえることが可能となり、研究は驚異的に進展しつつあるといえる。現在は、体細胞胚誘導に関連したタンパク質や遺伝子に関するデータを蓄積している段階であるが、今後、蓄積されたデータを総合して解析することによって体細胞胚誘導の機構が解明されると思われる。現在のところ、これらの研究は体細胞胚誘導が容易なニンジンを中心とした双子葉植

物で主に進められ、単子葉植物では研究例が少ない。植物全般にわたる体細胞胚形成機構の解明のためには単子葉植物においてもこのようなデータを蓄積する必要がある。そのような観点から、単子葉植物であるアスパラガスで体細胞胚形成時の遺伝子発現に関する解析を行うことは重要である。

以上に述べてきたアスパラガス育種の現況をふまえ、本研究では大量増殖の実用化に有効な体細胞胚誘導系を確立するための基礎的な条件の解明及び他の作物への応用を考慮した体細胞胚誘導のメカニズム解明のために、次の事項について検討した。

- 1) アスパラガスの EC を安定的に誘導するための、培地中の植物ホルモンの種類と濃度及び供試外植片の種類について検討した。また、EC から効率的に体細胞胚を誘導するための培養容器内の環境条件について検討した。さらに、確立した培養系の汎用性をナスを用いて検討した。
- 2) EC から誘導された体細胞胚からの発芽率を向上させるための条件を検討した。また、体細胞胚中のタンパク質を分析し、種子中の接合胚の場合と比較解析した。
- 3) 体細胞胚誘導のメカニズムを解明することを目的として体細胞胚誘導時に特異的に発現する遺伝子の単離を試みた。

以上の検討をふまえて、体細胞胚を用いたアスパラガス大量増殖法の実用化への可能性について考察した。

## 第1章 アスパラガス(*Asparagus officinalis* L.)における 安定かつ効率的な体細胞胚誘導法の確立

優良個体を大量増殖する重要性の高いアスパラガスにおいて、安定かつ効率的な体細胞胚誘導法の確立を試みた。これまでに報告された方法は再現性に乏しい上に再分化効率が低かった。そこで、本章では実用的な大量増殖に利用できる体細胞胚誘導系を確立するための条件を明らかにすることを試みた。第1節では体細胞胚形成能を有するカルス(Embryogenic callus: EC)の性状を明らかにし、それを誘導、維持、そして増殖するための培養条件を検討した。第2節ではECから効率的に体細胞胚を誘導するための培養条件、特に培養容器内の環境条件に着目して検討した。第3節ではアスパラガスで確立した体細胞胚誘導系の汎用性をナスを材料に検討した。

### 第1節 アスパラガス embryogenic callus (EC)の誘導、維持及び増殖法の確立

アスパラガスは雌雄異株の植物であり、同一品種内であってもヘテロ性が非常に高い。それゆえに高収量かつ高品質を得るには優秀な株をクローン増殖することが重要である。茎頂培養を利用したアスパラガスのクローン増殖が多く試みられているが(Loo, 1946; Galston, 1948; Andreassen & Ellison, 1967; Murashige *et al.*, 1972; Morel, 1972; Hasegawa *et al.*, 1973; Matsubara, 1973; Yang & Clore, 1974a, b; Yang, 1977; Chin, 1982; Desjardins *et al.*, 1987; Khunachak *et al.*, 1987; Shigeta *et al.*, 1996), これらの方法は、労力の割に増殖効率が低く、実用的でない。茎頂培養法よりも増殖効率が高く植物の大量増殖に適した方法としては体細胞胚誘導法が挙げられる(Ammirato, 1983b).

体細胞胚誘導を再現性よく、かつ安定的に行うにはECを誘導することと誘導したECを選抜及

び増殖することが重要である。ECを誘導するには、培地へ添加する植物ホルモンの種類や濃度等の条件を検討することに加えて、材料（外植片）の選択を検討することが重要である(Ammirato, 1989)。また、ECを選抜するにはその性状を明らかにする必要がある(Vasil, 1987)。アスパラガスでは、胚軸(Wilmar & Hellendoorn, 1968)や茎切片(Steward & Mapes, 1971; Reuther, 1977)から体細胞胚を誘導した例がある。しかしながら、これらの報告では、ECの性状が明らかにされず、ECを選抜していないことから、再現性が低く、安定的な培養系とは言い難い。

本節では、アスパラガスの安定かつ効率的な体細胞胚誘導系を確立するための第一段階としてECを誘導するための培養条件を明らかにするとともに、ECの性状を明らかにし、維持及び増殖する方法を検討した。

## 材料及び方法

### 1. 供試材料

日本におけるアスパラガスの主要品種の一つである‘Mary Washington 500W’を供試した。

### 2. EC誘導条件の検討

供試組織（外植片）は、無菌播種後14日目の実生を切断した場合と、圃場で栽培していた同品種の成株（3年生株）の若茎から側芽部の茎頂組織を切り出した場合を検討した。

無菌実生を材料とする場合、種子を有効塩素濃度1%の次亜塩素酸ナトリウム（アンチホルミン）によって15分間滅菌処理し、続いて滅菌水で3回洗浄した。滅菌した種子を2%ショ糖と0.8%寒天を含む1/2濃度のLS培地へ無菌的に播種し、 $27\pm 1$ ℃、16時間日長（約3000 lux）で生育させ、無菌幼植物を養成した。以降、すべての培養は同一条件下にて行った。14日後に地上部が約30 mmに伸長した無菌実生の第1次茎、鱗芽部及び根の各部位を約10 mm長に切断し、次のような培地へ

置床した。すなわち、2% ショ糖と0.8% 寒天を含むLS培地を基本とし、NAA (0.5, 5, 30  $\mu\text{M}$ )とBA (0.5, 5, 30  $\mu\text{M}$ )を組み合わせた9種類または5  $\mu\text{M}$  2,4-Dを含む培地の合計10種類の培地を供試した。誘導されたカルスは、外植片の置床1カ月後にそれぞれ同じ組成の培地へ継代した。さらに1カ月後に、カルスの性状を調査し、ECと思われるカルスを分離した。

成株を材料とする場合、野菜・茶業試験場内圃場（三重県安芸郡安濃町）で萌芽し、草丈約10～20 cmに伸長した若茎を採取し、種子の場合と同様の方法で滅菌した。滅菌後に若茎の鱗片葉を除去し、実体顕微鏡下で大きさ0.5～4 mmの側芽茎頂部を切り出して次のような培地へ置床した。すなわち、2% ショ糖と0.8% 寒天を含むLS培地に5  $\mu\text{M}$  2,4-Dを添加した培地とした。

### 3. ECの維持及び増殖条件の検討

選抜したカルスを次のような固形及び液体培地へ移植した。すなわち、(1) 2% ショ糖と0.8% 寒天を含むLS培地を基本とし、NAA (0.5, 5, 30  $\mu\text{M}$ )とBA (0.5, 5, 30  $\mu\text{M}$ )を組み合わせた9種類及び2,4-D (0, 0.01, 1, 5, 10  $\mu\text{M}$ )とBA (0, 0.5  $\mu\text{M}$ )を組み合わせた10種類の合計19種類の培地へ移植した。2週間毎に同組成の培地へ継代し、移植1カ月後にカルスの性状を調査した。または、(2) 5もしくは10  $\mu\text{M}$ の2,4-Dを含む30 ml LS液体培地中で毎分100回転の回転振盪培養して維持及び増殖を図り、1週間毎に継代した。継代は、新鮮重約80 mgの細胞を30 mlの新しい培地を入れた100 mlの三角フラスコに移植して行った。継代1週間後に増殖したカルスの新鮮重を測定した。

### 4. ECからの体細胞胚誘導

ECを植物ホルモンを含まない、2% ショ糖と0.8% 寒天を含むLS培地へ移植し、体細胞胚の誘導を行った。

## 結果

## 1. ECの誘導

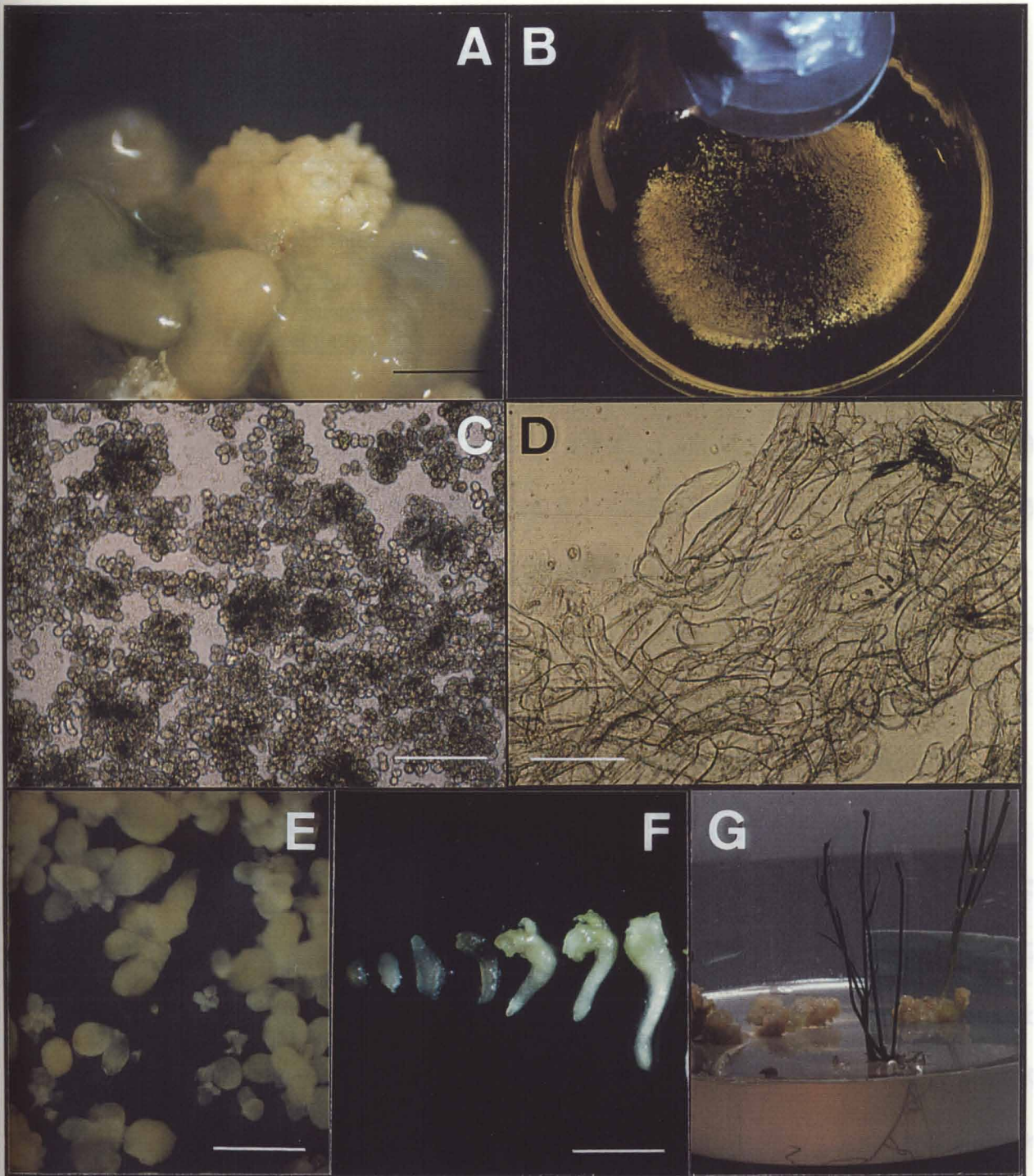
外植片は、置床約10日後に切断部からカルス化し、種々のタイプのカルスが形成された。それらは、水っぽいカルス、粘液状カルス（粘液状物質に包まれたカルス）、脆いカルスまたは硬いカルスで、色は薄緑色、灰色または半透明であった。培養開始から8~16週間頃に、5  $\mu\text{M}$  2,4-D を添加した培地上の側芽茎頂組織及び0.5  $\mu\text{M}$  NAA 及び0.5  $\mu\text{M}$  BA を含んだ培地上の実生鱗芽部から根の上部にかかる部分に形成された半透明で粘液状カルスの表面に黄白色で粒状のカルスが二次的に形成された（第1-A図）。そのカルスを増殖後、植物ホルモンを含まないLS寒天培地へ移植したところ、球状の構造体が形成され、以降、米粒状、こん棒状またはバナナ状の構造体へと発達した（第1-F図）。それらの一部は幼植物体へと生長した（第1-G図）。それらの構造体の表層は表皮細胞構造を有しており、カルスからは容易に分離されたことから、カルスと維管束系でつながっていないと考えられた。また芽と根が同一軸状に形成された。これらのことから前述の構造体は体細胞胚で、分離したカルスは高い体細胞胚形成能を持ったカルス(EC)であると判断した。

ECは直径20  $\mu\text{m}$ 程度の非常に小さな細胞が密に集合して構成されていた。それらの細胞は球状で細胞質に富んでいた（第1-C図）のに対し、体細胞胚形成能の乏しいカルス(non-EC)を構成する細胞は変形または肥大し、液胞化していた（第1-D図）。ECは無菌実生鱗芽部、成株の側芽茎頂組織を材料とした場合とも5  $\mu\text{M}$  2,4-Dを含む培地上に置床した外植片の約10%から誘導された。圃場で栽培した成株の若茎を採取して側芽茎頂組織を材料とした場合も同様の誘導率であった。0.5  $\mu\text{M}$  NAAと0.5  $\mu\text{M}$  BAを含む培地を用いた場合もほぼ同程度であった。

## 2. ECの維持及び増殖

ECは、オーキシンとしてNAAを用いた培地上ではBAの存在に関わらず、再分化しやすく、カルスは緑色を呈したり、カルス粒が粗くなる等、当初の状態のまま維持することは困難であった。





**Figure 1.** Somatic embryogenesis in *Asparagus officinalis* L. (A) Embryogenic callus on the surface of translucent and mucilaginous callus 3 weeks after inoculation of lateral bud of young spear on the callus induction medium. Bar equals 2 mm. (B) Embryogenic suspension callus proliferated in the LS liquid medium containing  $10 \mu\text{M}$  2,4-D. (C) The cells of embryogenic callus. Bar equals  $150 \mu\text{m}$ . (D) The cells of non-embryogenic callus. Bar equals  $150 \mu\text{m}$ . (E) Globular somatic embryos formed on solidified LS hormone-free medium with 0.8 % agar. Bar equals 3 mm. (F) Somatic embryos in various stages (globular, grain-shaped, club-shaped, and banana-shaped embryos). Bar equals 5 mm. (G) Germination of somatic embryos at 4 weeks after transplanting to the regeneration medium.

**Table 1.** Effects of 2,4-D and BA on the characteristics of embryogenic callus proliferated on solidified medium.

| 2,4-D ( $\mu$ M) |                           | 0          | 0.01   | 0.1    | 1      | 5      | 10      |
|------------------|---------------------------|------------|--------|--------|--------|--------|---------|
| BA ( $\mu$ M)    |                           |            |        |        |        |        |         |
| 0                | Colour                    | YW + G     | YW + G | YW + G | YW + G | YW     | YW      |
|                  | Fineness                  | Loose      | Loose  | Loose  | Loose  | Fine   | Fine    |
|                  | Degree of differentiation | High       | High   | High   | Middle | Little | Nothing |
| 0.5              | Colour                    | Not tested | YW + G | YW + G | YW + G | YW + G | YW + G  |
|                  | Fineness                  | Not tested | Loose  | Loose  | Loose  | Loose  | Loose   |
|                  | Degree of differentiation | Not tested | High   | High   | High   | High   | High    |

YW; yellowish white, G; green

一方、オーキシンとして2,4-Dを用いた場合、BAを含まず、5  $\mu$ M以上の濃度の2,4-Dを含む場合は球状の小さな細胞が密に集合し、外観は黄白色のカルスのまま維持及び増殖することが可能であった(第1表)。しかしながら、寒天培地上で継代を重ねると暗黄色で粒の粗いカルスに変化した。

一方、同じ組成の液体培地で回転振盪培養した場合は黄白色の細粒状で均質な状態を維持したまま旺盛に増殖した(第1-B図)。増殖程度は容積圧縮細胞量(packed cell volume: PCV)で1週間に8~10倍であった。なお、暗黒下で培養した場合は、16時間日長で培養した場合よりも増殖が劣った。

### 3. ECからの体細胞胚誘導

維持及び増殖したカルスは植物ホルモンを含まないLS寒天培地へ移植すると、2から3週間後には多数の体細胞胚を形成し(第1-E図)、種々のステージの体細胞胚が確認された(第1-F図)。これらの体細胞胚は1/2濃度のLS寒天培地へ移植すると、大部分は再びカルス化したり、生長を停止したが、一部は発芽し、幼植物体へと生長した(第1-G図)。なお、アスパラガス体細胞胚は球状胚(globular-embryo, 第1-F図)から米粒状胚(grain-shaped embryo, 第1-F図)のステージを経てバナナ型胚(banana-shaped embryo, 第1-F図)またはこん棒状胚(club-shaped embryo, 第2-B図)へと生長し、発芽に至ることを観察した。

## 考 察

植物の体細胞胚誘導を安定的に行う場合、体細胞胚形成能力を有するカルス、すなわち EC を得ることが極めて重要である。しかしながら、誘導しようとしている植物種によって EC の色や形等の性状は異なる場合があることから、初めて試みる場合には、種々の条件下でカルス誘導を行い、形成されたカルスを性状ごとにそれぞれ分離して培養し、各々のカルスについて体細胞胚分化の有無を調査する。このような試行錯誤を繰り返して体細胞胚が得られたとき、はじめてそのカルスを EC であると判断することができる。著者が実験に着手した当時までにアスパラガスでは EC の性状が明らかにされていなかったが、上述のような試行錯誤を繰り返してアスパラガスの EC を得、その性状を明らかにすることに成功した。

アスパラガス EC は、はじめに形成されたカルスの表面に二次的に形成された。このように EC が二次的に形成されることはオオムギでも報告されている(Mohanty & Ghosh, 1988)。なお、脱分化したカルス細胞からの体細胞胚形成能力についてはある条件下で一部の細胞がその能力を獲得すると考えられている(Sharp *et al.*, 1980)。本実験においても、EC が肉眼的に認められるまでに長期間を要したこと及び二次的に形成されたように見えたのは、カルス細胞の一部が培養中に体細胞胚形成能力を獲得し、それらが増殖して EC を形成したためと思われた。

アスパラガス EC は、個々の細胞の大きさが 10~20  $\mu\text{m}$  の球状で細胞質に富んだ小さな細胞が密に集合して 100~500  $\mu\text{m}$  の細胞塊を形成し、その細胞塊が集合していた。細胞塊同士は遊離しやすいためカルス全体としてはフライアブルで、外観は黄白色を示した。Street & Withers (1974)や Nomura & Komamine (1985)も EC は、小さく、球形で細胞質に富み、大きな核とデンプン粒を持つ細胞で構成されると述べている。さらにキュウリ(Chee & Tricoli, 1988)やイネ(Abe & Futsuhara, 1986)の EC に関する記述や著者のナスの EC を観察した結果からも、このような性状はかなり一般的であると思われる。アスパラガス EC の性状が明らかになってからは、誘導されたカルスを肉眼で観察して候

補のカルスを選抜し、カルスの一部を採取して押しつぶし法で顕微鏡観察（100 倍程度）することによって、さらに候補を絞り、最終的には体細胞胚を誘導することによって EC であることの確認を行うという EC 選抜法を確立した（齊藤，1990）。これにより、アスパラガスの体細胞胚誘導は非常に安定的に行うことが可能となった。

オーキシンとして NAA 及び 2,4-D のいずれを用いた場合でも EC を誘導することは可能であった。しかしながら、誘導したカルスの維持及び増殖には NAA よりも 2,4-D が適していた。したがって、以降の試験では EC の誘導に 2,4-D を用いた。これまでのアスパラガス体細胞胚誘導例も 2,4-D (Wilmar & Hellendoorn, 1968) または NAA (Steward & Mapes, 1971; Reuther, 1977) を利用しているが、最近では 2,4-D を用いて成功している例が多い(甲村ら, 1990; 桑原ら, 1989; 浦上, 1990)。

体細胞胚誘導を植物の大量増殖法として利用する魅力は、その爆発的な増殖効率である。したがって、体細胞胚形成能力を保持したままカルスを増殖できなければ意味がない。EC を維持及び増殖するために寒天培地による培養を試みたが、寒天培地では増殖効率が悪いこととカルスの性状が変化しやすく均質な状態で維持することが困難であった。そこで液体振盪培養を試みた。2,4-D を含む液体培地で回転振盪培養を行うと、EC は均質な状態で高い胚形成能力を安定的に保持しながら旺盛に増殖した。イネでは数ヶ月間液体振盪培養すると大きく再分化能力が低下するため(Abe & Futsuhara, 1986)、再分化能力を保持しつつ長期間培養するには 1.5 % NaCl 処理が有効であると報告されている(Binh & Heszky, 1990)。しかしながら、アスパラガスでは、特別の処理を行わなくとも 1 週間毎に継代すれば 1 年間以上胚形成能力を保持し続けた。ただし、継代時期を逸すると肥大または伸長する細胞が増加した。同様に、アルファルファの液体懸濁培養細胞は継代間隔が長いと、体細胞胚形成能力が低下するとともに倍数性が増加したが、1 週間の継代間隔では体細胞胚形成能力を安定的に保持したという(Binarova & Dolezel, 1988)。さらに *Nicotiana* では継代間隔を短くすることで培養細胞の倍数性が安定することが報告されている(Evans & Gamborg, 1982)。このように、安定した体細胞胚形成能力を維持するにはカルスの継代間隔を短くすることが重要である。

## 第2節 アスパラガス体細胞胚の効率的誘導法の確立

前節では、誘導された体細胞胚は水浸状で発育が悪いものが多く、効率的に植物体を得る段階には至らなかった。そこで本節では、ECから正常な体細胞胚を効率的に誘導するための培養条件を検討した。

従来、体細胞胚形成時の培養条件の検討では、培地へ添加する植物ホルモンの種類と濃度や窒素成分の形態と量等の培地成分の検討に主眼がおかれていたが、ここでは培養容器内の環境に着目して検討を行った。

### 材料及び方法

前節でアスパラガス品種 'Mary Washington 500W' から誘導した EC を供試した。LS 培地に 2 % ショ糖と 5  $\mu$ M 2,4-D を含む液体培地で回転振盪培養してカルスの維持及び増殖を行った。継代は 1 週間毎に行い、試験には継代後 1 週間目の細胞懸濁液を以下の過程を通して供試した。

まず、細胞懸濁液を径 1 mm のステンレスメッシュを通して大きな細胞塊を除去したのち、植物ホルモンを含まない LS 液体培地で 3 回洗浄した。1000 rpm 5 分間の遠沈後、PCV を計り、植物ホルモンを含まない LS 液体培地で 100 倍に希釈した。この細胞懸濁液を以下に示す種々の体細胞胚誘導培地（植物ホルモンを含まない、2 % ショ糖を含む LS 培地を基本とした）40 ml へ 2 ml ずつ拡散し、体細胞胚の誘導実験を行った。培養容器には 100 ml 三角フラスコ(PYREX)を供試した。

#### 実験 1. 体細胞胚誘導培地の検討

0.8 % 寒天でゲル化した培地及び液体培地を供試した。液体培地はショ糖濃度を 2, 10 または 30 % を検討した。培養容器の口はアルミホイルとパラフィルム(American Can Company)で密封した。

## 実験2. 培地ゲル化剤の種類と濃度及び無菌通気膜の検討

寒天(0.8%)またはジェランガム(0.2, 0.5 または 1.0%)でゲル化した培地を供試し、培養容器の口はアルミホイルとパラフィルムで密封、またはテフロン製無菌通気膜のミリラップ(Millipore)で封じ、ゲル化剤の種類、濃度及び培養容器の通気性が体細胞胚誘導に及ぼす影響について比較した(第2-A図)。ジェランガムを用いた場合は、体細胞胚誘導処理4週間後に体細胞胚を発芽培地(0.8%寒天を含む1/2濃度のLS培地)へ移植し、さらに4週間後に発芽した体細胞胚を計数した。

ジェランガム濃度の検討試験において、カルス懸濁液を再分化培地へ移植して2及び4週間後に、体細胞胚の数、新鮮重、乾物重、水分含量、培養容器内の相対湿度及びガス組成(CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>)を測定した。形成された体細胞胚は20 x 90 mmのプラスチックシャーレへ集めて実体顕微鏡下で計数した後に、余分な水分をろ紙上で除去して新鮮重を測定後、80℃で20時間乾燥し、乾物重を測定した。新鮮重と乾物重から体細胞胚の含水率を算出した。培養容器内の相対湿度はHumicap湿度センサー、HMI32とHMP31UT(VAISALA)、を用いて測定した。培養容器のふたの部分にナイフで切り目を入れ、そこから素早くセンサーをいれて測定した。培養容器内のガスサンプルは、明期にはいつて3時間から6時間経過した時に注射器を用いてふたに針を突き刺して採取した。採取したガスサンプルはガスクロマトグラフィー、GC-4B PT(島津製作所)にWG-100カラムを装着して分析した。すべての分析は少なくとも2回は繰り返した。

培養はすべて27±1℃、16時間日長(約3000 lux)に調節した培養室内で行った。体細胞胚誘導時のゲル化剤の種類(A:寒天, G:ジェランガム)、ゲル化剤の濃度(0.2, 0.5, 0.8 または 1.0%)及び培養容器のふたの種類(MW:ミリラップ, AF:アルミホイル)の組合せを次のように表示した。例えば、0.5G-MWは0.5%ジェランガムでゲル化させた培地を用い、容器をミリラップで封じて培養したことを示す。

## 結果

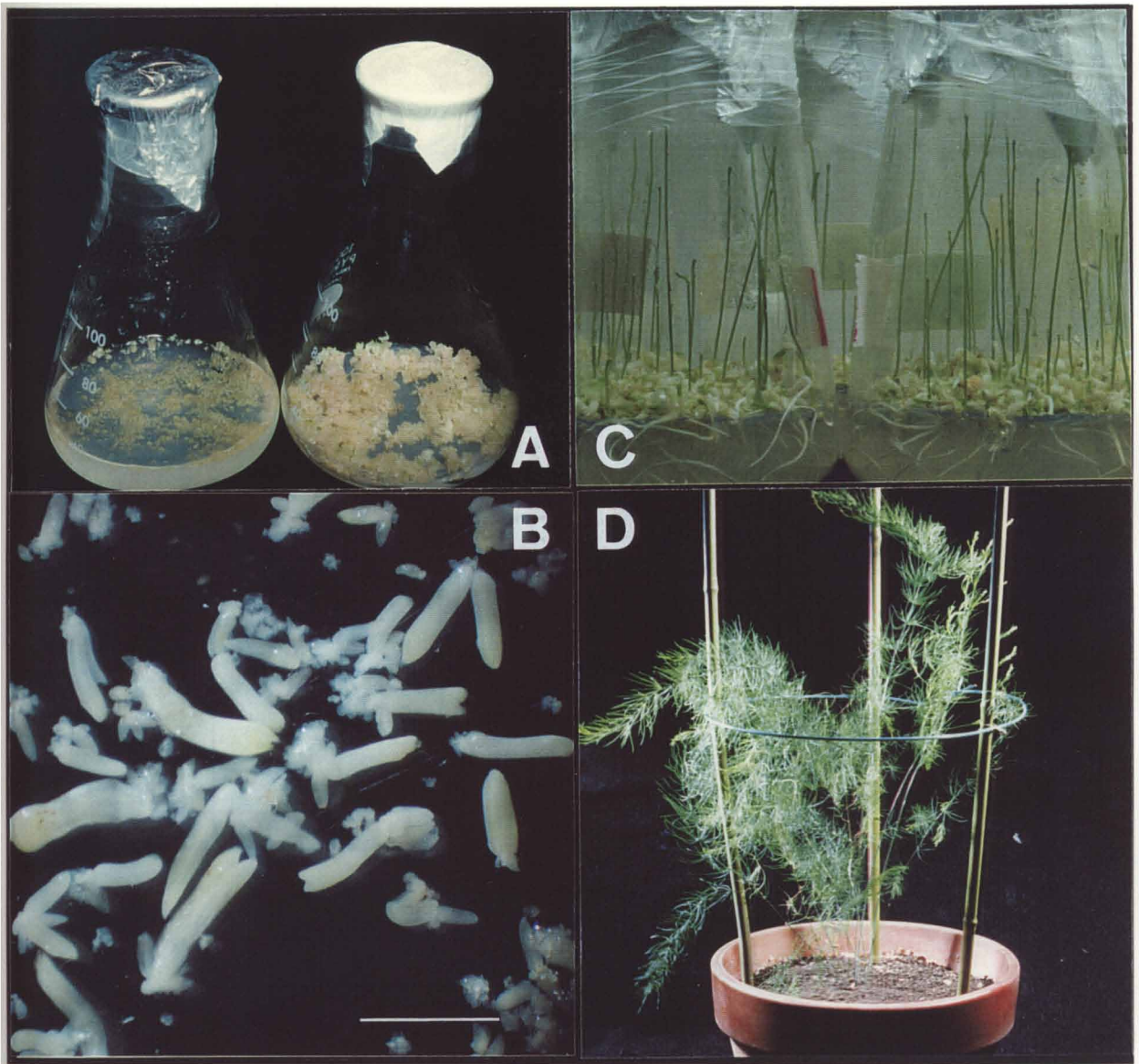
## 1. 体細胞胚誘導培地の検討

再分化培地を液体培地とした場合、誘導された体細胞胚のほとんどは米粒状胚の状態では生長が止まった。再分化培地へ移植 4 週間後に形成された体細胞胚の総数は固形培地を用いた場合と液体培地を用いた場合でほぼ同じであったが、こん棒状からバナナ型胚まで生長した体細胞胚の数は固形培地を用いた場合が液体培地の場合の3倍以上であった(第3図)。液体培地のショ糖濃度は上昇するほど体細胞胚の発達には阻害的であった。特に、30%ショ糖添加区では体細胞胚の形成は全く見られなかった。

## 2. ゲル化剤の種類と濃度及び無菌通気膜の検討

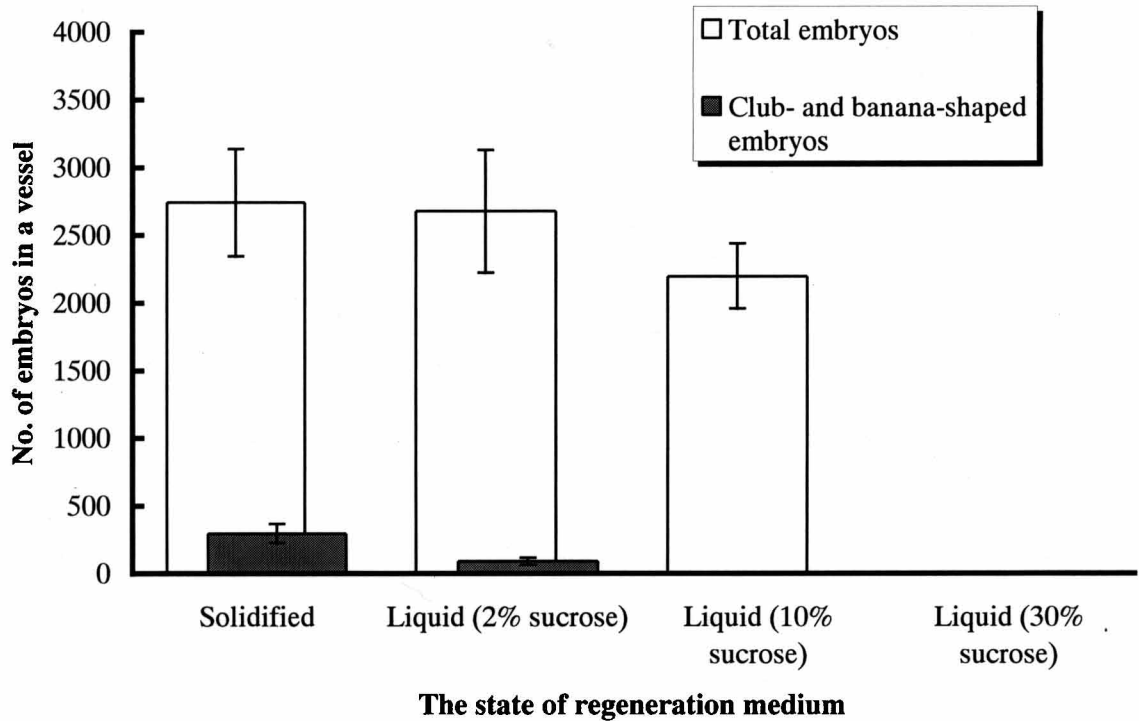
0.8%寒天及び0.2%ジェランガムを用いた場合に誘導された体細胞胚の総数は、ミリラップでふたをした場合がやや多い傾向にあり、体細胞胚の発育も促進され(第4図)、ミリラップでふたをした培養法の有効性が明らかとなった。

ジェランガムを用いた場合、培養容器のふたとしてアルミホイルを用いると、濃度が高いほど誘導される体細胞胚の総数は多い傾向にあった。逆に、ミリラップをふたとした場合は、ジェランガム濃度が高くなるほど誘導される体細胞胚の総数は減少した(第4図)。こん棒状胚及びバナナ型胚の割合はジェランガム濃度が高くなるほど増加し(第5図)、この傾向はミリラップをふたとした場合に顕著であった。再分化培地のジェランガム濃度を1.0%とし、培養容器のふたをミリラップとすることによって、水浸状でないこん棒状またはバナナ型胚を誘導することができた(第2-B図)。体細胞胚誘導時の培地のジェランガム濃度と培養容器のふたの種類は、体細胞胚の発芽にも影響を及ぼした。0.5G-MW または 1.0G-MW で誘導した体細胞胚は発芽培地へ移植約10日後には発芽し、1.0G-MW の場合に最も高い発芽率が得られた(第2表)。0.2G-AF、0.2G-MW または 0.5G-AF で誘導した体細胞胚は発芽培地上で水浸状化したり、肥大したり、再びカルス化したりした。これらの

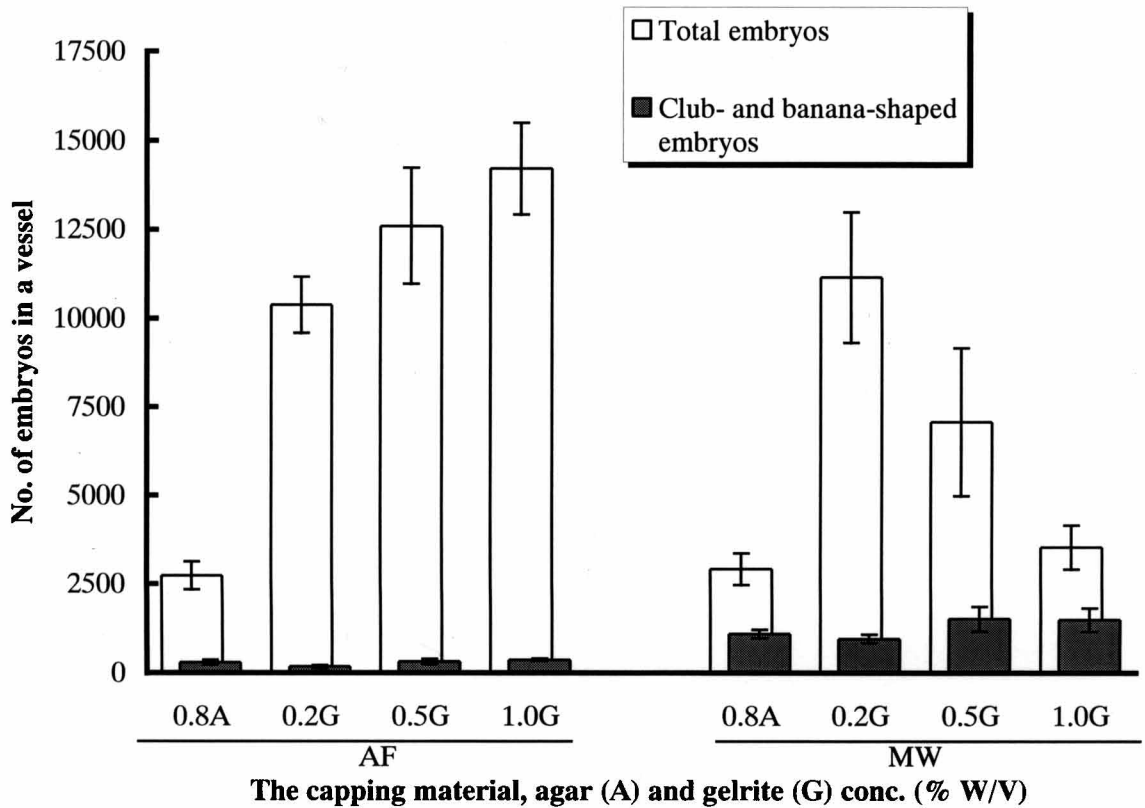


**Figure 2.** Improved somatic embryogenesis in *Asparagus officinalis* L. (A) Culture vessels capped with aluminum foil (left) and with Milli Wrap (right). Solidified LS medium with 0.8 % agar was in each vessel. (B) Somatic embryos formed on solidified LS medium with 1 % gelrite and Milli Wrap cap 4 weeks after regeneration treatment. Bar equals 3mm. (C) Germination of somatic embryos at 4 weeks after transplanting to the germination medium. (D) Plantlet of asparagus via somatic embryogenesis.



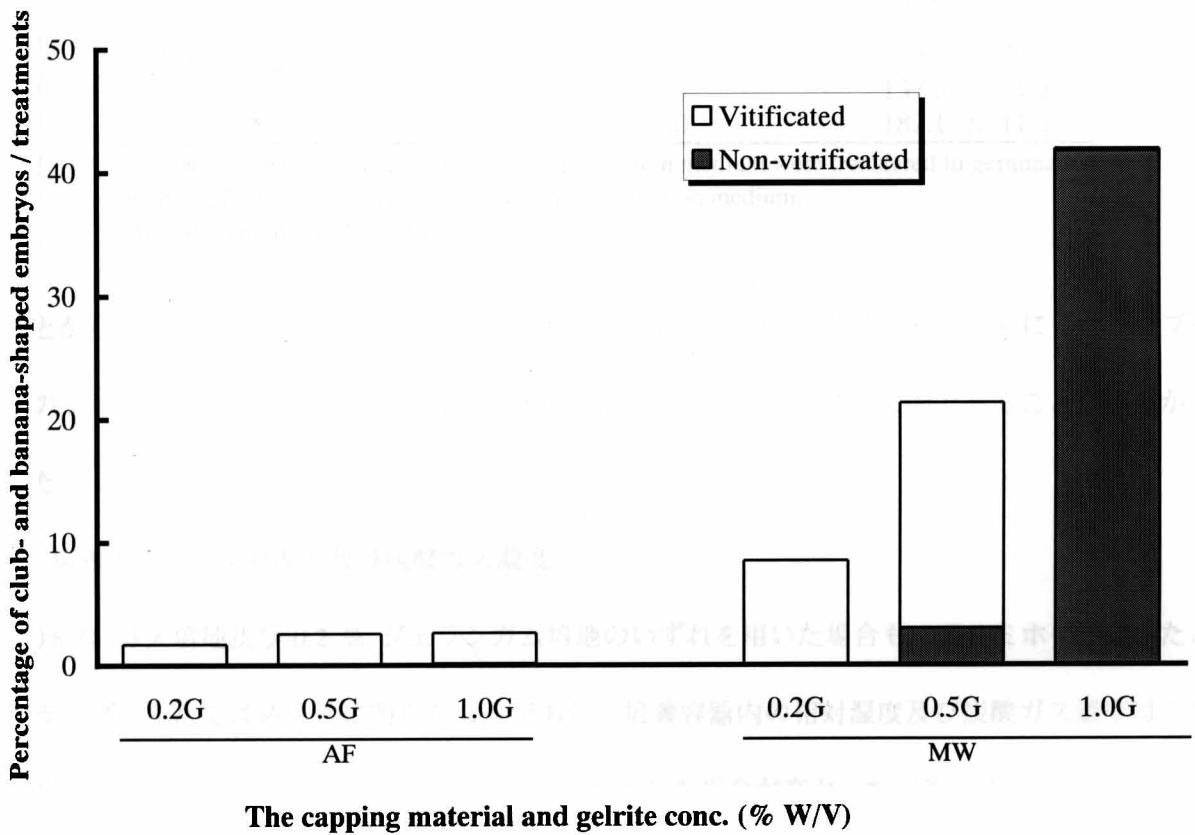


**Figure 3.** The effect of the medium and sucrose concentration on somatic embryo formation of *Asparagus officinalis* L. The number of somatic embryos was counted 4 weeks after transferring embryogenic callus to regeneration medium. Vertical lines represent the Standard Errors. Solidified; 0.8 % agar solidified medium.



**Figure 4.** The effects of vessel capping material, agar and gelrite concentration on somatic embryos formation. The numbers of somatic embryos induced per flask were counted 4 weeks after transferring to regeneration medium. Vertical lines represent the Standard Errors.

AF; Aluminum foil, MW; Milli Wrap.



**Figure 5.** The effects of vessel capping material and gelrite concentration on vitrification of club-shaped and banana-shaped embryos. The number of somatic embryos was counted 4 weeks after transferring embryogenic callus to regeneration medium. AF, MW; same as Fig. 3.

**Table 2.** Effect of capping materials and gelrite concentrations during embryo formation on somatic embryo germination<sup>z</sup>.

| Condition of embryo formation |                   | No. of embryos in vessel <sup>y</sup> |                |
|-------------------------------|-------------------|---------------------------------------|----------------|
| Capped with                   | Gelrite conc. (%) | with root and shoot                   | with root only |
| AF                            | 0.2               | 0 ± 0                                 | 0 ± 0          |
|                               | 0.5               | 0 ± 0                                 | 11.7 ± 4.4     |
|                               | 1.0               | 3.3 ± 1.3                             | 183.0 ± 46.0   |
| MW                            | 0.2               | 2.2 ± 1.6                             | 6.8 ± 3.0      |
|                               | 0.5               | 8.8 ± 1.4                             | 137.3 ± 21.7   |
|                               | 1.0               | 22.4 ± 2.0                            | 182.1 ± 11.2   |

<sup>z</sup>Somatic embryos cultured 4 weeks on regeneration medium were transferred to germination medium. <sup>y</sup>Scored 4 weeks after transfer to germination medium.

AF; Aluminum foil, MW; Milli Wrap

ことから、高濃度（1.0 %）ジェランガムで体細胞胚誘導培地をゲル化するとともにミリラップを容器のふたとすることがアスパラガス体細胞胚の正常な発育と発芽に効果的であることが明らかとなった。

### 3. 培養容器内の相対湿度及び炭酸ガス濃度

0.8 % 寒天培地及び0.2 % ジェランガム培地のいずれを用いた場合も、アルミホイルのふたとミリラップのふたでは通気性に明らかな差があり、培養容器内の相対湿度及び炭酸ガス濃度はミリラップをふたとした場合よりもアルミホイルをふたとした場合が高かった（第3表）。アルミホイルを

**Table 3.** Relative humidity and CO<sub>2</sub> concentration in the head space of culture vessels at different times of somatic embryo culture.

| Capped with             | Gelrite conc.<br>% | 2 weeks <sup>z</sup> |                      | 4 weeks <sup>z</sup> |                      |
|-------------------------|--------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
|                         |                    | R.H.<br>%            | CO <sub>2</sub><br>% | R.H.<br>%            | CO <sub>2</sub><br>% |
| AF                      | 0.2                | 96.6                 | 5.39                 | 97.0                 | 0.95                 |
|                         | 0.5                | 97.2                 | 6.10                 | 96.8                 | 1.00                 |
|                         | 1.0                | 97.4                 | 7.36                 | 96.7                 | 0.90                 |
| MW                      | 0.2                | 95.4                 | 0.17                 | 95.6                 | 0.07                 |
|                         | 0.5                | 95.4                 | 0.10                 | 95.7                 | 0.10                 |
|                         | 1.0                | 95.7                 | 0.10                 | 95.9                 | 0.09                 |
| The air in culture room |                    | N.D.                 | 0.08                 | N.D.                 | 0.12                 |

<sup>z</sup>Measured 2 and 4 weeks after transferring EC to regeneration medium.

R.H.; Relative humidity, N.D.; Not determined. AF, MW; same as Table 2.

Table 4. Water content of somatic embryos.

| Conditions for regeneration |                  | Weeks after regeneration treatment |            |
|-----------------------------|------------------|------------------------------------|------------|
| Conc. of gelrite (%)        | Capping material | 2                                  | 4          |
|                             |                  | % f.w.                             | % f.w.     |
| 1.0                         | AF               | 91.3 ± 0.6                         | 92.4 ± 0.1 |
|                             | MW               | 85.9 ± 0.2                         | 83.5 ± 0.6 |

Water contents were measured at 2 and 4 weeks after transferring embryogenic callus to regeneration medium. AF, MW; same as Table 2.

ふたとした場合の炭酸ガス濃度は再分化処理 2 週間後は大気中濃度の約 80 倍で、4 週間後にはほぼ大気中濃度と同様のレベルに減少した。ミリラップをふたとした場合は、このような炭酸ガスレベルの上昇は観察されなかった。1.0G-MW で誘導した体細胞胚の水分含量は 1.0G-AF で誘導した場合よりも約 6 %少なかった (第 4 表) ことから、ミリラップによる通気によって胚の水分含量が少なくなったと考えられた。

## 考 察

ニンジンでは、EC の維持・増殖から体細胞胚の誘導・発達までの過程を液体培地で行わせることが可能で (鎌田&原田, 1979), 培地中の浸透圧を高めることによって体細胞胚形成が増進される (Whetherell, 1984). 同様な浸透圧の効果はパパイヤ(Litz, 1986)及びキュウリ(Chee & Tricol, 1988)でも報告されている。さらに、コムギの EC 誘導率の上昇(Brown *et al.*, 1989)やトウモロコシの体細胞胚形成率の上昇(Close & Ludeman, 1987), ニンジンの頂芽分裂組織及び子葉からの直接的な体細胞胚誘導(Kamada *et al.*, 1989)にも高浸透圧処理は有効である。アスパラガスでは体細胞胚誘導培地を液体培地とした場合、誘導された体細胞胚のほとんどが球状から米粒状胚の状態では生長が止まり、この現象は高濃度ショ糖を添加した培地を用いた場合も改善されなかった。このことはアスパラガスの体細胞胚の形成は液体培地でも可能であるが、形成後の体細胞胚の発達は液体培地中では困難であ

ることを示している。ダイズ(Finer & Nagasawa, 1980)やワタ(Trolinder & Goodin, 1988)も液体振盪培養で誘導した球状体細胞胚を固形培地へ移植して発育及び発芽させている。

体細胞胚誘導培地のゲル化剤として0.8%寒天と0.2%ジェランガムを比較した場合、体細胞胚の発達はジェランガムの場合が、より多くの体細胞胚を誘導することができ、発育も良好であった。同様な結果はマンゴー体細胞胚においても報告されている(DeWald *et al.*, 1989)。また、体細胞胚誘導に限らず、組織培養時の培地ゲル化剤としては寒天を用いた場合よりもジェランガムを用いた場合が培養物の生育が早くなることが数種の作物で確認されているほか(Ichi *et al.*, 1986; MacRae & van Staden, 1990)、プロトプラストからの植物体再分化率も良好で(Koda *et al.*, 1988)、その原因として、寒天には植物の生育阻害物質が存在することが挙げられている(Hu & Wang, 1983)。

培養容器のふたをアルミホイルとした場合とミリラップとした場合で、容器内のガス組成は大きく異なった(第3表)。高濃度のエチレンや炭酸ガスはニンジン(Tisserat & Murashige, 1977)、コムギ(Carman, 1988)やカナダトウヒ(Kumar *et al.*, 1989)の体細胞胚誘導を阻害した。しかしながら、本実験の結果、ミリラップを用いて通気性を高めても培地のジェランガム濃度が低い場合は誘導された体細胞胚の大部分が水浸状であったことから、水浸状でない正常なアスパラガス体細胞胚の誘導にはガス成分以外の要因の影響も大きいと思われた。

水浸状化はアルミホイルをふたとして培地のゲル化剤濃度が低い場合に観察された。培養容器内の植物体の水浸状化は培地のゲル化剤濃度を高めることで減少できることが数種の作物で報告されている(Debergh *et al.*, 1981; Debergh, 1983; Ziv *et al.*, 1983; Zimmerman & Cobb, 1989; 本間ら, 1991)。Debergh *et al.* (1981)は培地のマトリックポテンシャルが小さくなることが組織の水浸状化防止に効果的であったと考察している。本実験でも同様な効果が推察された。さらに、ミリラップを容器のふたとした場合、固形培地上へ拡散した細胞懸濁液は3~5日で蒸発し、体細胞胚の水分含量は低下したことから、乾燥がアスパラガス体細胞胚の水浸状化を防止するとともに体細胞胚の発育に重要な働きを持つと推察された。

形成された体細胞胚を乾燥させることによって発芽率を向上させた例は多い(Gray, 1987; McKersie *et al.*, 1988; Parrott, 1988). しかしながらアスパラガスでは, 予備試験にて密閉培養容器内で形成された体細胞胚を通気条件下へ移したところ, それらは生長を停止し, ほとんどが枯死してしまった. 本実験では, 形成された体細胞胚に処理するのではなく, 体細胞胚の形成・発達時に培養環境を変化させることによって良好な結果が得られたものであり, この点が特徴的であるとともに, これまでの報告にはみられなかった点である.

植物の分化を研究する際に, 従来は, 培地組成(植物ホルモンや窒素分)や供試部位を中心に検討が行われてきた. 本研究で得られた結果から, それらに加えて培養環境を検討することの重要性が示された. これまでに培養が困難とされていた植物でも培養時の環境を制御することによって容易となる可能性が示唆された.

## 第 3 節 アスパラガスで確立した体細胞胚誘導法の他作物への応用

—ナス(*Solanum melongena* L.)における安定かつ効率的な体細胞胚誘導—

前節までに、EC を選抜、維持及び増殖する条件を明らかにし、培地をゲル化させるジェランガム濃度を高めることと培養容器を無菌通気膜で封じることによってアスパラガスの安定かつ効率的な体細胞胚誘導が可能となった(Saito *et al.*, 1991)。単子葉植物であるアスパラガス以外の植物種に対するこの方法の汎用性を検討するために双子葉植物であるナスへの応用を試みた。

著者が実験に着手した当時、ナスにおいても体細胞胚誘導による植物体再分化が報告されていたが(Yamada *et al.*, 1967; Matsuoka & Hinata, 1979; Gleddie *et al.*, 1983; Rao, 1992)、固形培地上では増殖効率が低く、液体懸濁培養ではしばしば水浸状の胚が形成されることから、効率的な体細胞胚誘導系は確立されていなかった。

本節では、ナスの効率的な体細胞胚誘導系を確立するとともに体細胞胚誘導における品種間差について検討した。

## 材料及び方法

## 1. 供試材料

EC 誘導及び体細胞胚誘導の諸条件の検討には、ナス品種‘中生真黒’を供試した。

## 2. EC 誘導条件の検討

種子を有効塩素濃度 1% の次亜塩素酸ナトリウム (アンチホルミン) によって 15 分間滅菌処理し、続いて滅菌水で 3 回洗浄した。滅菌した種子を 3% ショ糖と 0.8% 寒天を含む 1/2 濃度の MS 培地



へ無菌的に播種し、 $20 \pm 1$  °C、16 時間日長（約 3000 lux）で生育させ、無菌幼植物を養成した。以降の培養はすべて同じ条件で行った。発芽して 1 週間目の無菌実生の子葉を縦横にメスで切り、長さ 10 mm の外植片を作出し、次のカルス誘導培地に置床した。すなわち、3 % ショ糖と 0.8 % 寒天を含む MS 培地を基本として、NAA (1, 10, 50 または 100  $\mu$ M) または 2,4-D (1, 10, 50 または 100  $\mu$ M) を加えた 8 種の培地とした。

培養開始から 4 週間後に、誘導されたカルスはカルス誘導培地と同じ組成の液体培地へ移植した。液体培地は 100 ml 三角フラスコに 30 ml 入れ、100 rpm で回転振盪培養し、細胞懸濁液は 1 週間毎に継代した。継代は新鮮重約 80 mg のカルスを 30 ml の新しい培地へ移植して行った。

### 3. 体細胞胚の誘導

試験には継代後 1 週間目の細胞懸濁液を用いた。細胞懸濁液は径 1 mm のステンレスメッシュを通して大きな細胞塊を除去したのち、MS 液体培地で 3 回洗浄した。1000 rpm 5 分間の遠心後、PCV を計り、MS 液体培地で 100 倍に希釈した。この細胞懸濁液を体細胞胚誘導培地へ 2 ml ずつ拡散し、体細胞胚の誘導を行った。体細胞胚誘導培地は MS 培地とし、ジェランガムを 0 (液体培地)、0.2 または 1.0 % 加えた。培養容器は 100 ml 三角フラスコ(PYREX)を使用し、体細胞胚誘導培地を 40 ml 加えた。培養容器の口をアルミホイル(AF)とパラフィルムで密封した場合とミリラップ(MW)で封じ、通気性を付与した場合とについて比較した。体細胞胚誘導培地が液体の場合は 100 rpm で回転振盪培養した。これらの処理区は、例えばミリラップでふたをして 0.2 % ジェランガム培地の場合、0.2G-MW と表示した。

### 4. 体細胞胚からの発芽及び順化

体細胞胚誘導処理 4 週間後に体細胞胚を発芽培地 (0.8 % 寒天を含む 1/2 濃度の MS 培地) へ移植し、さらに 2 週間後に発芽して生長した幼植物を、オートクレーブ滅菌した土とバーミキュライトの混合培土(1:1)に鉢上げし、寒冷紗で覆って 1 週間順化した。

## 5. 体細胞胚誘導における品種間差異

体細胞胚誘導に及ぼす品種間差を検討するために以下の10品種を供試した。‘中生真黒’、‘青長’、‘南頭’、‘Black Beauty’、‘千両2号’、‘山科’、‘DMP’、‘下田’、‘興津1号’及び‘EFBW01A’。これらの品種は野菜・茶業試験場で保存しているナス遺伝資源から無作為に選んだ。カルス及び体細胞胚の誘導は前試験で確立された方法で行った。すなわち、50  $\mu\text{M}$  2,4-D を含む MS 固形培地上で誘導したカルスを同じ組成の液体培地で回転振盪培養して増殖し、1.0G-MW で体細胞胚を誘導した。

## 6. 調査方法

再分化培地へ移植 4 週間後に、魚雷型胚から子葉期胚に発育した体細胞胚を計数した。体細胞胚は 20 x 90 mm のプラスチックシャーレ上へ集めて実体顕微鏡下で計数した。発芽培地へ移植 2 週間後に発芽した体細胞胚を計数し、鉢上げして 2 週間後に形態的に正常に発育した幼植物を計数した。

## 結 果

## 1. EC の誘導と増殖

NAA より 2,4-D を添加した培地で、より旺盛なカルスが誘導された。NAA や 2,4-D が低濃度の場合、不定根が誘導された。高濃度(50~100  $\mu\text{M}$ )の 2,4-D を含む固形培地では外植片は褐変し、ほとんどカルス形成がみられなかった(第5表)。しかしながら、50  $\mu\text{M}$  2,4-D で4週間培養した切片を

**Table 5.** Effect of auxins on callus induction in cotyledon explant cultures.

| Auxins/Conc.<br>( $\mu\text{M}$ ) | 1            | 10    | 50 | 100 |
|-----------------------------------|--------------|-------|----|-----|
| NAA                               | $\pm^z, R^y$ | ++, R | ++ | ++  |
| 2,4-D                             | +, R         | +     | +  | -   |

<sup>z</sup>Intensity of callusing. The average response of explants rated is shown as follows: -, No calli were induced.

$\pm$ , Small amount of calli ( $-10 \text{ mm}^3$ ) were produced on the cutting end of explants. +, Medium amount of calli ( $10-50 \text{ mm}^3$ ) were produced on the cutting end of explants. ++, Abundant calli ( $50- \text{mm}^3$ ) were produced on the entire surface of explants. <sup>y</sup>Adventitious roots were produced.

Table 6. Effect of auxins on callus characters and proliferation in suspension cultures.

| Auxins/Conc.<br>( $\mu$ M) | 1                | 10                     | 50      | 100             |
|----------------------------|------------------|------------------------|---------|-----------------|
| NAA                        | -,R <sup>z</sup> | -,YW <sup>y</sup> ,F,R | -,YW,F  | $\pm^x$ ,YW,F,G |
| 2,4-D                      | $\pm$ ,YW,F,G    | +,YW,G                 | ++,YW,G | -,B             |

<sup>z</sup>Adventitious roots formed. <sup>y</sup>Callus character: YW, yellowish white. F, friable. G, granular. B, brown.

<sup>x</sup>Degree of proliferation of granular and yellowish white callus: -, Granular and yellowish white calli were not proliferated while friable calli were proliferated or no calli were not proliferated.  $\pm$ , Small amount of granular yellowish white calli ( $\sim 100 \text{ mm}^3$ ) were proliferated. +, Medium amount of granular and yellowish white calli ( $100\text{-}1000 \text{ mm}^3$ ) were proliferated. ++, Abundant granular and yellowish white calli ( $1000\text{-} \text{mm}^3$ ) were proliferated.

同組成の液体培地中で回転振盪培養した場合、黄白色で粒状のカルスが最も多く形成された（第6表）。

この粒状で黄白色のカルスを体細胞胚誘導培地へ移植したところ、球状胚が形成され、さらに魚雷型から子葉期胚へと発達した。これらの子葉期胚は胚軸が肥大し、子葉が小さい形態であったが、発芽培地へ移植すると幼植物へと発達した。そこで、この粒状で黄白色のカルスを EC であると判断した。

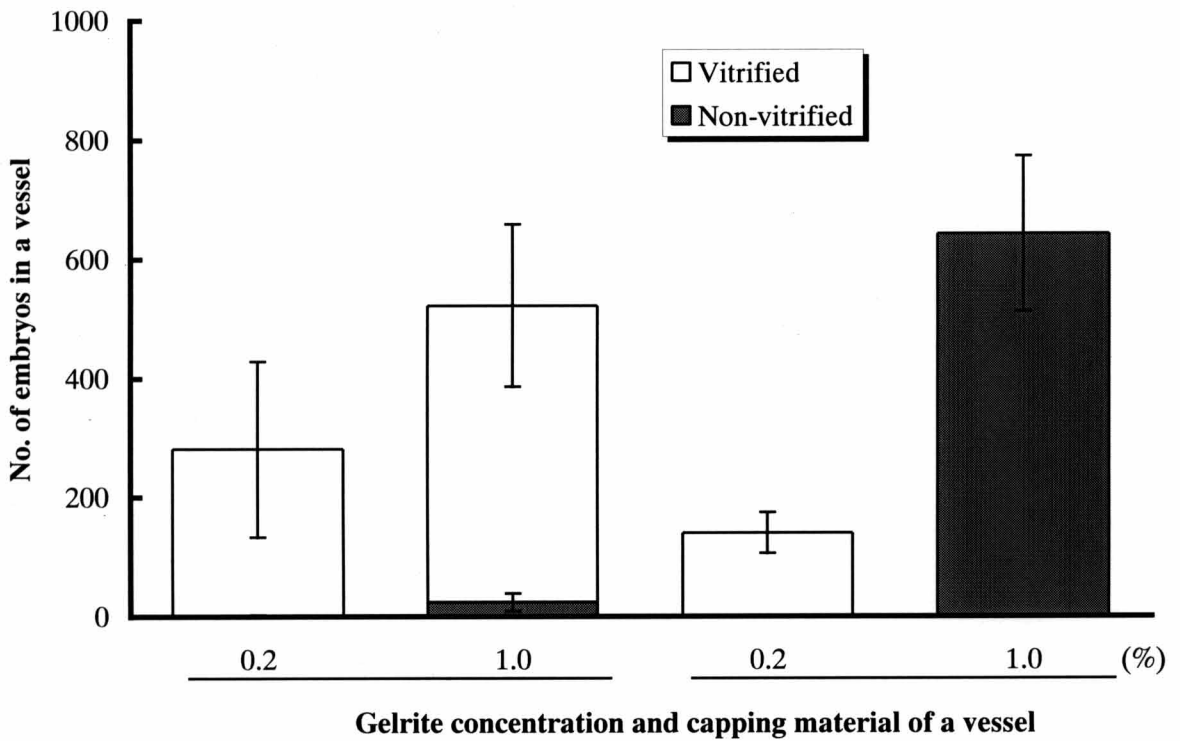
液体培地中の EC カルスの増殖は、NAA よりも 2,4-D を用いた場合が優れていた（第6表）。 $50 \mu\text{M}$  2,4-D を含む培地で1週間毎に継代すると、EC は黄白色の粒状で均質な状態を保ちながら旺盛に増殖した（第6-A 図）。

## 2. 培地のゲル化方法と容器のふたの種類が体細胞胚形成と発芽に及ぼす影響

培地のゲル化剤濃度やふたの種類に関わらず、すべての処理区で体細胞胚は形成された。100 ml 三角フラスコ1個あたりに形成された体細胞胚の数は、0.2G-AFで281個、0.2G-MWで523個、1.0G-AFで140個、1.0G-MWで643個であった。また、誘導された体細胞胚全体に占める非水浸状かつ肥大していない体細胞胚の割合は、それぞれ0.4、4.6、0.7及び100%であった（第7図）。液体培地中で形成された体細胞胚はふたの種類に関わらず、すべて水浸状かつ肥大していた。また、0.2G-AF、0.2G-MW または 1.0G-AF で誘導された体細胞胚はほとんどが水浸状かつ肥大していたが 1.0G-MW の場合はすべてが水浸状でなく肥大もみられなかった（第6-B, C 図）。



**Figure 6.** Somatic embryogenesis in *Solanum melongena* L. (A) Embryogenic calli in suspension culture. Bar equals 200  $\mu\text{m}$ . (B) Non-vitrified somatic embryos formed on the medium solidified with 1.0 % gelrite and Milli Wrap cap 4 weeks after regeneration treatment. (C) Vitrified and swollen somatic embryos formed on the medium solidified with 0.2 % gelrite and aluminum foil cap 4 weeks after regeneration treatment. Bar equals 10 mm. (D) Germinated embryos from (B) 2 weeks after transplanting to the germination medium. Bar equals 40 mm. (E) Re-called somatic embryos from (C) on the germination medium. Bar equals 40 mm. (F) Young plantlets from (D) 2 weeks after potting. Bar equals 100 mm. (G) No plantlets from (E).



**Figure 7.** The effect of capping material of a vessel and gelrite concentration on somatic embryo formation of *Solanum melongena* L. The number of somatic embryos induced per flask were counted 4 weeks after transferring embryogenic callus to regeneration medium. Vertical lines represent the Standard Errors. AF; aluminum foil, MW; Milli Wrap.

Table 7. Effect of genotype on somatic embryogenesis in *Solanum melongena* L.

| Cultivars    | No. of embryos in a vessel <sup>z</sup> | Cultivars       | No. of embryos in a vessel <sup>z</sup> |
|--------------|---|-----------------|---|
| Black Beauty | 103.5 ± 13.1                            | Nanto           | 488 ± 64.1                              |
| Senryo No.2  | 292.0 ± 33.0                            | DMP             | 552 ± 231.0                             |
| Aonaga       | 293.3 ± 118.0                           | Nakate shinkuro | 698 ± 137.2                             |
| EFBW01A      | 368.5 ± 67.9                            | Yamashina       | — <sup>y</sup>                          |
| Shimoda      | 483.0 ± 107.9                           | Okitsu No.1     | — <sup>y</sup>                          |

<sup>z</sup>Mean ± standard error. All embryos induced were non-vitrified.

<sup>y</sup>Embryogenic callus was little induced in these cultivars.

水浸状でない体細胞胚は発芽培地へ移植後も正常に発育し、ほとんど(40/42)が正常な幼植物体へと生長した(第 6-D, F 図)。一方、水浸状の体細胞胚はわずかに 5%が幼植物へと生長したが、ほとんど(55/58)が発芽培地上で再カルス化し、発芽しなかった(第 6-E, G 図)。

### 3. 体細胞胚誘導における品種間差異

供試した 10 品種の中で‘山科’や‘興津 1 号’では EC が誘導されなかったが、他の 8 品種では EC が誘導された。EC が誘導された 8 品種では、形成された体細胞胚数に差はあるもののすべての体細胞胚は非水浸状で肥大していない正常な体細胞胚であった(第 7 表)。

## 考 察

ナスの EC は、寒天培地上では誘導されにくく、また増殖が困難であった。そこで寒天培地上で 4 週間培養後、EC を選抜することなく外植片ごと液体培地へ移植して液体振盪培養を行った。液体振盪培養すると黄白色で粒状の EC が外植片から遊離した。培地更新時に EC を選抜して数回継代するとほぼ均質な EC として容易に増殖することができた。ナスの EC の性状は、本章第 1 節で示したアスパラガスやニンジンと同様であった。

EC の選抜は体細胞胚誘導の効率を上げる上で非常に重要である。選抜した EC は 2,4-D を含む液

体培地で回転振盪培養することによって安定的に非常に高い胚分化能力を保持しながら増殖した。ナスは長期間培養を続けると胚形成能力が低下したと Rao (1992)は報告しているが、本実験では本章第 1 節で示したアスパラガスと同様に、1 週間毎に継代をすると少なくとも半年以上は安定した胚分化能力を保持した。

ナスの体細胞胚誘導は培地ゲル化剤としてのジェランガム濃度を高め、培養容器のふたに無菌通気膜を使用することによって大きく改善できることが明らかとなり、アスパラガスで確立された培養系がナスに対しても有効であることが明らかとなった。

‘山科’や‘興津 1 号’では EC がほとんど形成されなかった。なお、これらのように今回の条件で EC が誘導されにくかった品種では、カルス誘導時にさらに広範囲の植物ホルモン条件を検討する必要がある。各品種の持つ形態的または生理的特性と誘導された体細胞胚の数に一定の関係はみられなかった。ナスの体細胞胚誘導には大きく品種間差が存在することを複数のグループが報告しているほか(Yamada *et al.*, 1967; Matsuoka & Hinata, 1979; Ali *et al.*, 1991), ナス以外にも多くの作物で個体再分化効率の品種間差異が観察されている(Tomes, 1985; Hodges *et al.*, 1986; Komatsuda & Ohyama, 1988; Brown, 1988). 個体再分化効率が品種間で異なる原因の一つとして、体細胞胚分化率の低いオーチャードグラスでは内生サイトカイニン含量が高く(Wenck, 1988), 内生 ABA 量の減少が速い(Bell *et al.*, 1993)ことが示され、内生ホルモンの影響が報告されている。また、アブラナ(*Brassica*)属では、*B. campestris* のもつ A ゲノムが不定芽分化に抑制的に働くことが報告されている(Narasimhulu & Chopra, 1988). しかし、その原因は十分に究明されていない。Ali *et al.* (1991)は *Solanum* の 2,4-D による体細胞胚形成能は劣性遺伝子に支配されていると推察している。それらを明らかにするには異なる体細胞胚形成能を有する純系を用いて試験する必要がある。再分化能力の遺伝に関しては種々の作物で研究が実施され、優性の核遺伝子支配(Hodges *et al.*, 1986; Ma *et al.*, 1987; Gawel & Robacker, 1990; Kielly & Bowley, 1992), 核遺伝子と細胞質遺伝子支配(Peng & Hodges, 1989)等が報告されている。体細胞胚形成能の低い品種にその能力の高い品種から遺伝子を導入することも場合によっては

有効となろう。

本研究で確立された体細胞胚誘導法は汎用性が高いために品種間差を小さくしていると思われるが、さらに汎用性の高い培養法を確立することによって品種間差という問題は解消できよう。また、この問題を根本的に解決するには、体細胞胚形成を司る遺伝子情報に対する生化学的、分子生物学的アプローチも必要と思われる。

なお、本章第1節で検討したアスパラガスでは、数品種を検討したが EC の誘導及び体細胞胚誘導に品種間差異は観察されなかった。一方、Delbreil & Jullien (1994)は、12系統のアスパラガスを供試した実験を行い、EC 誘導率は系統によって最低 0.6%から最高 19.4%までと系統間差がみられたと報告している。さらに、May & Sink (1995)はプロトプラストからの植物体再生能力に品種間差があったことを報告している。しかしながら、両報告ともに供試した品種中に植物体再生が不可能であった品種はないことから、アスパラガスでは他の作物でみられるような深刻な品種間または系統間差異はないと思われる。その理由として、アスパラガスは栽培の歴史が古い割にはその遺伝的背景が狭い(Lallemand *et al.*, 1994)ことが考えられる。



## 第1章の要約

優良個体を大量増殖することの重要性の高いアスパラガスにおいて、安定かつ効率的な体細胞胚誘導法の確立を試みた。

第1節ではアスパラガスにおける EC の性状を明らかにし、それを誘導、維持、そして増殖するための培養条件を検討した。はじめに無菌実生を材料として NAA と BA を組み合わせた培地または 2,4-D を添加した培地上で EC の誘導を試みた。その結果、無菌実生の鱗芽部が材料として適していることが明らかになった。さらに、EC を観察することによって、アスパラガス EC の性状は次のようであることを明らかにした。個々の細胞の大きさが 10~20  $\mu\text{m}$  の球状で、内容物に富んだ小さな細胞が密に集合して 100~500  $\mu\text{m}$  の細胞塊を形成し、その細胞塊が集合して構成され、細胞塊同士は遊離しやすいためカルス全体としてはフライアブルで、外観は黄白色であった。次に、成株を材料として 2,4-D (5  $\mu\text{M}$ ) を添加した培地で EC の誘導を試み、若茎の側芽茎頂部が材料として適していること及び EC 誘導率が約 10% 程度であることを明らかにした。また、EC を増殖する条件を明らかにするために NAA, BA あるいは 2,4-D を添加した固形培地や液体培地を検討した。その結果、2,4-D (5  $\mu\text{M}$ ) を含む液体培地で回転振盪培養することが最も効率的であることが明らかになり、増殖率は 1 週間に 8~10 倍であることを明らかにした。

第2節では EC から効率的に体細胞胚を誘導するための培養条件、特に培養容器内の環境条件に着目して検討した。液体振盪培養した EC を材料として、再分化培地のゲル化剤の種類と濃度及び培養容器のふたに通気性を付与するか否かを検討したところ、再分化培地を高濃度(1%)のジェランガムでゲル化するとともに培養容器の口を無菌通気膜(ミリラップ)で覆うことによって、水浸状でない正常な体細胞胚を容易に誘導できることを明らかにした。また、培養容器内の乾燥条件が正常な体細胞胚形成に効果的であったと考えられた。

第3節ではアスパラガスで確立した体細胞胚誘導系の汎用性をナスを材料に検討した。無菌実生の子葉部切片を材料として NAA (1~100  $\mu\text{M}$ ) または 2,4-D (1~100  $\mu\text{M}$ ) を含む培地を用いて EC の誘導を試みた。その結果、高濃度の 2,4-D (50  $\mu\text{M}$ ) を含む培地上で培養した切片を同組成の液体培地中で回転振盪培養することによって EC を誘導できることが明らかとなった。誘導された EC を材料として、第2節で確立した培養法を応用したところ、アスパラガスの場合と同様、水浸状でない正常な体細胞胚を容易に誘導できることが明らかとなった。さらに、品種間差について検討したところ、EC の誘導に関しては品種間差が観察されたが、誘導された EC からの体細胞胚形成に関しては大きな品種間差は観察されなかった。

以上のように、これまで不安定であったアスパラガス体細胞胚誘導が安定かつ効率的に行えるようになった。今後、ここで確立された体細胞胚誘導系はアスパラガスの実用的な大量増殖に利用されることが期待されるほか、体細胞胚誘導のメカニズムを解明するための実験系としても利用されることが期待される。

## 第 2 章 アスパラガス体細胞胚の発芽率向上及び 斉一的発芽を目指した培養条件の検討

これまでに、多くの植物種で体細胞胚形成に成功しているが(Williams & Maheswaran, 1986; Ammirato, 1989), 多くの場合、接合胚と比較すると体細胞胚の発芽率及び発芽後の生育旺盛さは極端に低く、実用化を困難にしている。さらに、体細胞胚の分化及びその後の生育の同調性が低いことも実用上問題である。

近年、体細胞胚の発芽率や発芽後の生育旺盛さを高めるための検討が多くの植物種で実施され、効果的な条件が明らかにされつつある。そして、それらの報告のほとんどは体細胞胚と接合胚との形態的近似性を指標として条件検討を行ってきた。しかしながら、形態的観察だけでは体細胞胚正常化の判断が困難な場合も多いことから、最近では、生化学的あるいは分子生物学的なマーカーが望まれている(Buchheim *et al.*, 1989)。

第 1 章では、安定かつ効率的にアスパラガスの体細胞胚を誘導することが可能となったが(Saito *et al.*, 1991), 他の多くの植物種と同様、体細胞胚からの発芽率が低いことが問題であった。そこで、本章第 1 節では、他の植物で体細胞胚の発芽率向上に効果的であった方法を参考に、アスパラガス体細胞胚へ各種の処理を試みた。第 2 節では、胚発達の正常化を示す生化学的なマーカーの探索を試みた。

## 第1節 アスパラガス体細胞胚の成熟を促す培養条件の検討

体細胞胚誘導に成功した植物種では、形態的に正常で、発芽能力が高く生育旺盛な苗になりうる体細胞胚を得るために種々の処理が試みられてきた。

ABA はニンジン(Kamada & Harada, 1981; Ammirato, 1983a)、ヒメウイキョウ(Ammirato, 1983a)やトウジンビエ(Vasil & Vasil, 1981)の体細胞胚形成中の異常な形態を抑え、ダイズ体細胞胚の早生発芽を抑制し(Obendorf & Wettlaufer, 1984)、ダイズ(Ranch *et al.*, 1985)やトウヒ類(Dunstan *et al.*, 1988; Hakman & von Arnold, 1988; Roberts *et al.*, 1990, Attree *et al.*, 1990, 1991, 1992)の体細胞胚の成熟を促した。また、ABA と同様に高浸透圧培地が胚の早生発芽を防止することがニンジン体細胞胚(Ammirato & Steward, 1971)やダイズ接合胚(Obendorf & Wettlaufer, 1984)及びダイズ体細胞胚(Buchheim *et al.*, 1989)で示されている。

カナダトウヒ体細胞胚(Attree *et al.*, 1990)やダイズ体細胞胚(Hammatt & Davey, 1987; Parrot *et al.*, 1988)は乾燥処理によって発芽が旺盛となり、イネではカルスの乾燥処理がその後の体細胞胚形成に有効であることが報告されている(Tsukahara & Hirose, 1992; Rance *et al.*, 1994)。

抗オーキシンはカンキツの体細胞胚の発達に有効であり(Kochba & Spiegel-Roy, 1977)、抗サイトカイニン類はヒメウイキョウ体細胞胚の成熟に効果的であった(Ammirato, 1978)。これらの抗ホルモン類は体細胞胚の成熟に有効であろうと推察されている(Ammirato, 1983b)。

アスパラガスでは体細胞胚への‘水処理’が、発芽率及び発芽の同調性の向上に有効であることが報告されている(Kunitake & Mii, 1990)。また、培地中窒素におけるアンモニア態窒素と硝酸態窒素の比がドイツトウヒ体細胞胚の成熟(Bozhkov *et al.*, 1993)やインド稲の再分化(Grimes & Hodges, 1990)に影響することが報告されている。

このように、ABA、乾燥、抗ホルモン類や培地中の窒素形態が体細胞胚の成熟や発芽を増進する例は数多く報告されている。そこで、本節では、これら種々の処理のアスパラガスへの応用を試み

た。さらに、完熟種子胚を材料として発芽培地の検討を行った。

### 材料および方法

試験には野菜・茶業試験場内圃場（三重県安芸郡安濃町）で栽培した品種‘Mary Washington 500W’、5年生株の若茎側枝を材料にして、第1章に示した方法で誘導したECを供試した。

#### 1. ECの乾燥処理

10  $\mu$ M 2,4-D と 0.2 % ジェランガムを含む LS 培地上で維持・増殖した EC に以下のように、3, 6, 12 及び 24 時間の乾燥処理を行った。滅菌した乾燥ろ紙を 2 枚敷いた径 90 mm のプラスチックシャーレに EC を置床し、シャーレのふたを開放した状態でクリーンベンチ内に所定の時間、放置した。その後 EC を回収し、1 週間液体振盪培養で増殖した細胞懸濁液を第 1 章に示した方法で 4 週間培養し、体細胞胚を誘導した。誘導された体細胞胚は発芽培地へ移植し、4 週間後に発芽率を調査した。

#### 2. 体細胞胚誘導培地の無機塩濃度及び培地の状態に関する検討

第 1 章と同様な方法で体細胞胚を誘導した。ただし、体細胞胚誘導培地は以下のような培地を供試した。LS 培地の無機塩濃度を 1 倍濃度、1/10 倍濃度または 0 倍濃度（無機塩なし）とし、それぞれについて 1.0 % ジェランガムでゲル化した培地と液体培地を供試し、合計 6 区を試験した。4 週間培養を行い、形成された体細胞胚のうち米粒状からバナナ型以降に生育した胚を計数した。

#### 3. 体細胞胚継代培地の検討

第 1 章に示したように、体細胞胚を 1.0 % ジェランガムでゲル化した体細胞胚誘導培地（植物ホルモンを含まない LS 培地）上へ拡散し、無菌通気膜でふたをして 4 週間培養した。この体細胞胚を、以下のような培地へ継代して無菌通気膜でふたをして 4 週間培養した。その後、発芽培地へ移植して 4 週間後に発芽率を調査した。体細胞胚の継代培地は 1.0 % ジェランガムでゲル化した LS

培地を基本として、ABA を 0 (対照区), 1, 10 または 100  $\mu$ M 添加した 4 種, ショ糖濃度を 2 (対照区), 4, 10 または 20 %とした 4 種, 無機塩濃度を 0, 1/4, 1 (対照区) または 4 倍濃度とした 4 種, または抗オーキシンである TIBA (0, 1 または 10 mg/l) と抗サイトカイニンである S-トリアジン(0, 1 または 10 mg/l) を組み合わせた 9 種の合計 18 種類の体細胞胚継代培地を検討した. なお, 体細胞胚を継代せずに発芽培地へ移植した場合と体細胞胚を継代せずに体細胞胚誘導培地で 8 週間培養してから発芽培地へ移植した場合の発芽率も調査した. ABA はろ過滅菌し, オートクレーブした基本培地に添加した. 培養条件は  $27 \pm 1$   $^{\circ}$ C, 16 時間日長, 約 5000 lux としたが, ABA を添加した培地を用いる場合は, 明所と暗所を検討し, ABA 無添加区では 5  $^{\circ}$ C の低温条件を検討した.

#### 4. 体細胞胚への乾燥処理または水処理の検討

第 1 章で示した方法で誘導した体細胞胚に 1, 3, 6 及び 12 時間の乾燥処理及び 1 週間の水処理を行った. 乾燥処理は, 滅菌した乾燥ろ紙を 2 枚敷いた径 90 mm のプラスチックシャーレに体細胞胚を置床し, シャーレのふたを開放した状態でクリーンベンチ内に所定の時間, 放置した. 水処理は, 体細胞胚を滅菌水中で 1 週間回転振盪培養(100 rpm)した(Kunitake & Mii, 1990). その後, 発芽培地へ移植し, 4 週間後に発芽率を調査した.

#### 5. 発芽培地の検討

品種 'Mary Washington 500W' の完熟種子から胚を摘出し, LS 寒天培地を基本とし, 無機塩濃度を 1/8, 1/4 または 1/2 濃度とした培地へ置床した. 1 週間後に発芽状況を調査した.

## 結 果

発芽率は、置床した体細胞胚数に対する発芽体細胞胚数の割合で算出し、結果は無処理の場合の発芽率を 100 とした場合の相対値で示した。なお、無処理の場合の発芽率は 5~10 %であった。

## 1. EC の乾燥処理

EC は、本法で乾燥処理した場合、12 時間以上の処理では過乾燥により枯死した。3 時間処理や 6 時間処理においても体細胞胚の発芽率は低下した (第 8 図)。

## 2. 体細胞胚誘導培地の無機塩濃度及び培地の状態の検討

液体培地及び 1.0 % ジェランガム培地ともに体細胞胚誘導培地中の無機塩濃度を低くすると、形成された体細胞胚の数は少なくなるとともに水浸状となった (第 9 図)。

## 3. 体細胞胚継代培地の検討

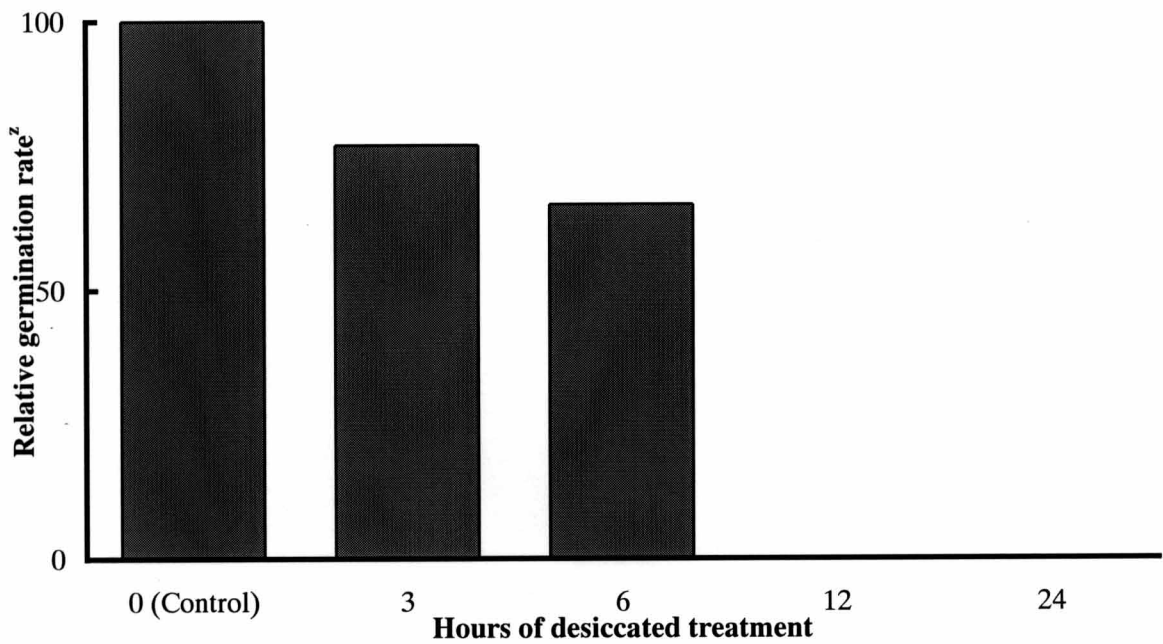
体細胞胚継代培地として ABA を添加した培地を用いた場合、及び低温下で体細胞胚を培養した場合の結果を第 10 図に示した。光条件や ABA 濃度に対して一定の傾向はみられなかったが、継代した場合は継代しない場合に比較して体細胞胚の発芽率が上昇する傾向にあった。

形成された体細胞胚をショ糖濃度や無機塩濃度を変えた種々の体細胞胚継代培地へ移植して 4 週間培養すると、継代しない場合に比較して体細胞胚の発芽率が上昇する傾向にあったが、ショ糖濃度や無機塩濃度に対して一定の傾向は認められなかった (第 11, 12 図)。S-トリアジンの添加は発芽率に大きな影響を与えなかったが、TIBA の添加は発芽率を低下させる場合が多かった (第 13 図)。

このように、抗オーキシンを添加した場合を除いて、いずれの処理でも無処理の場合よりは発芽率が上昇する傾向にあったことから、発芽培地へ移植する前の体細胞胚培養期間延長の効果があったものと思われた。

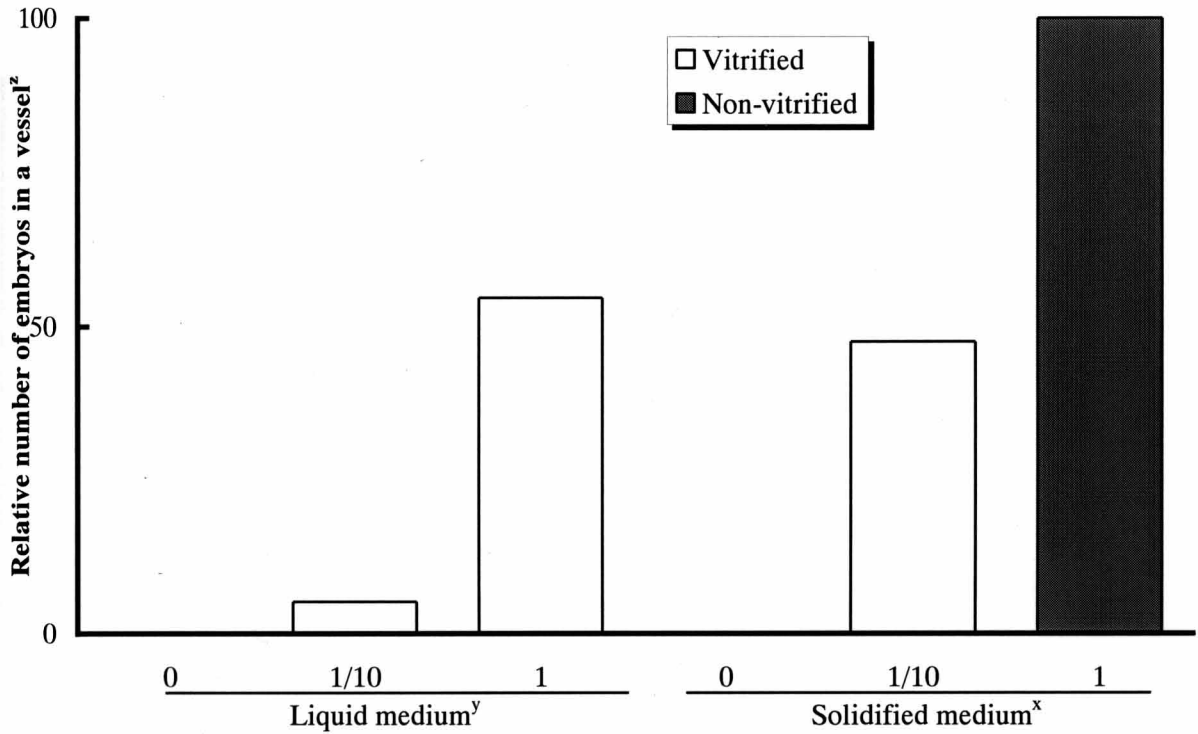
## 4. 体細胞胚への乾燥処理または水処理の検討

体細胞胚の乾燥処理は発芽率を上昇させるには効果がなかった (第 14 図)。体細胞胚を 1 週間減



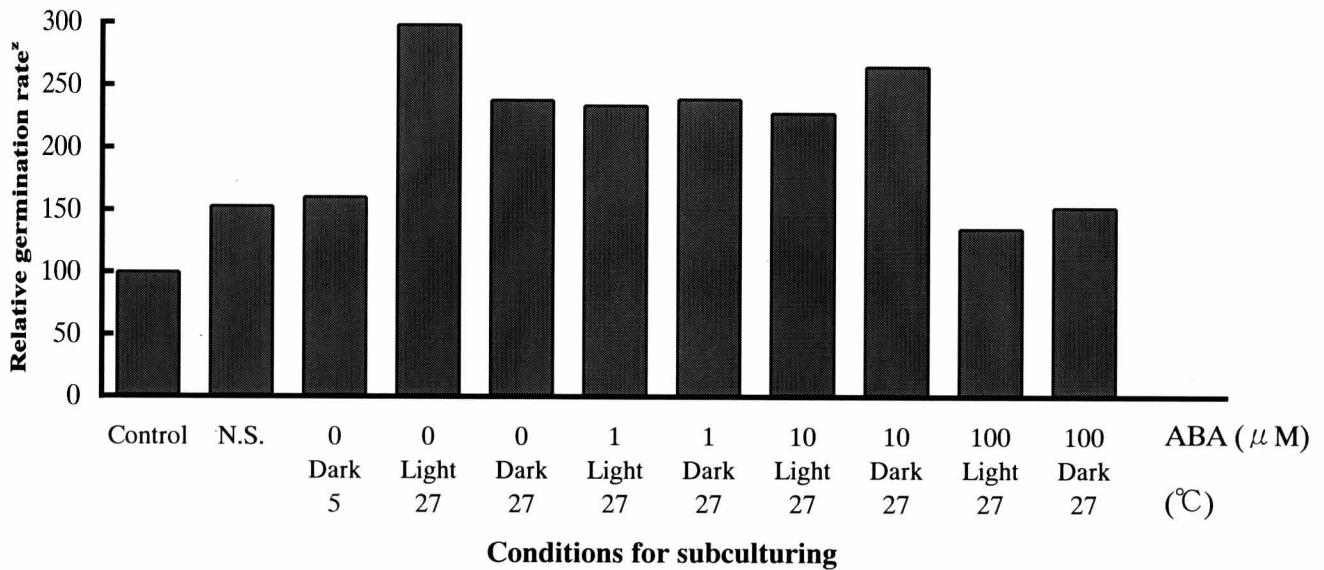
**Figure 8.** Effect of desiccated treatment of embryogenic callus on germination from somatic embryos. Embryogenic callus was cultured for a week in liquid medium on the rotary shaker after desiccation treatment. Somatic embryos cultured 4 weeks on regeneration medium were transferred to germination medium. Germination rate was scored 4 weeks after transfer to germination medium. <sup>2</sup>Relative value of germination rate to control (Control = 100).



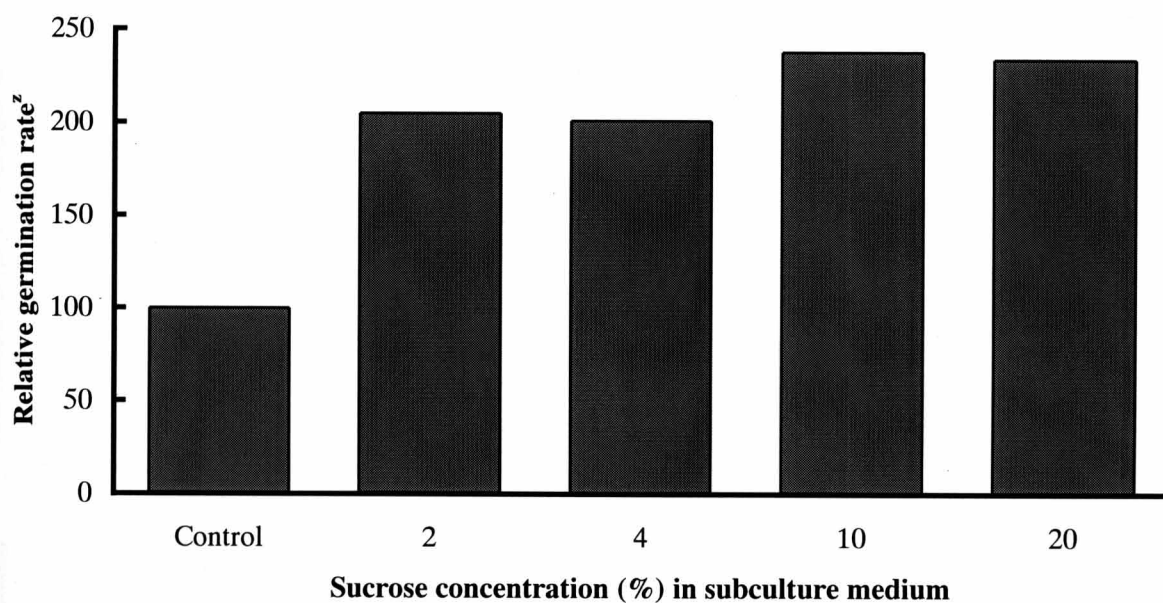


**The concentration of inorganic nutrient and the state of regeneration medium**

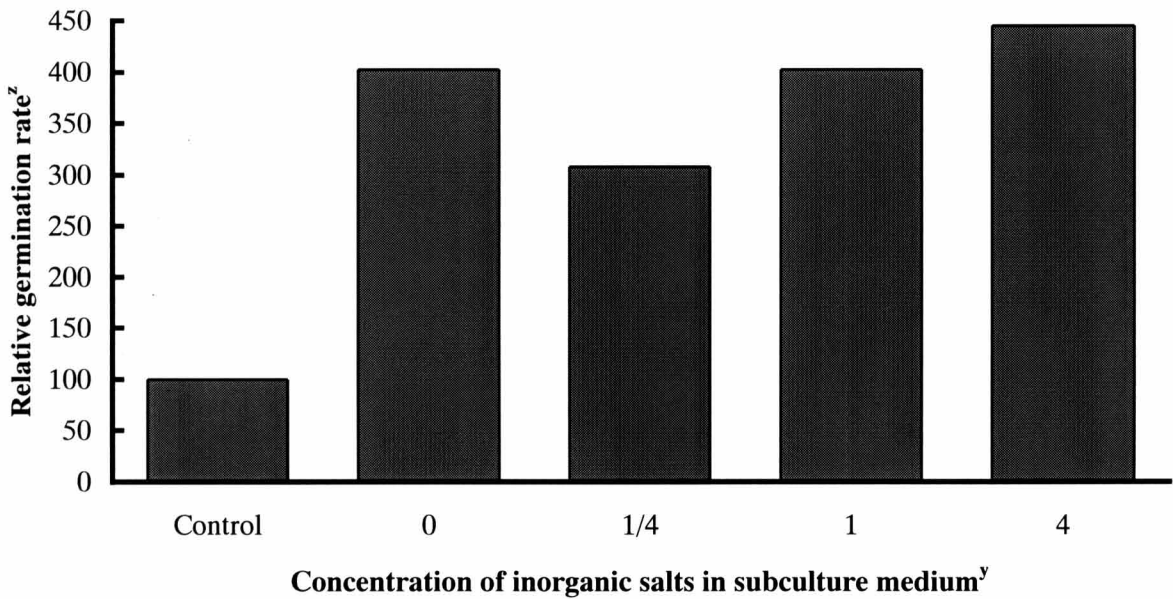
**Figure 9.** Effect of the concentration of inorganic nutrient in regeneration medium on formation of somatic embryos. <sup>2</sup>Relative number of somatic embryos to that induced on the medium solidified with 1.0 % gelrite. <sup>y</sup>Cultured on the rotary shaker. <sup>x</sup>Solidified with 1.0 % gelrite.



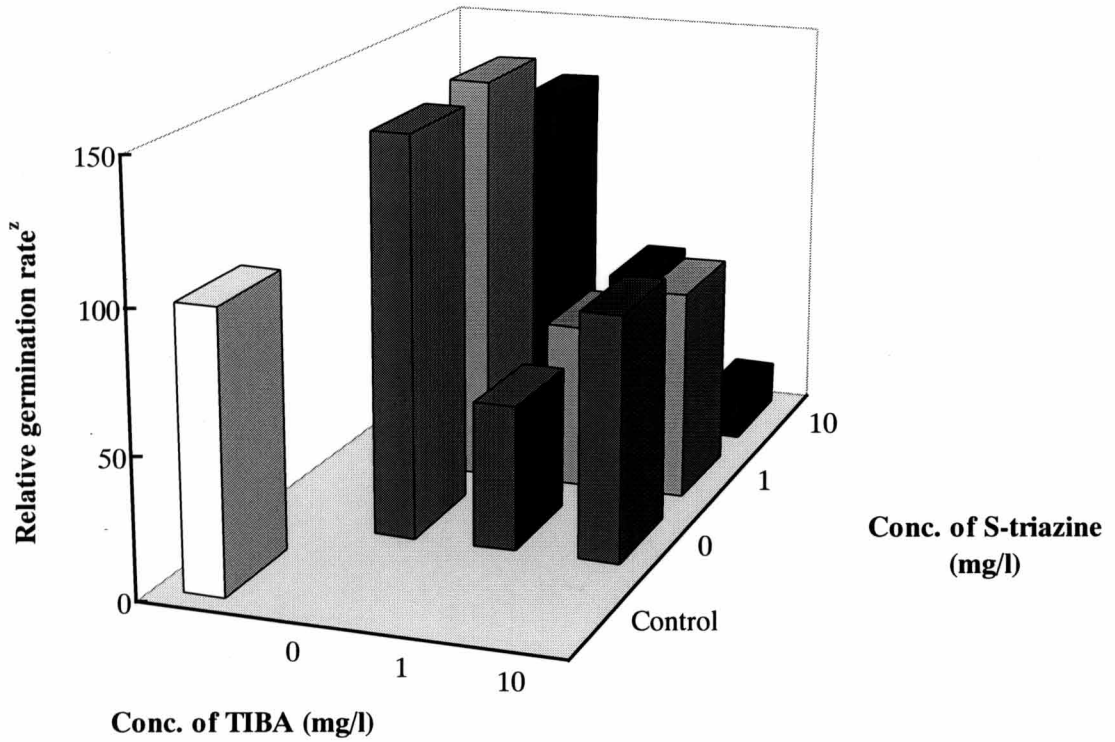
**Figure 10.** Effect of conditions for subculturing and ABA in the medium on germination. Somatic embryos cultured 4 weeks on regeneration medium were transferred to germination medium after subculturing under various conditions and ABA concentration for 4 weeks, or without subculturing (control). <sup>2</sup>Relative value of germination rate to control (Control = 100). N.S.; Somatic embryos were cultured 8 weeks on regeneration medium without subculturing.



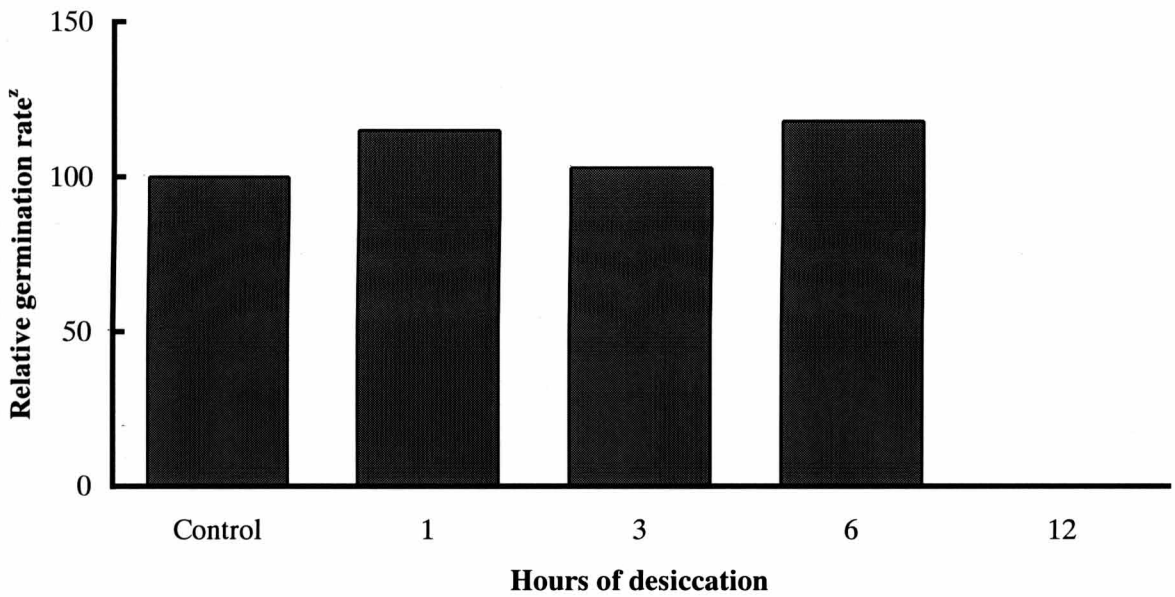
**Figure 11.** Effect of subculturing somatic embryos to the medium containing various concentration of sucrose on germination. Somatic embryos cultured 4 weeks on regeneration medium were transferred to germination medium without subculturing (control), or after subculturing for 4 weeks. Germination rate was scored 4 weeks after transfer to germination medium. <sup>2</sup>Relative value of germination rate to control (Control = 100).



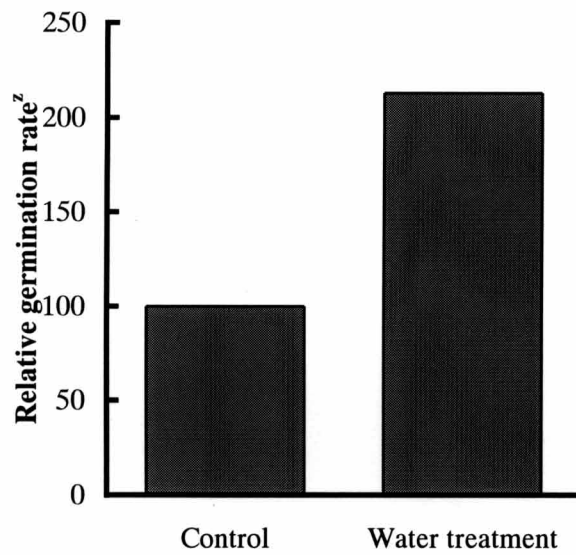
**Figure 12.** Effect of subculturing somatic embryos to the medium containing various concentration of inorganic salts on germination. Somatic embryos cultured 4 weeks on regeneration medium were transferred to germination medium without subculturing (control), or after subculturing for 4 weeks. Germination rate was scored 4 weeks after transfer to germination medium. <sup>z</sup>Relative value of germination rate to control (Control = 100). <sup>y</sup>Relative concentration of inorganic salts in the medium (1 = LS medium).



**Figure 13.** Effect of subculturing somatic embryos to the medium containing various combination of TIBA and S-triazine on germination. Somatic embryos cultured 4 weeks on regeneration medium were transferred to germination medium without subculturing (control), or after subculturing for 4 weeks. Germination rate was scored 4 weeks after transfer to germination medium. <sup>z</sup>Relative value of germination rate to control (Control = 100).



**Figure 14.** Effect of desiccation treatment to somatic embryos on germination. Somatic embryos cultured 4 weeks on regeneration medium were transferred to germination medium after desiccated for various hours, or without desiccation treatment (control). Germination rate was scored 4 weeks after transfer to germination medium. <sup>2</sup>Relative value of germination rate to control (Control = 100).



**Figure 15.** Effect of water treatment<sup>y</sup> to somatic embryos on germination. Somatic embryos cultured 4 weeks on regeneration medium were transferred to germination medium after water treatment, or without treatment (control). <sup>2</sup>Relative value of germination rate to control (Control = 100). <sup>y</sup>See materials and methods.

**Table 8.** Effect of concentration of inorganic salts in germination medium on development from asparagus zygotic embryos.

| Relative conc.of inorganic salts <sup>2</sup> | Shoot length (mm) | Root length (mm) | Colour of shoot |
|---|-------------------|------------------|-----------------|
| 1/8   | 24.0              | 17.0             | Pale green      |
| 1/4   | 39.0              | 25.0             | Pale green      |
| 1/2   | 51.0              | 34.0             | Green           |

<sup>2</sup>Relative concentration of inorganic salts in the medium (LS medium = 1).

菌水中で培養した場合もその発芽率は無処理の約 2 倍程度であった (第 15 図).

#### 5. 発芽培地の検討

種子胚を用いて発芽培地の検討をしたところ、供試した培地の中では 1/2 LS 寒天培地が最も良好な発芽を示し (第 8 表)、胚のカルス化等の異常はみられなかった。

### 考 察

カルスの乾燥処理がコムギ(Carman, 1988)やイネ(Tsukahara & Hirose, 1992; Rance *et al.*, 1994)の体細胞胚形成に有効であることが報告されている。Tsukahara & Hirose (1992)はろ紙を 1 枚敷いたシャーレ上にカルスを置き、ふたをしてパラフィルムで封じた状態でクリーンベンチ内に放置して最長 96 時間の乾燥処理を行った。その結果、24 時間程度の乾燥処理が体細胞胚形成率を大幅に向上させることを明らかにし、その要因としてカルスの水分含量の低下を挙げ、水分含量の低下に対して細胞が生理的に対応するためにはある一定の処理時間が必要であると示唆している。さらに、水分ストレスを受けた植物は ABA 合成活性が高くなること(Milborrow, 1974; Zeevaart, 1980)から乾燥処理中に増加した内生 ABA が関与している可能性を考察している。今回の試験でカルス乾燥の効果はみられなかったのは、急激な乾燥処理を行ったために体細胞胚形成に阻害的であったことが考



えられるほか、乾燥処理後の液体振盪培養中に効果が失われた可能性も考えられた。

第1章第2節でも示したように、アスパラガス体細胞胚は液体培地中では順調に生育せず、固形培地を用いたほうが良好な発達を示した。また、無機塩濃度の低下は体細胞胚形成に阻害的であった。マンゴー体細胞胚でも液体培地では種々の異常が生じるが、固形培地では異常が少ないことが報告されている(DeWald *et al.*, 1989)。

ABAは接合胚の成熟や休眠の制御に大きく関与している(Crouch & Sussex, 1981; Ackerson, 1984)ことから、体細胞胚に対しても効果が期待され、種々の検討が行われてきた。ABAの処理はヒメウイキョウやニンジン体細胞胚の奇形発生を抑え(Ammirato, 1983a; Kamada & Harada, 1981)、ダイズ体細胞胚の早生発芽を抑制した(Obendorf & Wettlaufer, 1984)。また、アルファルファ未熟体細胞胚に対しては早生発芽を防止するとともに成熟及び貯蔵タンパク質の蓄積を促した(Fujii *et al.*, 1990)。さらに、ダイズ(Ranch *et al.*, 1985)、カナダトウヒ(Dunstan *et al.*, 1988; Hakman & von Arnold, 1988; Roberts *et al.*, 1990, Attree *et al.*, 1990, 1991, 1992)、ドイツトウヒ(Boulay *et al.*, 1988)やコロラドトウヒ(Afele *et al.*, 1992)では体細胞胚の成熟にはABAが必要であることが明らかにされている。

しかしながら、今回の結果ではABAの効果を明らかにすることはできなかった。von Arnold & Hakman (1988)は、齢の若い体細胞胚を成熟させるには、齢の古い体細胞胚より長時間のABA処理を必要とすることを報告している。アスパラガスの場合も体細胞胚の齢とABA処理時間等を詳細に検討する必要がある。

光条件や温度条件が胚の成熟に影響する例が種々報告されている。例えば、ニンジン(Ammirato & Steward, 1971)、ヒメウイキョウ(Ammirato, 1974)及びマンゴー(DeWald *et al.*, 1989)では完全な暗黒条件が体細胞胚の成熟には良好であった。アスパラガス胚様体は4℃で2週間以上の低温処理によって異常発芽が抑制され、発芽率が向上し、系統によっては、90%を越える発芽率を示す場合もあった(国武ら, 1995)。アルファルファ(Redenbaugh *et al.*, 1986)、ニンジン(Kitto & Janick, 1985)や *Brassica napus* (Kott & Beversorf, 1990)の体細胞胚からの発芽にも低温の効果があつた。しかしながら、今回

の結果から光条件や温度条件による影響を明らかにすることはできなかった。

ダイズ接合胚では ABA (1-100  $\mu$ M)と同様の早生発芽抑制効果が高濃度シヨ糖(10 %)でもみられ (Obendorf & Wettlaufer, 1984), ダイズ未成熟体細胞胚を高シヨ糖濃度培地(9.5 %)で8週間培養すると, 生育旺盛な幼植物へと生長した(Buchheim *et al.*, 1989). サトウキビ(Ahloowalia & Marezki, 1983), マンゴー(DeWald *et al.*, 1989)やエンバク(Bregitzer *et al.*, 1989)では高シヨ糖濃度(6 %)が早生発芽やそのほかの異常発生を軽減し, アルファルファではシヨ糖濃度を6 %に高めた培地上で培養すると体細胞胚の生育の同調性が高まる上に発芽後の苗としての生長が旺盛になった(Anandarajah & McKersie, 1990). さらに, カナダトウヒではポリエチレングリコール(約6 %)による浸透圧処理が体細胞胚の成熟に有効であった(Attree *et al.*, 1991, 1992). このように植物の胚の発育及び成熟への高浸透圧培地の有効性が報告されているが, 今回の試験では明らかでなかった。

体細胞胚の再カルス化を防ぎ, 体細胞胚の成熟を促す(Ammirato, 1983b)ことを期待して, IAAの移動阻害作用(Katekar & Geissler, 1980; Depta *et al.*, 1983)によって抗オーキシニン性を示すTIBAや, 抗サイトカイニンであるS-トリアジンの処理を検討した. TIBAはサトイモカルスからの再生個体の奇形発生を減らし(Nyman & Arditti, 1984), サツマイモ体細胞胚形成系における奇形を減らす効果があった(Chee & Cantliffe, 1989). しかしながら, アスパラガス体細胞胚の再カルス化は抑えられず, その発芽には阻害的であった。

種子の発育過程において, 胚は成熟後に乾燥し, 乾燥は胚発達から発芽へと代謝を転換させるスイッチとなる(Adams & Rinne, 1980; Dasgupta & Bewley, 1982; Rosenberg & Rinne, 1986; Kermode & Bewley, 1988). 体細胞胚においても同様で, 乾燥は体細胞胚の成熟及び発芽に大きく影響する. ダイズ (Hammatt & Davey, 1987; Buchheim *et al.*, 1989), アルファルファ(Senaratna *et al.*, 1989), *Brassica napus* (Kott & Beversdorf, 1990)や *Hevea brasiliensis* (Etienne *et al.*, 1993a)では体細胞胚の乾燥による成熟の促進及び発芽率の上昇が観察されている. これらの例では乾燥方法に相違はあるが, 数十分から数時間程度の通風によって体細胞胚を急激に乾燥させる場合と1から3週間程度の時間をかけて

乾燥させた場合を比較し、後者の効果が高いことが報告されている。これらのことから、本節で試みたアスパラガス体細胞胚への乾燥処理が有効でなかったのは乾燥が急激すぎたためと思われた。

Kunitake & Mii (1990)は、アスパラガスの1~3 mmの体細胞胚を1 mm径のナイロンメッシュを用いて集め、0.5 g (50~100個の体細胞胚)を25 mlの滅菌水へ入れて1週間、60 rpmで往復振盪培養するという‘水処理’が体細胞胚からの発芽率上昇及び発芽の同調性の向上に有効で、‘水処理’なしでは、体細胞胚はほとんど発芽せず、二次胚が形成されたり、再カルス化したことを報告している。しかしながら、本実験ではその効果は確認できなかった。同調性という点では、第1章で確立した方法を用いると、ミリラップでふたをした培養容器内の1.0%ジェランガムでゲル化した培地上では体細胞胚は発芽せず、発芽培地へ移植すると一斉に発芽した。したがって、本培養系における発芽の同調性は高いといえる。同様に、Buchheim *et al.* (1989)は成熟培地で培養中に胚の発育は比較的同調的になることを報告している。

以上のように種々の条件を検討したところ、発芽率向上に対して顕著な条件は明らかにできなかったが、発芽培地へ移植する前の体細胞胚培養期間が長いほど発芽率は向上する傾向にあった。ダイズ体細胞胚は植物へと旺盛に転換するだけの能力を獲得するには一定期間の成熟期間を必要とし(Buchheim *et al.*, 1989)、接合胚でも同様なことが報告されている(Adams *et al.*, 1983)。体細胞胚で一定の成熟期間を要する理由として、前ステップで用いたオーキシシン(2,4-D)の残効を挙げており、それがなくなるために一定期間を要すると推察し、オーキシシンを除去する目的で体細胞胚貯蔵培地に活性炭を添加して好結果を得た例もある(Buchheim *et al.*, 1989)。トウヒ類はABAを添加した培地上で4~8週間培養すると体細胞胚の発芽が向上した(von Arnold & Hakman, 1988; Hakman & von Arnold, 1988; Attree *et al.*, 1992; Afele *et al.*, 1992)。ABAの効果に加えて貯蔵期間が好影響を与えたと考えられる。このように、一般的に体細胞胚が成熟するには一定の期間を要し、その間に徐々に生理的な変化を遂げると考えられる。

アスパラガス体細胞胚の発芽培地にはIAAやIBA等のオーキシシンやGA<sub>3</sub>を少量添加している例

が多い(Steward & Mapes, 1971; Bui Dang Ha *et al.*, 1975; Reuther, 1977; Kunitake & Mii, 1990). アスパラガス以外の植物種においても同様である(Ammirato, 1983b). しかしながら, 本実験で検討したアスパラガス完熟種子胚を用いた試験の結果, 発芽培地に植物ホルモンを添加しない 1/2 LS 培地上で正常に発芽したことから, 正常な体細胞胚を誘導できれば, 発芽のために植物ホルモンを添加する必要はなく, 1/2 LS 寒天培地上で十分に発芽すると思われ, 成熟した正常な体細胞胚を誘導することの重要性が確認された.

## 第2節 アスパラガス体細胞胚と接合胚におけるタンパク質泳動パターンの比較

体細胞胚が健全な植物体に生長する能力を有するか否かは, 正常な接合胚との生化学的, 生理的また形態的な点における類似性によって判断することができると考えられる(Flinn *et al.*, 1993). したがって, 体細胞胚と接合胚を比較検討し, 類似性を高める条件を検討することは生育旺盛な再分化苗を生産する上で重要であるが, 形態的観察だけでは正常な体細胞胚の判断が困難な場合も多いことから生化学的に解析することの重要性が指摘されている(Finkelstein & Crouch, 1984). Etienne *et al.* (1993b)は内生 IAA と ABA の含量を体細胞胚と接合胚とで比較し, 体細胞胚ではこれらの含量が極めて少ないことと体細胞胚の発達中にこれらの量的変化がないことが植物体へ順調に生長しないことと関連があると推察した. アルファルファでは, 体細胞胚経由の幼植物体の生育旺盛さと体細胞胚中の全タンパク質含量との間には正の相関があった(Lecouteux *et al.*, 1993). ドイツトウヒでは, 体細胞胚中の貯蔵タンパク質は接合胚の場合と同様であったと報告されている(Hakman, 1993). さらに, interior spruce で体細胞胚と接合胚の貯蔵タンパク質を比較したところ, 貯蔵タンパク質の遺伝子発現は成熟初期から中期は極めて類似していたが, 成熟後期は異なっていた(Flinn *et al.*, 1993).

第1章に示したように, 培地のゲル化剤濃度を高めて培養容器を無菌通気膜で封じることによ

て効率よくアスパラガスの体細胞胚誘導を行うことが可能となった(Saito *et al.*, 1991). しかしながら、誘導された体細胞胚のわずか 10 %程度が正常に発芽するのみで、大部分は発育が止まる、発根のみで芽が伸長しない、または再カルス化してしまった。この発芽の貧弱性は体細胞胚の発育過程で何らかの問題があるためと思われた。そこで、アスパラガス体細胞胚の発育について明らかにするために体細胞胚と接合胚の可溶性タンパク質を SDS-PAGE によって比較した。

## 材料及び方法

### 1. EC 及び体細胞胚の誘導

野菜・茶業試験場内圃場で栽培したアスパラガス（品種‘ウェルカム’、サカタのタネ）5 年生株の約 10~20 cm に伸長した若茎を採取した。有効塩素濃度 1 %の次亜塩素酸ナトリウム（アンチホルミン）によって 15 分間滅菌処理し、続いて滅菌水で 3 回洗浄した。滅菌後に若茎の鱗片葉を除去し、顕微鏡下で大きさ 0.5~4 mm の側芽頂部を切り出して、2 % ショ糖を含む LS 固形培地（寒天 0.8 %）に 10  $\mu$ M 2,4-D を添加した培地へ置床した。EC を誘導・増殖後、第 1 章第 2 節と同様の方法で体細胞胚を誘導した。すなわち、体細胞胚誘導時には、1.0 % ジェランガムでゲル化した培地を用い、容器はミリラップ(MW)で封じた。

### 2. 分析試料のサンプリング

野菜・茶業試験場内圃場で栽培したアスパラガス雌株に着生した種子から長さ約 1, 2 及び 3 mm の未熟胚、及び完熟胚を採取した。長さ約 1, 2 及び 3 mm の未熟胚は、それぞれ ZE(Zygotic Embryo)-1, ZE-2 及び ZE-3 と表した。ZE-1 は透明で半透明の胚乳に覆われ、ZE-2 は半透明で乳白色の胚乳に覆われ、さらに ZE-3 は白色で糊熟状の胚乳に覆われていた。

EC は継代 1 週間目に採取した。体細胞胚は誘導処理 4 週間目、7 週間目及び 10 週間目に採取し

た。以降、それぞれ SE(Somatic Embryo)-4, SE-7 及び SE-10 とした。また、完熟種子胚(ZE)及び誘導処理 4 週間後の体細胞胚(SE-4)を、2 % ショ糖及び 0.8 % 寒天を含む 1/2 濃度の LS 培地上で発芽させて 2 週間目に茎、鱗芽部及び根を採取した。

### 3. タンパク質の抽出及び電気泳動

1 個の胚を少量の海砂とともに 1.5 ml マイクロチューブに入れて下記の抽出用緩衝液 400  $\mu$ l 中で磨砕した。抽出用緩衝液の組成は 62 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2.3 % sodium dodecyl sulfate (SDS), 5 % 2-mercaptoethanol, 10 % (v/v) glycerol, 0.005 % bromophenol blue とした。磨砕後 2 分間沸騰水中で湯煎し、4  $^{\circ}$ C, 15000 rpm で 20 分間遠沈した。回収した上清に少量のショ糖 (約 10 mg) を加えて同じ条件で再度遠沈した。EC と幼植物各部についても同様にして全タンパク質を抽出した。

6~20  $\mu$ l の上清を、0.1 % SDS を含む 1.0 mm 厚のポリアクリルアミドゲルを用いた Laemmli (1970) の方法で電気泳動した。濃縮ゲルと分離ゲルのアクリルアミド濃度は 4.5 % 及び 15 % とした。電気泳動用緩衝液組成は、25 mM Tris-HCl (pH 8.3), 192 mM glycine, 0.1 % SDS とした。ゲル 1 枚当たり 15 mA の定電流で 4 時間泳動後、ゲルを銀染色キット (和光純薬) で染色した。電気泳動は異なる試料を用いて少なくとも 3 回は行い、タンパク質泳動パターンが各サンプルで同じであることを確認した。

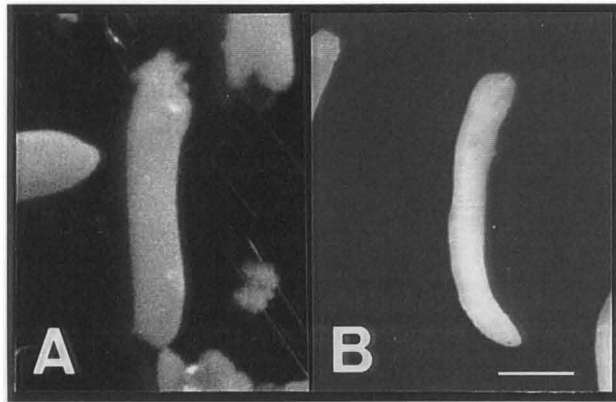
## 結 果

アスパラガス体細胞胚は球状胚からこん棒状またはバナナ型胚へと発達する。誘導処理 4 週間後の体細胞胚(SE-4)はすでにこん棒状またはバナナ型胚のステージに達しており、7 週間後(SE-7)または 10 週間後(SE-10)も形態的な差はなかった。接合胚はこん棒状の形態であり、体細胞胚は接合胚と外観的に極めて類似していた (第 16 図)。

第 17 図に体細胞胚、接合胚及び EC から抽出したタンパク質の電気泳動パターンを示した。これらのタンパク質は次の 3 つのカテゴリーに分けることができた。すなわち、すべてのサンプルで共通してみられるポリペプチド (カテゴリー I)、EC とすべての体細胞胚にはみられるが、接合胚ではみられない、もしくはほとんどみられないポリペプチド (カテゴリー II)、及び EC や誘導処理 4 週間後の体細胞胚ではみられない、もしくはほとんどみられないが、成熟接合胚や誘導処理 10 週間後の体細胞胚ではみられるポリペプチド (カテゴリー III)、の 3 つである。大部分のポリペプチドはカテゴリー I に属し、これらは胚の分化に特異的ではなく、細胞の分裂や生長の基本的な代謝に関するポリペプチドであると思われた。18~20 KD や 35 KD 周辺のポリペプチドはカテゴリー II に属し、17.5 KD と 21 KD のポリペプチドはカテゴリー III に属した。

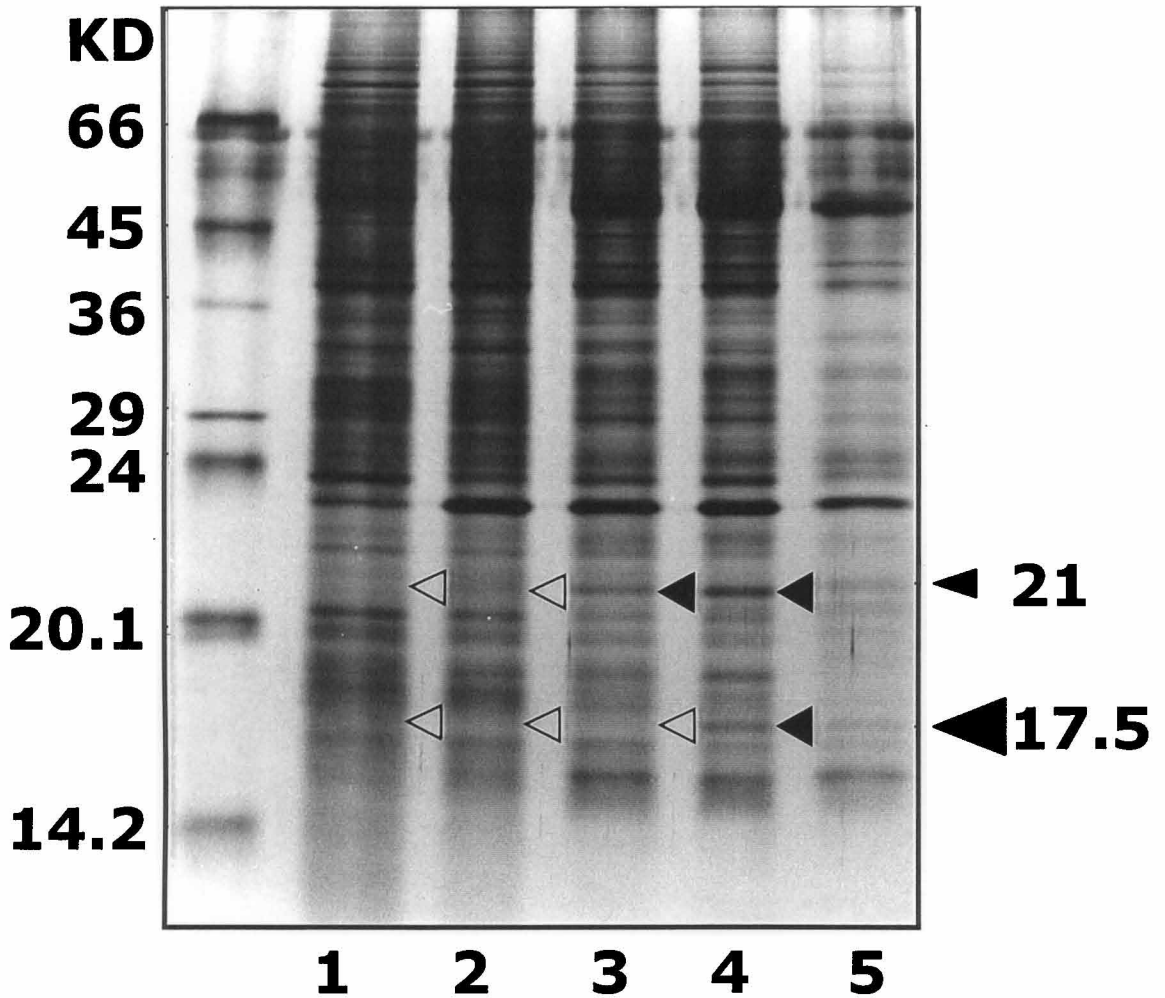
未熟接合胚(ZE-1, 2 及び 3)及び成熟接合胚から抽出したタンパク質の電気泳動パターンを第 18 図に示した。カテゴリー III に属するポリペプチドのうち、21 KD のポリペプチドは若い未熟接合胚(ZE-1 及び 2)では観察されず、より成熟の進んだ ZE-3 及び成熟接合胚で観察された。一方、17.5 KD のポリペプチドは成熟接合胚でのみ観察された。

さらに、21 KD のポリペプチドは実生及び体細胞胚由来幼植物の鱗芽部及び根でも観察されたが、17.5 KD のポリペプチドは成熟接合胚以外のサンプルでは観察されなかった (第 19 図)。

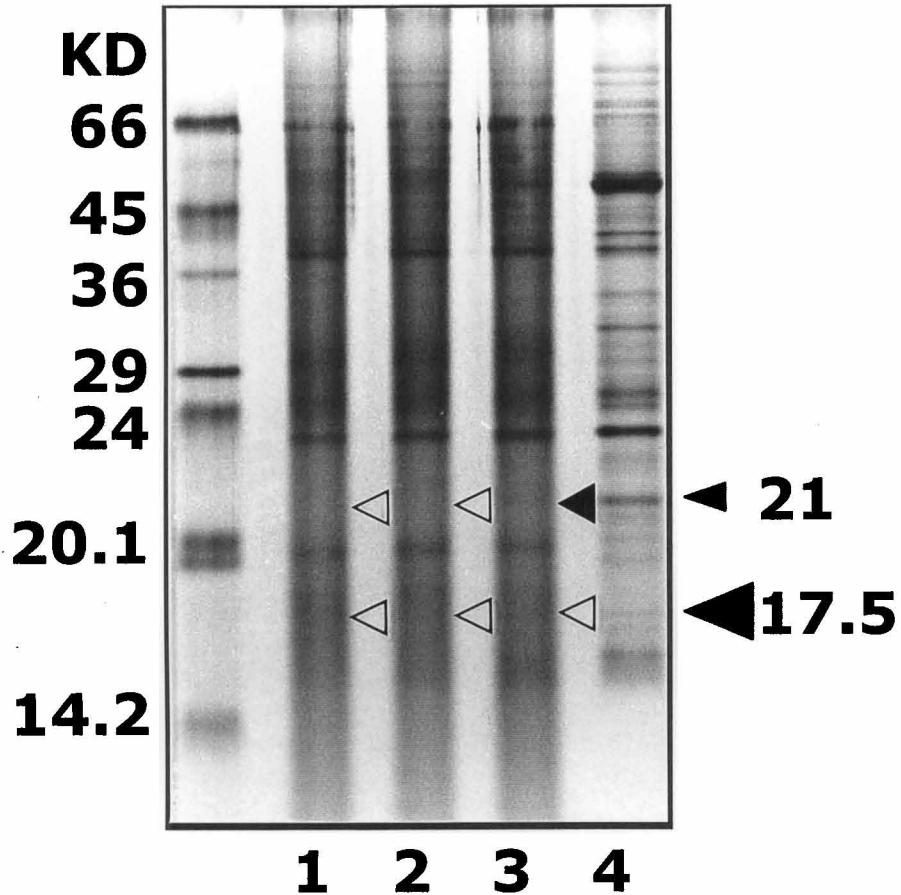


**Figure 16.** Somatic embryos at 4 weeks after transferring to the regeneration treatment (A) and mature zygotic embryos (B). Bar equals 1 mm.

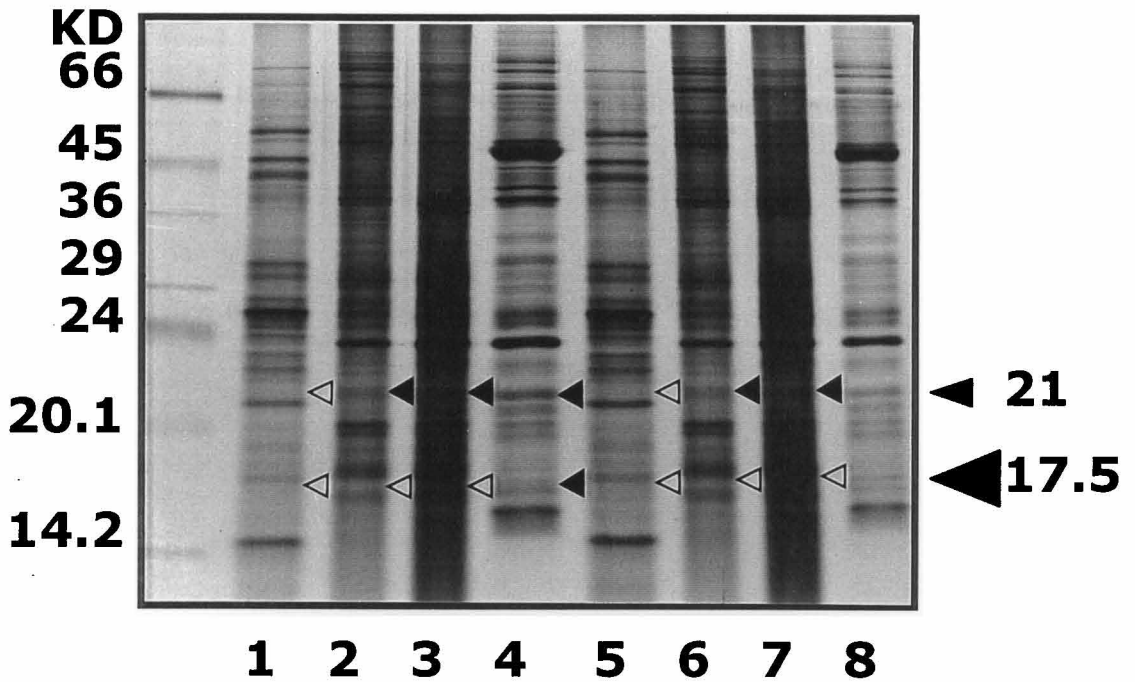




**Figure 17.** SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of total protein extracted from embryogenic callus (lane 1), somatic embryo at 4 (SE-4), 7 (SE-7) and 10 (SE-10) weeks after the regeneration treatment (lane 2, 3 and 4, respectively) and mature zygotic embryo (lane 5). Arrowheads indicate the 21 and 17.5 KD polypeptides. Open arrowheads mark the position of the polypeptides where they are not detectable. Molecular masses of protein standards are indicated on the left.



**Figure 18.** SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of total protein extracted from immature zygotic embryos approx. 1 (ZE-1) , 2 (ZE-2) and 3 (ZE-3) mm long (lane 1, 2 and 3, respectively) and mature zygotic embryo (lane 4). Arrowheads indicate the 21 and 17.5 KD polypeptides. Open arrowheads mark the position of the polypeptides where they are not detectable. Molecular masses of protein standards are indicated to the left.



**Figure 19.** SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of total protein extracted from stem, crown and root of seedling derived from somatic embryo (lane 1, 2 and 3, respectively), ones derived from zygotic embryos (lane 5, 6 and 7, respectively) and from mature zygotic embryo (lane 4 and 8). Arrowheads indicate the 21 and 17.5 KD polypeptides. Open arrowheads mark the position of the polypeptides where they are not detectable. Molecular masses of protein standards are indicated to the left.

## 考 察

17.5 KD のポリペプチドは、未熟胚(ZE-1, 2, 3)やアスパラガス幼植物の茎、鱗芽部及び根ではみられず、完熟種子胚及び SE-10 でのみ観察されたことから、胚の成熟に関連すると思われた(第 17~19 図)。一方、21 KD のポリペプチドは、完熟種子胚、SE-7, -10, ZE-3 (第 18 図)、幼植物の鱗芽部及び根(第 19 図)でもみられたことから、成熟胚に特異的とはいえなかった。

誘導処理 4 週間後の体細胞胚(SE-4)はカテゴリー III のポリペプチドを欠き、カテゴリー II のポリペプチドを有していた。このように SE-4 は形態的には接合胚と類似していたが、ポリペプチド電気泳動パターンでは成熟した接合胚と生化学的に異なることが示唆された。この違いが、アスパラガス体細胞胚の発芽が貧弱であることと何らかの関連があると考えられた。一方、誘導処理 10 週間後の体細胞胚(SE-10)のポリペプチド電気泳動パターンは完熟種子胚と類似しており、体細胞胚は時間の経過とともに成熟過程へと代謝のプロセスが変化していったと考えられた。このように体細胞胚の成熟に一定期間を要することは本章第 1 節の結果と一致するほか、ダイズ体細胞胚(Buchheim *et al.*, 1989)や接合胚(Adams *et al.*, 1983)、シトカトウヒ体細胞胚(Roberts *et al.*, 1991)でも同様なことが報告されている。

一般的に、接合胚と比較して体細胞胚中の貯蔵タンパク質量は非常に少ない、もしくはないが(Crouch, 1982)、これは体細胞胚が十分に成熟していないことを示し、それがその後の苗としての貧弱さにつながっていると考えられている。一方、貯蔵タンパク質量の多い体細胞胚は少ない場合よりも発芽後の生育が旺盛であることがアルファルファやワタで報告されている(Redenbaugh *et al.*, 1986; Shoemaker *et al.*, 1987; Stuart *et al.*, 1988)。このように、貯蔵タンパク質の量は成熟を示すマーカーになりうると考えられている(Roberts *et al.*, 1990)。

本実験ではタンパク質を量的にとらえるのではなく成熟に特異的なポリペプチドを検索することを目標とした。その結果、17.5 KD のポリペプチドはその機能については明らかでないが、完熟種

子胚及び SE-10 でのみ観察されたことから、アスパラガス胚の成熟や発芽の前段階と関連があるものと思われた。このポリペプチドはアスパラガス体細胞胚の成熟条件を検討する上での一つのマーカーになりうると考えられた。

ミリラップを用いた通気性のある培養法では誘導される体細胞胚の水分含量を低下させ、乾燥がアスパラガス体細胞胚の発達には重要であることを明らかにした(Saito *et al.*, 1991)。乾燥は体細胞胚の成熟を制御する一因で、本章第 1 節で検討したように急激な乾燥処理は逆効果であったが、ミリラップによる通気条件下でゆっくりと乾燥するのがアスパラガスの体細胞胚の成熟には好適と思われた。体細胞胚の発芽に及ぼす乾燥処理の有効性は、ダイズ(Parrot *et al.*, 1988)、アルファルファ(Senaratna *et al.*, 1989)や針葉樹類(Roberts *et al.*, 1991)で報告されている。乾燥処理は成熟を含めた、胚の発芽に必要な過程の引き金になるのかもしれない。

## 第 2 章の要約

第 1 章において安定かつ効率的にアスパラガス体細胞胚を誘導することが可能となった。しかしながら、体細胞胚からの発芽率が低いことが問題であったため、その点を改良するための検討を行った。

第 1 節では、他の植物で体細胞胚の発芽率向上に効果的であった方法を中心に、アスパラガス体細胞胚へ各種の処理を試みた。EC の乾燥処理、体細胞胚誘導培地の無機塩濃度の検討、種々の培地（ABA 添加、ショ糖濃度上昇、抗オーキシシンや抗サイトカイニンの添加等）での体細胞胚の培養、体細胞胚の乾燥処理等を検討した。その結果、顕著に体細胞胚の発芽率を向上させる条件は明らかにできなかったが、体細胞胚の培養期間が長いほど発芽率が向上する傾向にあった。これは培養中に体細胞胚が成熟しつつあるためと思われた。

第 2 節では、胚発達の正常化を示す生化学的なマーカーの検索を試みた。アスパラガス体細胞胚と接合胚から全タンパク質を抽出して SDS-PAGE を行い、両者を比較した。その結果、誘導処理 7 週間後の体細胞胚のポリペプチド電気泳動パターンは、完熟種子中の接合胚とカルスの中間的なパターンを示した。さらに接合胚で、成熟した胚で特異的に認められる 17.5 KD のポリペプチドを見出した。このポリペプチドは培養期間の長い（再分化処理後 10 週間）体細胞胚にも認められたことから胚の成熟や発芽の前段階と関連するものと思われ、アスパラガス体細胞胚の成熟条件を検索する上での一つのマーカーになりうると考えられた。

以上のように、アスパラガス体細胞胚の成熟を示す生化学的なマーカーが示唆され、これによって今後、より効率的に体細胞胚を成熟させ、発芽率を向上させる条件が明らかになるものと期待される。

### 第3章 アスパラガス体細胞胚誘導時に発現する遺伝子の解析

体細胞胚誘導系は細胞培養系からの重要な再分化経路の一つであるとともに植物の胚発生のメカニズムを研究するための実験系としても重要である(Zimmermann, 1993). 胚発生過程を制御する機構を明らかにできれば, 体細胞胚誘導系を種々の植物種へ利用できる普遍的な技術とすることが可能となろう.

第2章までにアスパラガス及びナスの安定的な体細胞胚誘導系を確立した(Saito *et al.*, 1991; Saito & Nishimura, 1994). この培養系では, 乾燥条件下では, 水浸状化せず, 完全な植物体まで正常な生育を示す体細胞胚が形成され, 体細胞胚形成後の培養期間が長くなるにつれて成熟する傾向を示した(Saito *et al.*, 1996). 一方, 湿潤条件下では水浸状で異常な発育を示す体細胞胚が形成された. これらのことから, 環境条件の相違によって体細胞胚における遺伝子発現は異なることが予想される. 乾燥条件が体細胞胚の分化や発育を促すことは, ダイズ(Hammatt & Davey, 1987), ニンジン, オーチャードグラス, ブドウ(Gray, 1987), コムギ(Carman, 1988), シトカトウヒ(Roberts *et al.*, 1991), 日本イネ(Tsukahara & Hirose, 1992), キャッサバ(Mathews *et al.*, 1993)やインドイネ(Rance *et al.*, 1994)などで知られているが, 体細胞胚誘導時に乾燥条件下でどのような遺伝子が発現しているかはこれまでに研究されていない.

最近, サンプル間で異なった発現を示す mRNAs を解析するディファレンシャル・ディスプレイ法が開発された(Liang & Pardee, 1992). この手法の利点は, PCR 反応(Saiki *et al.*, 1988)を併用することによってサンプル量が極めて少量でも分析可能であることと手法の簡便さにある. 著者らのグループはこの手法及び第1章第3節で示した培養系を利用してナスの体細胞胚発生初期に発現する遺伝子について解析している(Momiyama *et al.*, 1995).

本章では, アスパラガス体細胞胚誘導系において乾燥条件下で培養した場合と湿潤条件下で培養

した場合の細胞について, Liang *et al.* (1994)が改良したディファレンシャル・ディスプレイ法をさらに簡略化して用い, 遺伝子発現の差異を解析した.

## 第1節 アスパラガス体細胞胚誘導時に乾燥条件下で発現する遺伝子の解析

体細胞胚形成時に発現する遺伝子はいくつか報告されているが(Johnson *et al.*, 1995; Sato *et al.*, 1995; Mizobuchi-Fukuoka *et al.*, 1996; Zimmerman, 1993(総論)), 胚発生の極く初期に関連した遺伝子の報告は少ない. このような時期の発現量の少ない遺伝子を従来の解析法で検出するのは困難であったためと思われる. Aleith & Richter (1990)や Sato *et al.* (1995)は, ニンジン体細胞胚形成の極く初期に特異的に発現している遺伝子の単離に成功したが, 彼らが用いたディファレンシャル・スクリーニング法やサブトラクティブ・ハイブリダイゼーション法は手法的に簡単ではない. 一方, ディファレンシャル・ディスプレイ法は, その検出感度の高さと手法の簡便さからは乳類(Liang & Pardee, 1992; Liang *et al.*, 1993, 1994; Bauer *et al.*, 1993; Mou *et al.*, 1994; Guimaraes *et al.*, 1995)や植物の遺伝子解析に利用され, ナスでは体細胞胚形成初期の遺伝子発現パターンの変化が解析され(Momiyama *et al.*, 1995; Afele *et al.*, 1995), 浮稲ではジベレリン制御遺伝子が同定され(van der Knaap & Kende, 1995), 野生エンバクでは休眠関連遺伝子が単離され(Johnson *et al.*, 1995), イチゴでは果実成熟時に特異的に発現する cDNA が単離されている(Wilkinson *et al.*, 1995).

そこで, 本研究では, アスパラガス体細胞胚形成の極く初期に発現し, 環境条件の相違によって発現量の異なる遺伝子を単離することを目指してディファレンシャル・ディスプレイ法を試みた. 特に本節では, 乾燥条件下で発現する遺伝子に着目して解析した.



## 材料及び方法

## 1. 植物材料及び培養方法

アスパラガス品種 'Mary Washington 500W' の無菌実生から誘導した EC を供試した。第1章に示した方法で EC を増殖後、体細胞胚を誘導した。体細胞胚誘導培地は 1.0 % ジェランガムを含む LS 培地とし、培養容器のふたをアルミホイルで密閉した場合（湿潤条件）とミリラップで覆った場合（乾燥条件）を試験した。

## 2. 全 RNA 抽出及び cDNA 合成

湿潤及び乾燥条件で体細胞胚誘導処理した 10 日後の培養組織（カルスと体細胞胚が混在、新鮮重約 100 mg）から全 RNA を ISOGEN（ニッポンジーン）を用いて抽出し、分光光度計を用いて抽出 RNA の収量を算出した。5  $\mu$ g の全 RNA を鋳型として 1 本鎖 cDNA 合成キット (Pharmacia Biotech) を用いて 33  $\mu$ l の反応液中で 1 本鎖 cDNA を合成した。cDNA 合成時のプライマーは 5'-TTTTTTTTTTTTTG -3' を用いた。反応終了液に TE (10 mM Tris- HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) 飽和フェノール 16.5  $\mu$ l 及びクロロホルム 16.5  $\mu$ l を加えて 12000 rpm で 5 分間遠心した。その上清を採取して等量のクロロホルムを加えて 12000 rpm で 5 分間遠心して得られた上清にエタノールを混和して、cDNA を沈殿させた。沈殿した cDNA を 50  $\mu$ l 滅菌蒸留水へ溶解した。

## 3. ディファレンシャル・ディスプレイ

合成した cDNA を用いて、次の 4 種のプライマーをそれぞれ単独に用いて PCR 反応を行った。プライマーは 10 塩基対からなる、5'-GTCTGACGGT-3' (RA01), 5'-CGATCGAGGA-3' (RA03), 5'-AAGCAGCAAG-3' (RA05) 及び 5'-AGCACTTCGG-3' (RA07) (Monna *et al.*, 1994) を合成した (日清紡)。PCR 反応液は、鋳型 cDNA (上述の cDNA 溶液 50  $\mu$ l 中の 2.5  $\mu$ l を用いた), 2  $\mu$ M プライマー, 200  $\mu$ M dNTP, 2.5 ユニット Taq DNA ポリメラーゼ (ニッポンジーン) を付属の緩衝液中に混入し、全体量 50  $\mu$ l とした。PCR 条件は、94  $^{\circ}$ C で 60 秒の予熱を処理した後、変性反応を 94  $^{\circ}$ C, 60 秒, アニール

ング反応を 45 °C, 60 秒及び伸長反応を 74 °C, 60 秒として 40 サイクル反応させ, 最後に 74 °C, 5 分間の伸長反応を行った. PCR 産物(20  $\mu$ l)を 170 x 170 x 1 mm の 8 % ポリアクリルアミドゲル (アクリルアミド:ビスアクリルアミド= 39:1) にて 50 mA の定電流で 1 時間電気泳動した. 電気泳動用緩衝液組成は TAE (4 mM Tris, 4 mM 氷酢酸, 0.1 mM EDTA , pH 8.0)とし, 泳動した PCR 産物はエチジウムブロマイド (1  $\mu$ g/ $\mu$ l)で染色した.

#### 4. PCR 産物の再増幅

体細胞胚誘導処理条件によって多型を示したバンドを含む部分をゲルから切り出し, 100  $\mu$ l TE 緩衝液中へ浸漬し(Welsh *et al.*, 1991), 65 °Cで 2 時間処理して DNA を溶出した. 溶出 DNA 液の 1  $\mu$ l を鋳型 DNA として再び PCR を行った. ディファレンシャル・ディスプレイ時の PCR 反応液と同組成の反応液で行い, PCR 条件は, アニーリング反応を 55 °C, 60 秒とした以外はディファレンシャル・ディスプレイ時の PCR と同様の条件で行った.

#### 5. クローニングとシーケンス

再増幅産物の一部(20  $\mu$ l)は, 100 x 60 x 5 mm の 1.5 % アガロースゲル上にて 100 V の定電圧で 30 分間電気泳動した. 電気泳動用緩衝液組成は TAE とし, 泳動した PCR 産物はエチジウムブロマイド (1  $\mu$ g/ $\mu$ l)で染色した. さらに, 再増幅産物の一部は, TA クローニングキット (Invitrogen)を用いて付属の説明書に従って pCR II ベクターにライゲーションした後, 大腸菌へ形質転換した. 再増幅産物の DNA 塩基配列決定は全自動 DNA シーケンサー(ABI 377, Pharmacia-PL)で行い, 得られた配列について, BLAST (Altshul *et al.*, 1990)と FASTA (Lipman & Pearson, 1985)の計算法を利用して DNA sequence Data Bank (DDBJ)に蓄積された種々の遺伝子の塩基配列データに対して塩基配列相同性の検索を行った.

#### 6. Reverse-transcription PCR (RT-PCR) assay

決定した塩基配列から 2 つのプライマーを合成し(5'- GGGACGGTATGAAATGGGAC -3'及び 5'- CACAACAACCCAAATGGAG -3', 第 23 図), アスパラガス培養細胞から抽出した mRNA に対して

RT-PCR を行った。PCR 条件は、変性反応を 94 °C, 60 秒, アニール反応を 63 °C, 60 秒及び伸長反応を 74 °C, 60 秒として 40 サイクル反応させ、最後に 74 °C, 5 分間の伸長反応を行った。

RT-PCR 産物は 100 x 60 x 5 mm の 3 % アガロースゲル上にて 100 V の定電圧で電気泳動した。電気泳動用緩衝液組成は TAE とし、泳動した RT-PCR 産物はエチジウムブロマイド (1 µg/ µl) で染色した。

## 結 果

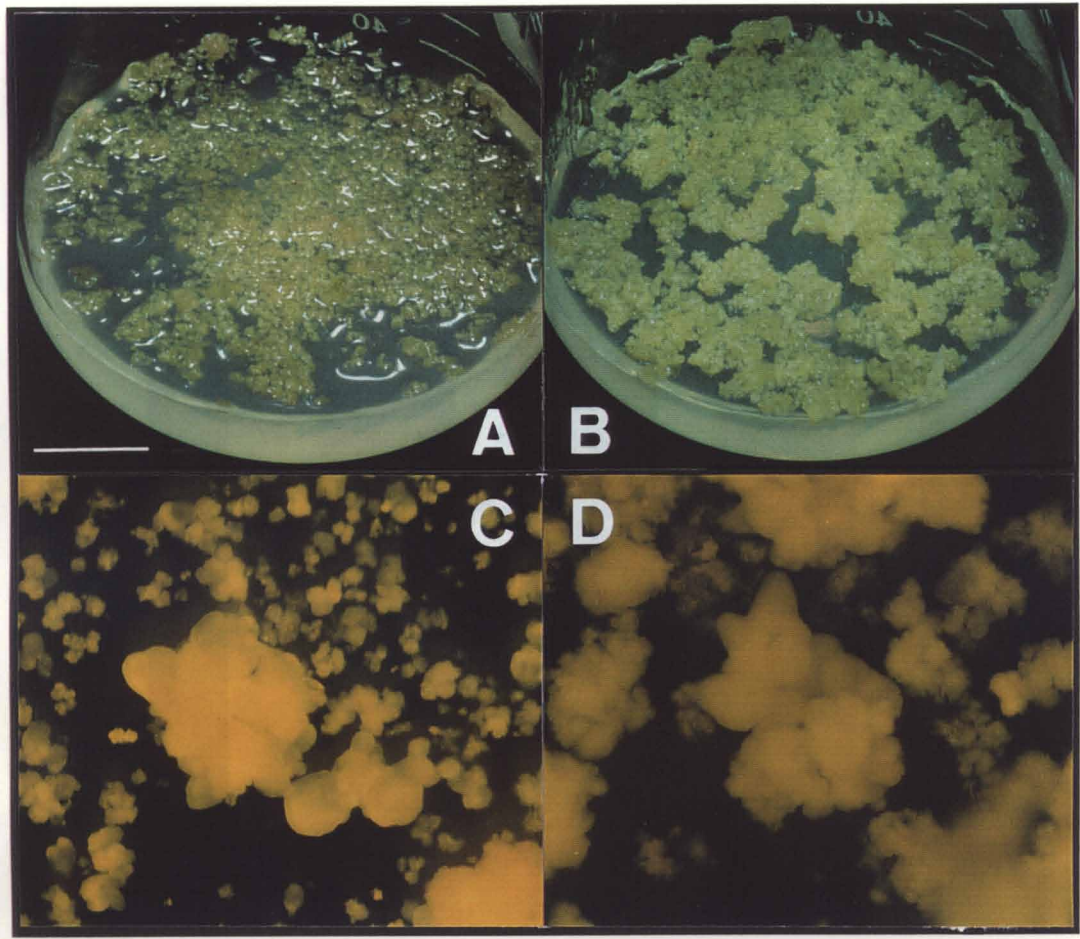
### 1. 組織培養

体細胞胚誘導処理 10 日後に体細胞胚とカルスを含む細胞塊を観察した。湿潤条件下では、ジェランガム培地上へ拡散した液体培地層に細胞塊が浸漬していたのに対し、乾燥条件下では、液体培地は蒸発して細胞塊が固形培地の表面に存在していた (第 20 図)。しかしながら、両条件下で形成された球状の体細胞胚は形態的には同様で、差はみられなかった (第 20 図)。体細胞胚誘導処理 4 週間後には、乾燥条件下では水浸状でないこん棒状胚が形成されていたが、湿潤条件下では形成された胚のほとんどが水浸状で形態的に異常であった。

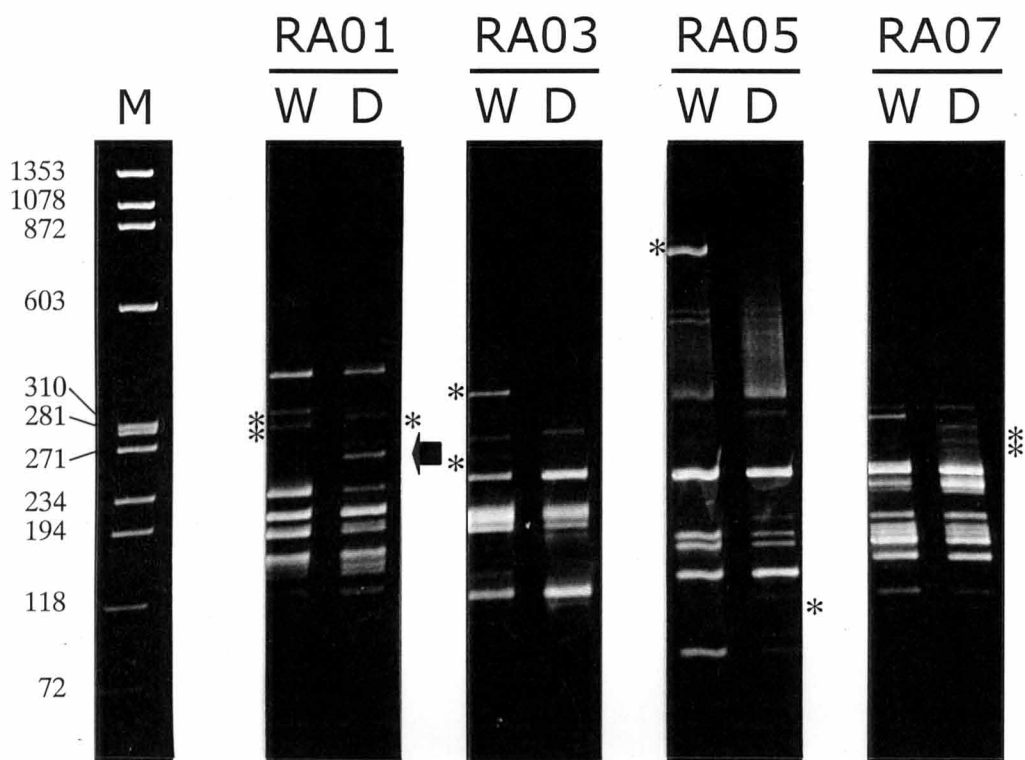
### 2. ディファレンシャル・ディスプレイ

異なる条件下で培養した細胞塊 (カルス及び体細胞胚) を材料としてディファレンシャル・ディスプレイを行ったところ、両サンプル間には PCR 産物の電気泳動像に明らかな差が認められた (第 21 図)。PCR 産物は次の 3 つのグループに分けられた。本試験において最も注目すべき重要なグループである乾燥条件下でのみ増幅、またはより強く増幅されたグループ、そして、湿潤条件下でのみ増幅されたグループ、及び両条件下で同様に増幅されたグループである。

培養条件によって増幅程度の異なった主な PCR 産物を 10 個認めた (第 22 図に略号記載)。これ



**Figure 20.** Regeneration of asparagus somatic embryos from calli at 10 days after transfer to the regeneration medium under the wet conditions (A and C) and the desiccated conditions (B and D). Somatic embryos cultured under both conditions were globular and closely resembled morphologically. Bar equals 15 mm in A and B, 500  $\mu\text{m}$  in C and D.



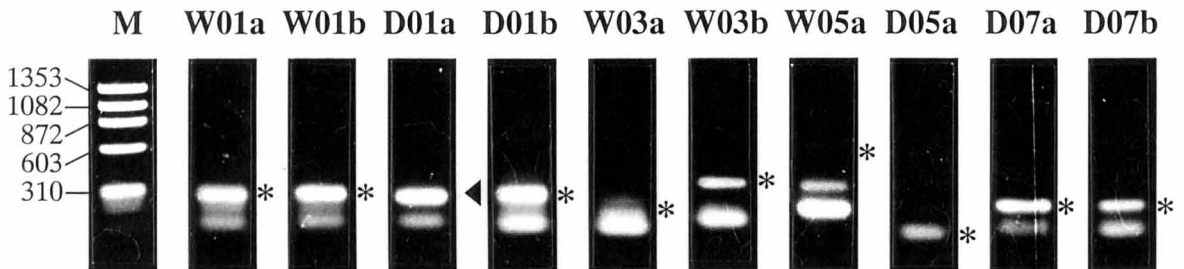
**Figure 21.** Differential display of mRNAs extracted from cells cultured under conditions (W and D, wet and dry conditions, respectively). PCR was performed using RA01, RA03, RA05 or RA07 primer. PCR products were electrophoresed on 8 % polyacrylamide denaturing gel and stained with ethidium bromide. The arrow marks the differentially displayed product, D01a, which was analyzed further; the asterisks mark other significantly differentially displayed products not yet characterized. Lane M is a *Hae*III-digest of  $\phi$ X174 DNA.

らの大きさは200~800 bpであった。10個のPCR産物を再増幅したところ、各々からは単一または2から3本のバンドが増幅された(第22図)。再増幅産物は大腸菌のプラスミドへサブクローニングして、例えば、pTSD01aと表した。

### 3. pTSD01aの解析

10個のクローンの中で、PCR産物D01a(プライマーRA01により、乾燥処理特異的に発現したmRNAから増幅された)由来のクローンであるpTSD01aについて解析を進めた。アスパラガスは乾燥条件下で誘導した場合に正常な体細胞胚が誘導されること(Saito *et al.*, 1991)と本クローンが乾燥条件下で培養した組織で特異的に発現していたことから、本クローンはアスパラガス体細胞胚誘導を正常に行わせる上で重要な働きを持つと考えられた。本クローンの塩基配列を決定したところ、pTSD01aは221 bpの挿入配列を持つことが明らかとなった。さらにデータベースに蓄積された塩基配列データに対して相同性を検索したところ、この221 bpの挿入配列はレトロトランスポゾン様配列を有する *Nicotiana glauca* の *Tna1-2* 遺伝子(Royo *et al.*, 1996)と67%の塩基配列相同性を持つことが明らかとなった(第23図)。また、2,4-Dで培養されたナス胚軸で発現したレトロトランスポゾン様配列(J.C. Afele & T. Kayano, 未発表)とは92%という高い相同性を示した(第23図)。塩基配列から予想されたアミノ酸配列では、pTSD01aは gypsy-type のレトロトランスポゾンと平均で41%の相同性を、ナスのレトロトランスポゾン様配列とは60%の相同性を示した(第24図)。

培養細胞中でのpTSD01aの発現量は非常に低いことが予想されたため、その発現をRT-PCRによって確認した。単一のバンドが増幅されたことから、乾燥条件下で培養した組織中では本遺伝子が発現していることが明らかとなった(第25図)。



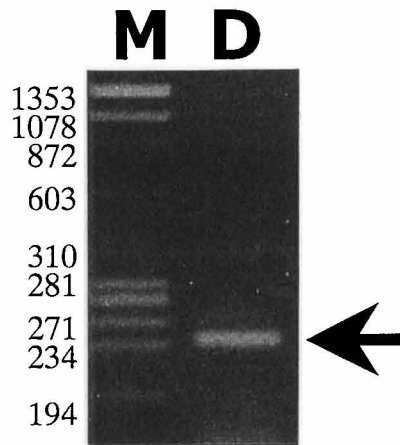
**Figure 22.** The reamplification of ten PCR amplified fragments shown in Fig. 21. The arrowhead marks the desired band of D01a. The asterisks mark the desired bands of others. Eluted DNA was reamplified by PCR using RA01, RA03, RA05 or RA07 primers. PCR products were electrophoresed on 1.5 % agarose gel and stained with ethidium bromide. Lane M is a *Hae*III-digest of  $\phi$ X174 DNA.

|               |                   |                   |                   |                   |                  |
|---------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|
| pTSD01a       | <u>GTCTGACG</u>   | <u>GTGGGACGGT</u> | <u>ATGAAATGGG</u> | <u>ACATAGCAGG</u> | <u>GTTTGTGCC</u> |
| Sm            |                   |                   |                   |                   |                  |
| <i>Tna1-2</i> | AAATCTATTG        | ATGGGGTGGT        | ATGAAGAAGG        | GCGTGGCGGA        | CTTCGTCTCT       |
| pTSD01a       | CACTGTCCAA        | ATTGCCAGCA        | GGTGAAGATA        | GAACATCAA         | AACCAGGTGG       |
| Sm            |                   | GTCTGAC           | GGTGAAGATA        | GAACATCAGA        | AACCTGGTGA       |
| <i>Tna1-2</i> | AAGTGTCCGA        | ATTGCCAGCA        | AGTGAAGGCC        | GAGCATCAGC        | GGCCAGTGG        |
| pTSD01a       | ACTATTACAG        | GAAATGGCAA        | TACCAGCGTG        | GAATTGGGAG        | ATCATTAAATA      |
| Sm            | ACTATTGCAG        | GAAATGACAA        | TACTAGCGTG        | GAAGTGGGAG        | ATCATTAAATA      |
| <i>Tna1-2</i> | GTTGACTCAG        | CTTATAGAGA        | TACCAACGTG        | AAAGTGGGAA        | ATGATCAATA       |
| pTSD01a       | TGGACTTTAT        | TATAGGTTTA        | CCTCGCACTC        | CACGCAGGTA        | TGACTCCATT       |
| Sm            | TGGGCTTTAT        | TACAGGTTTA        | CCTCGCACTC        | CACGCAGGTA        | TGACTCCATT       |
| <i>Tna1-2</i> | TGGACTTCTT        | GACAGGACTA        | CCTCACACTC        | AATACAAGTT        | CGACTCAATT       |
| pTSD01a       | <u>TGGGTTGTTG</u> | <u>TGGACCGTCA</u> | <u>GAC</u>        |                   |                  |
| Sm            | <u>TGGGTTGTTG</u> | <u>TGGACCGTCA</u> | <u>GAC</u>        |                   |                  |
| <i>Tna1-2</i> | TGGGTAATAG        | TAGACCGACT        | CACCAAATCA        | GCTCACTTTT        | 770              |

**Figure 23.** Alignment of partial nucleotide sequence (221 bp) of retrotransposon-like element derived from *Asparagus officinalis* L. (pTSD01a, this study), *Solanum melongena* L. (Sm, Afele, J. C. & Kayano, T., unpublished data), and *Nicotiana glauca* (*Tna1-2*, Royo *et al.*, 1996). Nucleotides identical to those of pTSD01a are shown on a dark background. The numbers indicate nucleotide positions. Underlines and double underlines indicate the sequences of primers used in the differential display and those used for RT-PCR, respectively.







**Figure 25.** RT-PCR assay of pTSD01a insert. Lane D and M indicate samples cultured under the desiccated condition and a *Hae*III-digest of  $\phi$ X174 DNA, respectively. Arrowhead indicates the size of specific PCR fragment derived from D01a clone.

## 考 察

異なる条件下で培養した細胞塊を材料としてディファレンシャル・ディスプレイを行い、多型を示した主な PCR 産物を 10 個認めた。それらのうち、D01a は乾燥条件下特異的であったため、サブクローニングして塩基配列を決定し、データベースを利用して塩基配列相同性の高い遺伝子を検索するとともに RT-PCR のプライマーを合成した。RT-PCR の結果、この遺伝子は乾燥条件下で培養した細胞塊中で発現していると考えられた。

pTSD01a は *Nicotiana alata* のレトロトランスポゾン様配列である *Tna1-2* (Royo *et al.*, 1996) と高い塩基配列相同性を持つことが明らかとなった。さらに、塩基配列から予想されたアミノ酸配列は 73 個であり、*Tna1-2* 遺伝子の integrase 領域とは 59 %、*Lilium henryi* の *dell* トランスポゾン遺伝子 (Smyth *et al.*, 1989) とは 47 % の相同性を示した。今回クローニングした遺伝子は全長でないが、このような高い相同性を示したことから gypsy グループに属するレトロトランスポゾンであると思われた。

レトロトランスポゾンは植物を含む多くの種で確認され (Grandbastien, 1992; Voytas *et al.*, 1992; Hirochika & Hirochika, 1993)、真核生物には普遍的であろうと考えられている。レトロトランスポゾンはその *pol* 遺伝子内の構成要素の順番から大きく 2 つのグループに分けられる。一つは Ty1-copia グループであり、構成要素の順番は Protease- Integrase- Reverse Transcriptase- Rnase H、もう一つは gypsy グループで、構成要素の順番は Protease- Reverse Transcriptase- Rnase H- Integrase となっている (Doolittle *et al.*, 1989; Xiong & Eickbush, 1990)。植物では Ty1-copia グループに比較すると gypsy グループはまれで (Royo *et al.*, 1996)、アスパラガスで gypsy グループのレトロトランスポゾンが乾燥環境に応答して活性化しているという事実はこれが初めてである。また、単子葉植物であるアスパラガスのレトロトランスポゾン様配列と双子葉植物であるナスの配列が 92 % も相同性を持つとともに両端に同じ配列を有する (J.C. Afele & T. Kayano, 未発表) ことは興味深い。

McClintock (1984) は、植物におけるトランスポゾンの活性化はウイルスの感染や組織培養等によ

って誘起されると推察し、組織培養によるトランスポゾンの活性化はソマクローナル変異の一因として関与すると推察している。タバコやイネでは組織培養中にトランスポゾンが活性化され (Hirochika, 1993, 1995), ナスでも 2,4-D を用いた組織培養中にトランスポゾン様配列が活性化されることが明らかにされている (J.C. Afele & T. Kayano, Momiyama *et al.*, 未発表)。本研究では乾燥条件下で培養した場合にトランスポゾン様配列の活性化が認められたが、乾燥条件下で誘導した体細胞胚由来植物にはソマクローナル変異は認められなかった (Saito *et al.*, 1991)。これらのことから、アスパラガスの体細胞胚形成においてトランスポゾンの活性化がどのような役割を果たすかは現在のところ不明である。乾燥条件下で特異的に発現する、本研究では未解析の遺伝子がアスパラガスの正常な体細胞胚形成に関係しているのかもしれない。

本研究では、解析する mRNA を 3 分の 1 にするために cDNA 合成時に 5' TTTTTTTTTTTTGG -3' を用い (Liang *et al.*, 1994), 10 塩基対のプライマー 4 種を用いて PCR 増幅を行ったところ、各プライマーにつき 10~20 個の増幅産物を得た。この増幅産物の数は他の報告と比較すると少ない。例えば、Johnson *et al.* (1995) は野生エンバクの休眠胚を材料に、5' TTTTTTTTTTTTGG -3' と 5'-TTTTTTTTTTTTTGC -3' の 2 種のプライマーと 10 塩基対のプライマー 20 種を組み合わせた結果、10 塩基対の各プライマーにつき約 150 の増幅産物を得ている。著者の行ったディファレンシャル・ディスプレイ法の感度はおおまかに Johnson *et al.* (1995) の約 30 分の 1 と算出された。著者はシーケンズゲルよりも小さくて解像度の低いゲルを用いたため及び核酸の検出感度がアイソトープよりも劣るエチジウムブロマイドを用いたためと思われるが、操作の簡便性では優れている。

本節では、アスパラガス体細胞胚誘導系において培養条件の相違によって発現の異なる遺伝子を解析するためにディファレンシャル・ディスプレイ法を用い、いくつかの遺伝子断片を得た。それらのうち、乾燥条件下で特異的に発現する遺伝子の一つは gypsy グループに属するレトロトランスポゾン様配列と非常に高い相同性があった。これらの遺伝子やその発現様式を解析することによって正常な体細胞胚形成を制御する機構の分子レベルでの解明が進むことが期待される。

## 第2節 アスパラガス体細胞胚誘導時に湿潤条件下で発現する遺伝子の解析

第1節では、アスパラガス体細胞胚誘導時に発現する遺伝子の中で、特に、乾燥条件下で発現する遺伝子に着目してディファレンシャル・ディスプレイ法による解析を行った。

一方、本節では、正常な体細胞胚が誘導されにくい湿潤条件下で発現する遺伝子に着目して解析した。

### 材料及び方法

#### 1. 植物材料及び培養方法

本章第1節と同様、アスパラガス品種 'Mary Washington 500W' の無菌実生から誘導した EC から体細胞胚を誘導した。体細胞胚誘導培地は 1.0 % ジェランガムを含む LS 培地とし、培養容器のふたをアルミホイルで密閉した場合（湿潤条件）とミリラップで覆った場合（乾燥条件）を試験した。

#### 2. 全 RNA 抽出及び cDNA 合成

湿潤及び乾燥条件下で体細胞胚誘導処理した 10 日後の培養組織（カルスと体細胞胚が混在、新鮮重約 100 mg）から全 RNA を ISOGEN（ニッポンジーン）を用いて抽出し、分光光度計を用いて抽出 RNA の収量を算出した。5  $\mu$ g の全 RNA を鋳型として 1 本鎖 cDNA 合成キット (Pharmacia Biotech) を用いて 33  $\mu$ l の反応液中で 1 本鎖 cDNA を合成した。cDNA 合成時のプライマーは 5'-TTTTTTTTTTTTTTG -3' を用いた。反応終了液に TE 飽和フェノール 16.5  $\mu$ l 及びクロロホルム 16.5  $\mu$ l を加えて 12000 rpm で 5 分間遠心した。その上清を採取して等量のクロロホルムを加えて 12000 rpm で 5 分間遠心して得られた上清にエタノールを混和して、cDNA を沈殿させた。沈殿した cDNA を 50  $\mu$ l 滅菌蒸留水へ溶解した。

### 3. ジゴキシゲニン(DIG)-ディファレンシャル・ディスプレイ

合成した cDNA を用いて、次の4種のプライマーをそれぞれ単独に用いて PCR 反応を行った。プライマーは 10 塩基対からなる、5'-GTCTGACGGT-3' (RA01), 5'-CGATCGAGGA-3' (RA03), 5'-AAGCAGCAAG-3' (RA05)及び5'-AGCACTTCGG-3' (RA07) (Monna *et al.*, 1994)を合成し、それらの5'末端をジゴキシゲニン(DIG)で標識した(日清紡)。PCR 反応液は、鋳型 cDNA (上述の cDNA 溶液 50  $\mu$ l 中の 2.5  $\mu$ l を用いた), 2  $\mu$ M プライマー, 200  $\mu$ M dNTP, 2.5 ユニット Taq DNA ポリメラーゼ(ニッポンジーン)を付属の緩衝液中に混入し、全体量 50  $\mu$ l とした。PCR 条件は、94  $^{\circ}$ C で 60 秒の予熱を処理した後、変性反応を 94  $^{\circ}$ C, 60 秒, アニーリング反応を 45  $^{\circ}$ C, 60 秒及び伸長反応を 74  $^{\circ}$ C, 60 秒として 40 サイクル反応させ、最後に 74  $^{\circ}$ C, 5 分間の伸長反応を行った。PCR 産物 (20  $\mu$ l)を 170 x 170 x 1 mm の 8% ポリアクリルアミドゲル (アクリルアミド:ビスアクリルアミド= 39:1)にて 50 mA の定電流で 1 時間電気泳動した。電気泳動用緩衝液組成は TAE とし、泳動した PCR 産物はエチジウムブロマイド (1  $\mu$ g/ $\mu$ l)で染色した。その後、田部井ら(1996)の方法に従い、10 x SSC 溶液 (1.5 M 塩化ナトリウム, 0.15 M クエン酸ナトリウム, pH 7.0) を用いてメンブレンフィルター (Hybond N<sup>+</sup>, Amersham)へ PCR 産物を転写し、80  $^{\circ}$ C で 2 時間乾燥して固定化した。転写した PCR 産物は、ノンラジオシステム DNA 標識及び検出キット(Boehringer Mannheim)の方法に従って、抗体の結合及び免疫的染色を行った。

### 4. PCR 産物の再増幅

体細胞胚誘導処理条件によって多型を示したバンドを含む部分をゲルから切り出し、100  $\mu$ l TE 緩衝液中へ浸漬し(Welsh *et al.*, 1991), 65  $^{\circ}$ C で 2 時間処理して DNA を溶出した。溶出 DNA 液の 1  $\mu$ l を鋳型 DNA として再び PCR を行った。ディファレンシャル・ディスプレイ時の PCR 反応液と同組成の反応液で行い、PCR 条件は、アニーリング反応を 55  $^{\circ}$ C, 60 秒とした以外はディファレンシャル・ディスプレイ時の PCR と同様の条件で行った。

## 5. クローニングとシーケンス

再増幅産物の一部(20  $\mu$ l)は、100 x 60 x 5 mm の 1.5 % アガロースゲル上にて 100 V の定電圧で 30 分間電気泳動した。電気泳動用緩衝液は TAE とし、泳動した PCR 産物はエチジウムブロマイド (1  $\mu$ g/ $\mu$ l)で染色した。さらに、再増幅産物の一部は、TA クローニングキット (Invitrogen)を用いて付属の説明書に従って pCR II ベクターにライゲーションした後、大腸菌へ形質転換した。再増幅産物の DNA 塩基配列決定は全自動 DNA シーケンサー(ABI 377, Pharmacia-PL)で行い、得られた配列について、BLAST (Altshul *et al.*, 1990)と FASTA (Lipman & Pearson, 1985)の計算法を利用して DNA sequence Data Bank (DDBJ)に蓄積された種々の遺伝子の塩基配列データに対して塩基配列相同性の検索を行った。

## 6. ゲノミック PCR-サザンハイブリダイゼーション

単子葉植物であるアスパラガスとイネ及び双子葉植物であるタバコを無菌的に発芽させた実生の葉(新鮮重約 500 mg)から DNA を ISOGEN (ニッポンジーン)を用いて抽出し、以下の PCR の鑄型とした。プライマーとしては、5'- GATTCTGACATCAACTTAGA -3' (ptsH-For)及び 5'- GCATCTGTTTCGTCAGAACC -3' (ptsH-Rev, 第 27 図)の 2 つのオリゴヌクレオチドを合成した(日清紡)。PCR 条件は、92  $^{\circ}$ C で 60 秒の予熱を処理した後、変性反応を 92  $^{\circ}$ C, 60 秒、アニーリング反応を 55  $^{\circ}$ C, 60 秒及び伸長反応を 72  $^{\circ}$ C, 60 秒として 40 サイクル反応させ、最後に 72  $^{\circ}$ C, 5 分間の伸長反応を行った。PCR 産物は 170 x 170 x 1 mm の 12 % ポリアクリルアミドゲル(アクリルアミド:ビスアクリルアミド= 39: 1)にて 50 mA の定電流で 1 時間電気泳動した。電気泳動用緩衝液組成は TBE (8.9 mM Tris, 8.9 mM ホウ酸, 0.2 mM EDTA, pH 8.0)とし、泳動した PCR 産物はエチジウムブロマイド (1  $\mu$ g/ $\mu$ l)で染色した。その後、PCR 産物を 0.4 M 水酸化ナトリウム溶液を用いてメンブレンフィルター(Hybond N<sup>+</sup>, Amersham)へ転写し、80  $^{\circ}$ C で 2 時間乾燥して固定化した。第 27 図の ptsH-For 及び ptsH-Rev で挟まれた領域を DIG で標識してプローブとした。プローブの作製、ハイブリダイゼーション、抗体の結合及び免疫的染色はノンラジオシステム DNA 標識及び検出キット(Boehringer Mannheim)の方法に従った。

## 結果

## 1. 組織培養

本章第1節と同様、湿潤条件下ではジェランガム培地上へ拡散した液体培地層に細胞塊が浸漬していたのに対し、乾燥条件下では液体培地は蒸発して細胞塊が固形培地の表面に存在し、両条件下で形成された球状の体細胞胚は形態的に同様に差はみられなかった(第20図)。

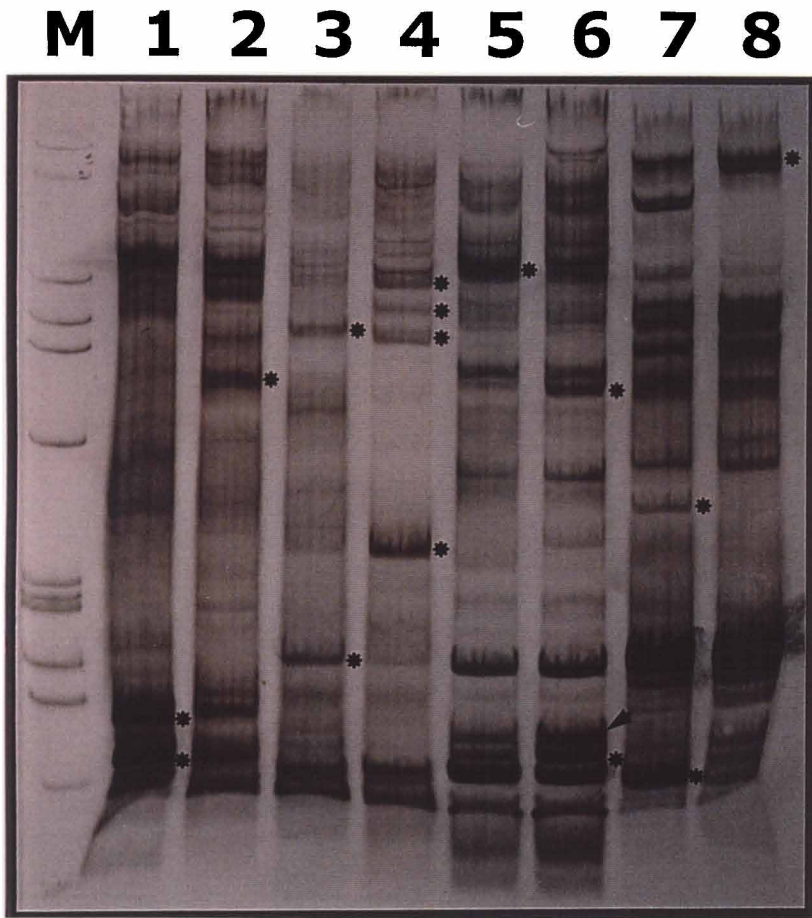
## 2. 培養条件によって発現の異なった遺伝子のクローニングと塩基配列決定

異なる条件下で培養した細胞塊(カルス及び体細胞胚)を材料としてディファレンシャル・ディスプレイを行ったところ、乾燥条件下及び湿潤条件下で発現量の多かったPCR産物がそれぞれ7及び10個検出された(第26図)。それらを再増幅し、塩基配列の決定を行った。これらクローンの一つで、湿潤条件下で乾燥条件下よりも強い発現を示したpTS5-1は、バクテリアの細胞膜を通じた細胞外からの糖輸送に関与するホスホエノールピルビン酸:糖ホスホトランスフェラーゼ系(PTS)の主要な遺伝子である*ptsH*遺伝子(Saier, 1977; Postma & Lengeler, 1985 (総論))と高い相同性を示した。他のクローンはデータベースに登録された遺伝子と相同性を示さなかった。pTS5-1の塩基配列と推定アミノ酸配列を第27図に示した。pTS5-1の塩基数はプライマー部分を含めて159 bpであり、*Enterococcus faecalis*の*ptsH*遺伝子(Deutscher *et al.*, 1991)と76%の相同性を示した。pTS5-1の配列は*E. faecalis*の*ptsH*遺伝子領域の中央部に位置していた。

## 3. ゲノミックPCR-サザンハイブリダイゼーション

アスパラガス以外の植物に*ptsH*様配列が存在するか否かを調べるために、アスパラガス*ptsH*様配列に基づいて設計したプライマー(*ptsH-For*及び*ptsH-Rev*)を用いてイネとタバコのゲノムDNAを鋳型にPCRを行った。PCRの結果は第28A図に示した。レーン1はpTS5-1プラスミドDNAを鋳型とし、レーン3, 4及び5はアスパラガス、イネ及びタバコのゲノムDNAを鋳型とした。分子量マーカー以外のすべてのレーンで期待された大きさ(131 bp)のDNA断片が増幅された。さらに、





**Figure 26.** DIG-differential display of mRNAs between different culture conditions. Lane 1, 3, 5 and 7 are mRNA extracted from somatic embryos cultured under desiccated conditions, and lane 2, 4, 6 and 8 under wet conditions. PCR was performed using RA01 (lane 1 and 2), RA03 (lane 3 and 4), RA05 (lane 5 and 6) and RA07 (lane 7 and 8) primer. Lane M is a *Hae*III-digest of  $\phi$ X174 DNA labeled with digoxigenin (DIG). Dots indicate PCR products whose intensities differed between culture conditions. The arrowhead indicates the PCR product corresponding to pTS5-1.

## ptsH-For

AAGCAGCAAGCAAATTTGATTCTGACATCAACTTAGAATTCAACGGTAAAACCTGTAAAC

K F D S D I N L E F N G K T V N

TTAAAATCAATCATGGGCGTTATGTCTTTAGGTATTCAAAAAGGCGCTAAAATCACTATC

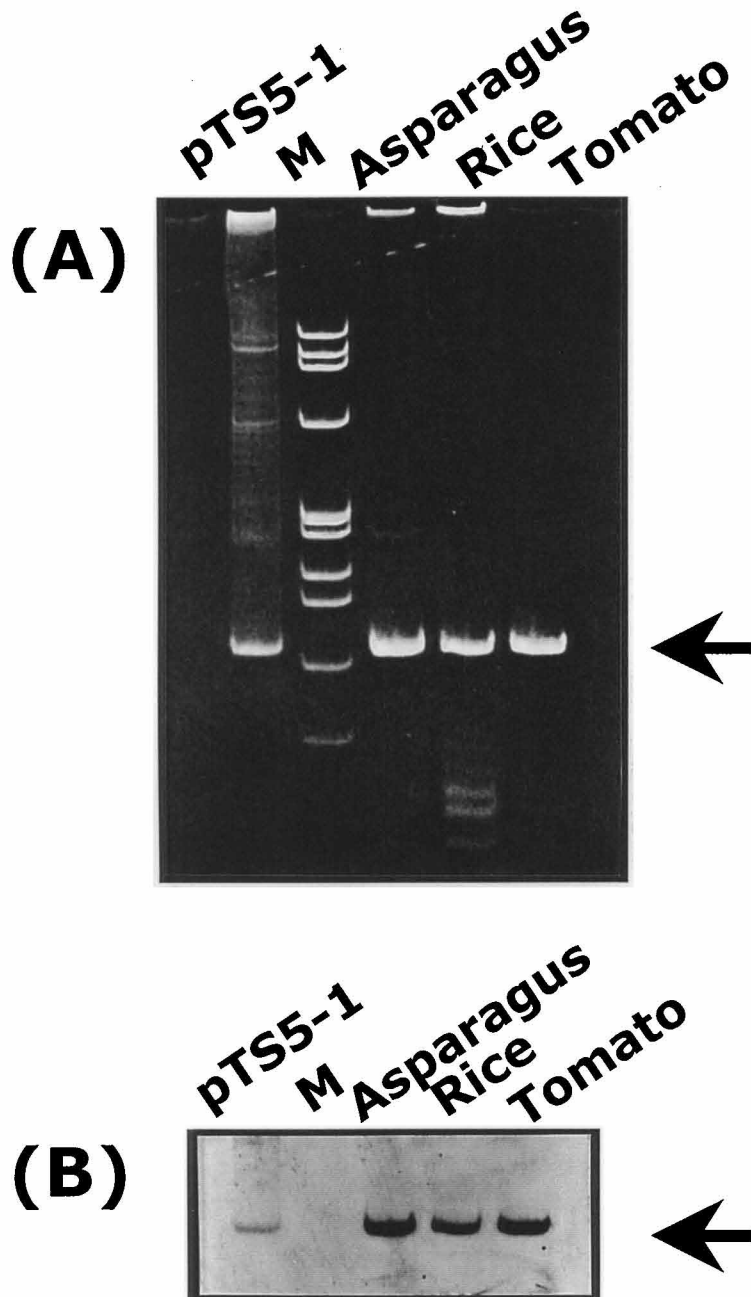
L K S I M G V M S L G I Q K G A K I T I

TCTGCAGAAGGTTCTGACGAAACAGATGCACTTGCTGCTT

S A E G S D E T D A

## ptsH-Rev

**Figure 27.** Nucleotide and deduced amino acid sequence of asparagus *ptsH* homolog. Underlines and double underlines indicate the sequences of primers used in the differential display and those used for PCR of genomic DNA from other plants.



**Figure 28.** Genomic PCR-Southern analysis. PCR products were separated on 8 % polyacrylamide gel which was stained with ethidium bromide (A) and then blotted onto a nylon membrane. The membrane was hybridized with DIG-labeled asparagus cDNA probe and detected with immunochemical staining (B). Lane M is a *Hae*III-digest of  $\phi$ X174 DNA. pTS5-1 is the cDNA clone encoding *ptsH* homolog isolated from asparagus. Arrows indicate fragments of expected size (131 bp).

**Table 9.** The percentage of identical (above the diagonal) and similar<sup>z</sup> (below the diagonal) amino acids between a pair of each alignment.

| Species <sup>z</sup> | Ao | Sm  | Ss | Ef | Sc | Sa | Bs | Ec  | St  | Rc | Ae |
|----------------------|----|-----|----|----|----|----|----|-----|-----|----|----|
| Ao                   | -  | 67  | 70 | 63 | 78 | 78 | 80 | 43  | 43  | 39 | 41 |
| Sm                   | 83 | -   | 98 | 76 | 70 | 70 | 63 | 43  | 43  | 43 | 41 |
| Ss                   | 83 | 100 | -  | 74 | 70 | 70 | 65 | 46  | 46  | 46 | 41 |
| Ef                   | 89 | 89  | 89 | -  | 70 | 67 | 61 | 39  | 39  | 30 | 48 |
| Sc                   | 89 | 80  | 80 | 87 | -  | 96 | 74 | 37  | 37  | 30 | 43 |
| Sa                   | 87 | 83  | 83 | 85 | 98 | -  | 74 | 37  | 37  | 30 | 43 |
| Bs                   | 91 | 87  | 87 | 89 | 89 | 87 | -  | 37  | 35  | 35 | 39 |
| Ec                   | 63 | 70  | 70 | 63 | 59 | 61 | 65 | -   | 100 | 46 | 35 |
| St                   | 63 | 70  | 70 | 63 | 59 | 61 | 65 | 100 | -   | 46 | 35 |
| Rc                   | 63 | 70  | 70 | 65 | 61 | 61 | 61 | 63  | 63  | -  | 20 |
| Ae                   | 70 | 70  | 70 | 67 | 70 | 70 | 72 | 63  | 63  | 70 | -  |

<sup>z</sup>A group of similar amino acids was defined as the following; (G, A, S, T,P), (I, L, V, M), (R, K,H), (D, E, N,O), (F, Y, W) and (C) (Dayhoff *et al.*, 1983).

<sup>y</sup>Abbreviations for species are as in Fig. 29.

増幅された DNA 断片とアスパラガス *ptsH* 様配列との相同性を確認するために PCR-サザンハイブリダイゼーションを行ったところ、すべての PCR 産物がハイブリダイズした (第 28B 図)。これらのことから、単子葉植物であるイネ及び双子葉植物であるタバコはアスパラガス *ptsH* 様断片と類似した配列をゲノム中に有することが明らかとなった。

#### 4. アミノ酸配列

アスパラガス *ptsH* 様遺伝子の推定アミノ酸配列をグラム陽性菌 6 種及びグラム陰性菌 4 種と比較した。アスパラガス *ptsH* 様遺伝子の推定アミノ酸配列はグラム陰性菌よりもグラム陽性菌との相同性が高かった (第 29 図)。これらのバクテリアとのアミノ酸配列相同性及び類似性を第 9 表に示した。アスパラガス *ptsH* 様遺伝子はグラム陽性菌と 63-80 %の相同性及び 63-91 %の類似性を示したのに対し、グラム陰性菌とは 39-43 %の相同性及び 60-100 %の類似性を示した。

```

Ao  KFDS1DI2NLE3FN4GK5TV6NL7KS8IM9GV10MS11LG12IQ13GAK14IT15ISA16EG17SDE18TDA19
Sm  KFAS1DI2TL3DY4KG5KAV6NL7KS8IM9GV10MS11LG12VG13QG14ADV15TI16TA17EG18AD19AD20DA21
Ss  KFAS1DI2TL3DY4KG5KAV6NL7KS8IM9GV10MS11LG12VG13QG14ADV15TI16ISA17EG18AD19AD20DA21
Ef  KFNS1DI2NLE3YK4GK5SV6NL7KS8IM9GV10MS11LG12VG13QG14SD15VTI16TV17DG18ADE19AE20G21
Sc  KFDS1DI2QLE3YNG4KK5VNL6KS7IM8GV9MS10LG11VG12KDA13EIT14IY15AD16GS17DE18ADA19
Sa  KFDS1DIS2LE3YNG4KK5VNL6KS7IM8GV9MS10LG11VG12KDA13EIT14IY15AD16GS17DES18DA19
Bs  KYDAD1VN2LE3YNG4KTV5NL6KS7IM8GV9MS10LG11IA12KGA13EIT14IS15AS16GAD17EN18DA19
Ec  GFT1SE2IT3VT4SN5GK6SASA7KS8LF9KL10QTL11GL12TQ13GT14VVT15ISA16EG17EDE18QKA19
St  GFT1SE2IT3VT4SN5GK6SASA7KS8LF9KL10QTL11GL12TQ13GT14VVT15ISA16EG17EDE18QKA19
Rc  GFAAE1IR2IR3NG4AK5VANG6KS7LIS8LL9NL10GAA11QGA12AL13RISA14EG15AD16ATA17
Ae  NFV1SQ2VK3MS4SR5NG6RQ7VD8AK9SIM10GV11MML12AAG13IG14ST15VT16LET17DGP18DE19QEA20

```

**Figure 29.** Alignment of *ptsH* homolog amino acid sequences from *Asparagus officinalis* (Ao), gram-positive bacteria (Sm: *Streptococcus mutans*, Ss: *S. salivarius*, Ef: *Enterococcus faecalis*, Sc: *Staphylococcus carnosus*, Sa: *S. aureus*, and Bs: *Bacillus subtilis*) and gram-negative bacteria (Ec: *Escherichia coli*, St: *Salmonella typhimurium*, Rc: *Rhodobacter capsulatus*, and Ae: *Alcaligenes eutrophus*). Residues boxed in black indicate amino acid identities with the sequence of the asparagus PTSH-like protein.

## 考 察

ホスホエノールピルビン酸：糖ホスホトランスフェラーゼ系(PTS)は細胞膜を通じた細胞外からの糖輸送に関与し、バクテリアでは非常に重要な系である(Saier, 1977; Postma & Lengeler, 1985 (総論)). PTS は主に、*ptsH* 遺伝子にコードされる HPr, *ptsI* 遺伝子にコードされる酵素 I と酵素 II 及び III と呼ばれる糖特異的な部分の 4 つの構成単位からなる. 今日までに、*ptsH* 遺伝子及びその類似遺伝子の存在はバクテリア以外では確認されていない. PTSH の一次構造はグラム陽性菌である *Streptococcus mutans* (Boyd *et al.*, 1994), *S. salivarius* (Boyd *et al.*, 1994), *Enterococcus faecalis* (Deutscher *et al.*, 1986), *Staphylococcus carnosus* (Eisermann *et al.*, 1991), *S. aureus* (Beyreuther *et al.*, 1977), *Bacillus subtilis* (Gonzy-Treboul *et al.*, 1989)及びグラム陰性菌である *Escherichia coli* (De Reuse *et al.*, 1985), *Salmonella typhimurium* (Schnierow *et al.*, 1988), *Rhodobacter capsulatus* (Wu *et al.*, 1990), *Alcaligenes eutrophus* (Pries *et al.*, 1991)で明らかにされている.

湿潤条件による体細胞胚誘導中の材料を用いてディファレンシャル・ディスプレイ法を適用することによってアスパラガスで *ptsH* 様遺伝子が単離された. 湿潤条件下ではアスパラガスの場合, 形態的に異常な体細胞胚が誘導されやすい(Saito *et al.*, 1991). なぜ, 湿潤条件下で *ptsH* 様遺伝子の発現が強かったかは現在のところ明らかでない. アスパラガスに加えて, 同様の配列が他の単子葉植物(イネ)及び双子葉植物(タバコ)のゲノム中にも存在することを明らかにし, また同様に, トマト, ナス, メロン及びキュウリに存在することも確認した(データ略). これらのことから, *ptsH* 様遺伝子はバクテリアだけでなく植物にも広く存在することが示唆された.

アスパラガスの *ptsH* 様遺伝子の塩基配列(159 bp)をグラム陽性菌である *Enterococcus faecalis* 及びグラム陰性菌である *Escherichia coli* と Takeishi & Gotoh (1982)の方法で比較したところ, 一致する塩基は *Enterococcus faecalis* とは 77%, *Escherichia coli* とは 55%であった. 一方, 5S リボソーム RNA 配列について, 同様の方法で単子葉植物であるコムギ(Vakhitov *et al.*, 1989)と *E. faecalis* (Woese *et al.*,

1976)及び *E. coli* (Noller & Garrett, 1979)を比較したところ、一致する塩基はコムギと *E. faecalis* では 56%, コムギと *E. coli* では 52%であった。5S リボソーム RNA は種を越えてよく保存されていると言われるが、アスパラガスと *E. faecalis* の間での *ptsH* 様遺伝子の相同性のほうが高かった。さらに、第 29 図及び第 9 表に示したように、アスパラガスの *ptsH* 様遺伝子の推定アミノ酸配列はグラム陰性菌よりもグラム陽性菌と高い相同性及び類似性を示した。これらの理由については現在のところ明らかでない。

バクテリアにおいて PTSH は単糖類であるグルコース、フルクトース及びマニトールの糖輸送に必須である(Saier, 1977; Postma & Lengeler, 1985 for reviews)。一方、植物細胞は一般的には二糖類であるシュクロースを利用する。植物がホスホエノールピルビン酸：糖ホスホトランスフェラーゼ系(PTS)によって単糖類をも利用していることを確認するには PTS の別の酵素（酵素 I）が植物で発現していることを確認する必要がある。

本節では、アスパラガス体細胞胚誘導系において培養条件の相違によって発現の異なる遺伝子を解析するために DIG-ディファレンシャル・ディスプレイ法を用い、いくつかの遺伝子断片を得た。それらのうち、湿潤条件下で発現が強かった遺伝子の一つはバクテリアの *ptsH* 遺伝子と高い相同性があった。*ptsH* 様遺伝子の発現活性化とアスパラガス体細胞胚誘導正常化の関係については今後の検討を要するが、これらの遺伝子やその発現様式を解析することによって正常な体細胞胚形成を制御する分子レベルでの機構の解明が進むことが期待される。

## 第3章の要約

正常な体細胞胚発生時の遺伝子発現を解析するために、アスパラガス体細胞胚誘導系において乾燥条件下で培養した場合と湿潤条件下で培養した場合の細胞について、ディファレンシャル・ディスプレイ法によって比較して異なる発現を示す遺伝子の解析を試みた。その結果、直接的に胚発生機構に関与すると思われる遺伝子については明らかにできなかったが、アスパラガスでは報告例のない gypsy グループに属するレトロトランスポゾン様配列と非常に相同性が高い遺伝子が乾燥条件下のアスパラガス培養細胞で発現することを明らかにした。さらに、植物では報告例のないホスホエノールピルビン酸：糖ホスホトランスフェラーゼ系(PTS)に関与する *ptsH* 様遺伝子がアスパラガスを含む単子葉植物及び数種の双子葉植物のゲノム中に存在することを明らかにした。これらの遺伝子やその発現様式を解析することによって正常な体細胞胚形成を制御する分子レベルでの機構の解明が進むことが期待される。



## 総合考察

アスパラガスは、基本的に雌雄異株であることから個体内及び集団内における遺伝的ヘテロ性が高く、さらに植物としての特性から効率的な育種は困難な状況にある。そこで、優良個体や育種過程における親系統をクローン増殖することが望まれている。

アスパラガスを含めて、植物を効率よくクローン増殖するには組織培養技術が必要であり、効率性を考慮した場合には体細胞胚誘導技術を利用することが有利である。しかしながら、体細胞胚誘導技術は体細胞胚発生のメカニズムが明らかにされておらず、汎用性ある技術とはなり得ていない。

そこで、本研究では、アスパラガスの組織培養による苗供給の実用化を目指して、①アスパラガスの安定かつ効率的な体細胞胚誘導法の確立、②アスパラガス体細胞胚の発芽率向上と斉一的発芽を目指した培養条件の検討を行うとともに、③体細胞胚形成機構に関する基礎的知見を得るために、体細胞胚誘導時に発現する遺伝子の解析に関する研究を行った。

そこで、本研究で得られた知見をもとに、体細胞胚誘導を利用したアスパラガス大量増殖実用化への展望及び体細胞胚形成の機構解明に関する今後の展望について考察する。

### 1. 体細胞胚を利用したアスパラガスの大量増殖法の確立

アスパラガスの実用的な大量増殖に体細胞胚誘導法を利用する場合、目的個体から安定的に体細胞胚を誘導する必要がある。そこで、安定かつ効率的に体細胞胚を誘導する培養系を確立するために各種の条件を検討した。

体細胞胚誘導系に関しては、大きく次の3つのステップに分けて検討した。すなわち、①体細胞胚を形成しやすいカルス(EC)を誘導し、それを選抜、維持、増殖する過程、次に、②ECから効率よく体細胞胚を形成させる過程、そして最後に、③体細胞胚を成熟させる過程である。

植物細胞は分化全能性を持つとはいうものの、カルスを誘導した場合に、再分化しやすいカルスと再分化しにくいカルスが生じることはよく経験する。したがって、体細胞胚誘導を目的とする場合には体細胞胚を分化しやすいカルス、すなわち EC を選抜し、それを増殖及び維持することが安定的に体細胞胚形成を行うには重要である。

はじめにアスパラガスの EC の性状を明らかにするために、無菌実生を用いてカルス誘導条件を検討した。無菌実生を用いた場合、優良個体からの大量増殖という目的からは材料として不適である。しかしながら、当初、アスパラガス EC とはいかにして誘導され、いかなる性状を示すかが不明であったことから、必然的に培養規模を大きくせざるを得なかった。そのような理由から、いつでも大量にかつ容易に準備可能な材料として無菌実生を選択した。このように試験着手時は容易に準備できる材料を用いることは重要なことである。諸条件の検討の結果、まず無菌実生からアスパラガスの EC を誘導することに成功し、その性状を明らかにすることができた。アスパラガスの EC は始めに形成されたカルスの表面に二次的に形成され、形成時は注意深く観察しなければ見落とすほど少量であること、さらに EC が出現するまでに長いときは6ヶ月程度を要することが明らかとなった。従来、アスパラガスの体細胞胚誘導が不安定であったのは、EC が出現する前のカルスに対して再分化処理を行っていたため、または少量の EC と多量の non-EC が混在したままで種々の検討を行っていたためと思われる。

無菌実生を用いて、EC の性状を明らかにし、それを維持及び増殖する条件が明らかになったので、次の段階として成株からの EC の誘導を試み、EC の誘導率を明らかにした。これにより、実際に優良個体等の目的個体をクローン増殖するために EC を得たい場合の培養規模が明らかとなった。すなわち、成株からの EC 誘導率は約 10 %程度であるため、目的とした個体から 100 個程度の若茎側芽頂組織を切りだしてカルス誘導すれば、ほぼ確実に EC が得られることが示された。

次に、増殖した EC から体細胞胚を再分化させる条件の検討を行い、培養容器内の環境をコントロールすることが、安定的かつ正常な体細胞胚の誘導に効果的であることを明らかにした。

当時までに、培地のゲル化剤濃度を高めることが培養物の水浸状化の軽減に効果的であることは数種の植物で明らかにされていたが(Debergh *et al.*, 1981; Debergh, 1983; Zimmerman & Cobb, 1989; 本間ら, 1991), 器官分化時からゲル化剤濃度を高めた例はなかった. 著者が, このアスパラガス体細胞胚誘導系を確立した当時, 古在(1988)は農業環境工学の立場からそれまでの培養方法を検討し, 培養植物は二酸化炭素飢餓の状態にあり, ほとんど光合成を行っていないことを明らかにするとともに培養容器内の環境を改善する必要があることを指摘した. 著者は器官分化時の培養容器内環境に, 古在(1988)は幼植物体育成時の培養容器内環境に着目した点で異なるが, これらの研究以降, 組織培養に携わる多くの人が培養容器内環境に注意を払うようになった.

本研究で確立された体細胞胚誘導法は汎用性が高く, 第 1 章第 3 節に示したナスの他にカンキツ(小林ら, 1992), カンショ(沢田ら, 1990)及びシクラメン(山口, 私信)の体細胞胚誘導でもその有効性が明らかにされている.

一般的に, 体細胞胚を誘導する培養系が確立されても体細胞胚の発芽率が低いことや発芽の斉一性が低いこと, 発芽後の生長が貧弱であるという問題が残る場合が多い. 本研究で確立された培養法は, 体細胞胚誘導培地(無菌通気膜で封じた容器内の 1.0 % ジェランガム培地)上では発芽前の状態で止まっており, 発芽培地へ移植すると一齐に発芽したことから, 発芽の斉一性は極めて高いといえる. 発芽後の生長についてはなんら問題はなかった. 発芽率は約 10 %と低かったので改良の余地があると考え, 発芽率向上のための条件検討を行った. 発芽率を顕著に上昇できる条件は見出せなかったが, 誘導された体細胞胚が正常な発芽能力を獲得するには一定期間を経過する必要がある. その過程で体細胞胚が成熟しつつあると推察した.

胚の成熟は, 形態的变化が少なくても代謝的には大きく変化する過程であり, それを解析するには生化学的手法が必須となる. 第 2 章第 2 節において, アスパラガス体細胞胚中のタンパク質を分析し, 体細胞胚の形態的变化がなくても内在するタンパク質は大きく変化することを明らかにし, 成熟度を示すマーカーとなるポリペプチドの発現を明らかにした. 今後, 本研究で示したように,

培養中に生じる種々の代謝的変化を生化学的手法によってとらえながら、その知見をもとに最適条件を検索することが可能となろう。

## 2. 体細胞胚形成機構解明の試み

体細胞胚発生のメカニズムを解析することは、普遍性ある体細胞胚誘導法確立のためには重要である。種々の生命活動のメカニズムを解明するにはその過程で発現している遺伝子を解析することが有効なアプローチであり、体細胞胚発生についても同様である。本研究で確立した体細胞胚誘導法は、体細胞胚誘導時の培養容器内環境を変化させることが正常な体細胞胚形成に有効であるという点において汎用性が高い。そこで培養容器内環境を変化させた際に細胞の遺伝子発現はどのように変化しているかを検討することによって体細胞胚発生機構解明の糸口を探ろうとした。

胚発生時に発現する遺伝子の解析はニンジンを中心として行われ、現在では多くの遺伝子の発現が報告されている(Goldberg *et al.*, 1989; Zimmerman, 1993)。しかしながら、胚発生機構を解明するにはまだデータ量が不足している。特に、双子葉植物に比べて単子葉植物についてはこの分野の研究例が少ない。

本研究の結果、直接的に胚発生機構に関与すると思われる遺伝子については明らかにできなかった。しかしながら、派生的にアスパラガスではこれまでに報告例のない遺伝子、*gypsy* タイプのレトロトランスポゾン及び *ptsH* 様遺伝子の発現を明らかにすることができた。

## 3. 体細胞胚を利用したアスパラガスクローン苗生産への展望

本研究によって確立した体細胞胚誘導法は、多数の苗を生産することが可能である。Hasegawa *et al.* (1973) はアスパラガスの一つの茎頂組織から茎頂培養法によって 1 年間で 300,000 本の植物体を生産可能であると試算した。本研究で確立した培養法では、圧縮細胞量 1 ml の EC から 3 カ月後には 100,000,000 本が生産可能である。したがって、増殖率の点で、ほぼ実用レベルに達したといえよう。

一般的に、カルスからの再生植物では変異個体の出現が危惧される。しかしながら、著者らはこれまでに多数の再分化個体を得たが、その中に農業上問題となるような変異は未だ検出していない。國武ら(1995)及び Kohmura *et al.* (1996)もアスパラガス体細胞胚由来の再生植物集団において特に変異個体は検出していない。この点においても本研究で確立した系は実用上問題ないといえる。

現在、長野県内のアスパラガス生産農家の圃場で選んだ優良個体から本法にて体細胞胚を誘導して増殖したクローン苗を、試験栽培中である。実生株集団と比較して、このクローン集団は萌芽時期や若茎のサイズの揃いが優れているという(西澤, 私信)。國武ら(1995)も 1.0 % ジェランガム培地を利用した体細胞胚誘導によるアスパラガス優良株のクローン増殖を行い、試験栽培した結果、同様な結果が得られたことを報告している。

本研究により、アスパラガスを実用レベルでクローン増殖するための基本的な培養系を確立するとともに体細胞胚形成のメカニズム解明の手がかりを示すことができた。今後、確立した培養法を優良個体または育種過程における親系統のクローン増殖に適用することによって、これまでよりも集団としての収量性や品質の揃った栽培しやすい品種が育成されるものと期待される。また、アスパラガス以外の植物種へも適用され、組織培養苗がより身近になるものと期待される。さらに、今後も体細胞胚形成時の遺伝子発現に関する研究が蓄積され、将来的には体細胞胚形成のメカニズムが明らかにされることが期待される。

## 摘要

アスパラガスは、基本的に雌雄異株であることから個体内及び集団内におけるヘテロ性が高く、さらに植物としての特性から効率的な育種は困難な状況にある。そこで、優良個体や親系統をクローン増殖することが望まれている。アスパラガス以外の植物も含めて、効率よくクローン増殖するには組織培養技術が必要であり、特に効率性を考慮した場合は体細胞胚誘導技術を利用することが有利である。

本研究では、アスパラガスの組織培養による苗供給の実用化を目指すとともに体細胞胚形成機構に関する基礎的知見を得ることを目的に、①アスパラガスの安定かつ効率的な体細胞胚誘導法の確立、②アスパラガス体細胞胚の発芽率向上と斉一的発芽のための条件検討、③アスパラガス体細胞胚誘導時に発現する遺伝子の解析、の3項目について研究を進めた。

### 1. 体細胞胚を利用したアスパラガスの大量増殖法の確立

優良個体を大量増殖することの重要性が高いアスパラガスにおいて、安定かつ効率的な体細胞胚誘導法の確立を試みた。

はじめに無菌実生を材料として NAA と BA を組み合わせた培地または 2,4-D を添加した培地上で EC の誘導を試みた。その結果、無菌実生鱗芽部が材料として適していることが明らかになった。さらに、EC を観察することによって、アスパラガス EC の性状は次のようであることを明らかにした。個々の細胞の大きさが 10~20  $\mu\text{m}$  の球状で、内容物に富んだ小さな細胞が密に集合して 100~500  $\mu\text{m}$  の細胞塊を形成し、その細胞塊が集合して構成され、細胞塊同士は遊離しやすいためカルス全体としてはフライアブルで、外観は黄白色であった。次に、成株を材料として 2,4-D (5  $\mu\text{M}$ ) を添加した培地で EC の誘導を試み、若茎の側芽頂部が材料として適していること及び EC 誘導率が約 10 %

程度であることを明らかにした。また、ECを増殖する条件を明らかにするために NAA, BA あるいは 2,4-D を添加した固形培地や液体培地を検討した。その結果、2,4-D (5  $\mu\text{M}$ )を含む液体培地で回転振盪培養することが最も効率的であることが明らかになり、増殖率は1週間に8~10倍であることが明らかとなった。

次に、ECから効率的に体細胞胚を誘導するための培養条件、特に培養容器内の環境条件に着目して検討した。液体振盪培養した EC を材料として、再分化培地のゲル化剤の種類と濃度及び培養容器のふたに通気性を付与するか否かを検討したところ、再分化培地を高濃度(1.0 %)のジェランガムでゲル化するとともに培養容器の口を無菌通気膜(ミリラップ)で覆うことによって、水浸状でない正常な体細胞胚を容易に誘導できることを明らかにした。また、培養容器内の乾燥条件が正常な体細胞胚形成に効果的であったと考えられた。

さらに、アスパラガスで確立した体細胞胚誘導系の汎用性をナスを材料に検討した。無菌実生の子葉部切片を材料として NAA (1~100  $\mu\text{M}$ )または 2,4-D (1~100  $\mu\text{M}$ )を含む培地を用いて EC の誘導を試みた。その結果、高濃度の 2,4-D (50  $\mu\text{M}$ )を含む培地上で培養した切片を同組成の液体培地中で回転振盪培養することによって EC を誘導できることが明らかとなった。誘導された EC を材料として、第2節で確立した培養法を応用したところ、アスパラガスの場合と同様、水浸状でない正常な体細胞胚を容易に誘導できることが明らかとなった。さらに、品種間差について検討したところ、EC の誘導に関しては品種間差が観察されたが、誘導された EC からの体細胞胚形成に関しては大きな品種間差は観察されなかった。

以上のように、これまで不安定であったアスパラガス体細胞胚誘導が安定かつ効率的に行えるようになった。

## 2. アスパラガス体細胞胚の発芽率向上及び斉一的発芽のための培養条件の検討

安定かつ効率的にアスパラガス体細胞胚を誘導することが可能となったが、体細胞胚からの発芽率が低いことが問題であったため、その点を改良するための検討を行った。

はじめに、他の植物で体細胞胚の発芽率向上に効果的であった方法を中心に、アスパラガス体細胞胚へ各種の処理を試みた。ECの乾燥処理、体細胞胚誘導培地の無機塩濃度の検討、種々の培地(ABA添加、ショ糖濃度上昇、抗オーキシシンや抗サイトカイニンの添加等)での体細胞胚の培養、体細胞胚の乾燥処理等を検討した。その結果、顕著に体細胞胚の発芽率を上昇させる条件は明らかにできなかったが、体細胞胚の培養期間が長いほど発芽率は向上する傾向にあり、培養中に体細胞胚が成熟しつつあると思われた。

次に、胚発達の正常化を示す生化学的なマーカーの検索を試みた。アスパラガス体細胞胚と接合胚から全タンパク質を抽出して SDS-PAGE を行い、両者を比較した。その結果、再分化処理 7 週間後の体細胞胚の場合は、完熟種子中の接合胚とカルスの中間的なポリペプチド電気泳動パターンを示した。さらに接合胚で、成熟した胚で特異的に認められる 17.5KD のポリペプチドを見出した。このポリペプチドは培養期間の長い(体細胞胚誘導処理後 10 週間)体細胞胚にも認められたことから胚の成熟や発芽の前段階と関連するものと思われ、アスパラガス体細胞胚の成熟条件を検索する上でのマーカーになりうると考えられた。

## 3. アスパラガス体細胞胚誘導時に発現する遺伝子の解析

正常な体細胞胚発生時の遺伝子発現を解析するために、アスパラガス体細胞胚誘導系において乾燥条件下で培養した場合と湿潤条件下で培養した場合の細胞について、ディファレンシャル・ディスプレイ法によって比較して異なる発現を示す遺伝子の解析を試みた。その結果、直接的に胚発生機構に関与すると思われる遺伝子については明らかにできなかったが、アスパラガスでは報告例のない gypsy グループに属するレトロトランスポゾン様配列と非常に相同性が高い遺伝子が乾燥処理



により発現することを明らかにしたほか、植物では報告例のないホスホエノールピルビン酸：糖ホスホトランスフェラーゼ系 (PTS)に関与する *ptsH* 様遺伝子がアスパラガスを含む単子葉及び数種の双子葉植物のゲノム中に存在することを明らかにした。

本研究により、アスパラガスを実用レベルでクローン増殖するための基本的な培養系を確立するとともに体細胞胚形成のメカニズム解明の手がかりを示すことができた。今後、確立した培養法を優良個体そのものまたは親系統のクローン増殖に適用することによって、これまでよりも集団としての収量性や品質の揃った栽培しやすい品種が育成されるものと期待される。また、アスパラガス以外の植物種へも適用され、組織培養苗がより身近になるものと期待される。さらに、今後も体細胞胚形成時の遺伝子発現に関する研究が蓄積され、将来的には体細胞胚形成のメカニズムが明らかにされることが期待される。

## 謝 辞

本論文のとりまとめに際し、ご懇切なる指導を賜った神戸大学農学部稲垣昇教授に深謝の意を表す。また、本論文をとりまとめるにあたり、有意義なご指導とご校閲の労を賜った農学部教授安田武司博士及び王子善清博士には、心からお礼申し上げる。

茨城県農業総合センター西村繁夫博士には本研究開始時からご指導いただくとともに貴重なご助言と終始温かい励ましのお言葉を賜った。農林水産技術会議田部井豊博士及び農業生物資源研究所萱野暁明博士には実験遂行及び本論文のとりまとめに際して終始有益なご助言をいただいた。JA 長野経済連西澤秀治氏にはアスパラガス体細胞胚誘導系の確立に関する実験及び本培養系実用化の試みにご協力いただいた。

以上の各位に対し心から感謝の意を申し上げます。

## 引用文献

- Abe, T. and Y. Futsuhara (1986) Plant regeneration from suspension cultures of rice *Oryza sativa* L. Japan J. Breed. 36: 1-6.
- Abe, T., R. Shimizu, H. Iwamura and T. Kameya (1987) Flower induction by atrazine in seedlings of *Asparagus officinalis*. Physiol. Plant. 70: 228-230.
- Ackerson, R.C. (1984) Regulation of soybean embryogenesis by abscisic acid. J. Exp. Bot. 35: 403-413.
- Adams, C.A., M.C. Fjerstad and R.W. Rinne (1983) Characteristics of soybean seed maturation: necessity for slow dehydration. Crop Sci. 23: 265-267.
- Adams, C.A. and R.W. Rinne (1980) Moisture content as a controlling factor in seed development and germination. Int. Rev. Cytol. 68: 1-8.
- Afele, J.C., T. Senaratna, B.D. McKersie and P.K. Saxena (1992) Somatic embryogenesis and plant regeneration from zygotic embryo culture in blue spruce (*Picea pungens* Engelman.). Plant Cell Rep. 11: 299-303.
- Afele, J. C., Y. Tabei, Y. Yamada, T. Momiyama, F. Takaiwa, T. Kayano, S. Nishimura and T. Nishio (1995) Identification of mRNAs differentially expressed between embryogenic and non- embryogenic cultivars of eggplant during somatic embryogenesis.
- Ahloowalia, B.S. and A. Maretzki (1983) Plant regeneration via somatic embryogenesis in sugarcane. Plant Cell Rep. 2: 21-25.
- Aleith, F. and G. Richter (1990) Gene expression during induction of somatic embryogenesis in carrot cell suspensions. Planta 183: 17-24.
- Ali, M., H. Okubo and K. Fujieda (1991) *In vitro* multiplication of intra- and interspecific *Solanum* hybrids through somatic embryogenesis and adventitious organogenesis. J. Japan Soc. Hort. Sci. 60: 601-612.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers and D. J. Lipman (1990) Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215: 403-410.
- Ammirato, P.V. (1974) The effects of abscisic acid on the development of somatic embryos from cells of caraway (*Carum carvi* L.). Bot. Gaz. 135: 328-337.
- Ammirato, P.V. (1978) The effects of 8-azaguanine on the development of somatic embryos from cultured caraway cells. Plant Physiol. 61(suppl.): 46.
- Ammirato, P.V. (1983a) The regulation of somatic embryo development in plant cell cultures: Suspension culture techniques and hormone requirements. Bio/Technology 1:68-74
- Ammirato, P.V. (1983b) Embryogenesis. In: D.A. Evans, W.A. Sharp, P.V. Ammirato, Y. Yamada (eds.) Handbook of plant cell culture, Vol 1 Techniques for propagation and breeding. Macmillian Publishind Co., New York. pp 82-123.
- Ammirato, P.V. (1989) Recent progress in somatic embryogenesis. IAPTC. Newslett. 52: 2-16.
- Ammirato, P.V. and F.C. Steward (1971) Some effects of the environment on the development of embryos from cultured free cells. Bot. Gaz. 132: 149-158.

- Anandarajah, K. and B.D. McKersie (1990) Enhanced vigor of dry somatic embryos of *Medicago sativa* L. with increased sucrose. *Plant Sci.* 71: 261-266.
- Andreassen, D.C. and J.H. Ellison (1967) Root initiation of stem tip cuttings from mature asparagus plants. *Proc. Amr. Soc. Hort. Sci.* 90: 158-162.
- Attree, S.M., D. Moore, V.K. Sawhney and L.C. Fowke (1991a) Enhanced maturation and desiccation tolerance of white spruce (*Picea glauca* (Moench) Voss) somatic embryos: Effects of a non-plasmolysing water stress and abscisic acid. *Ann. Bot.* 68: 519-525.
- Attree, S.M., M.K. Pomeroy and L.C. Fowke (1992) Manipulation of conditions for the culture of somatic embryos of white spruce for improved triacylglycerol biosynthesis and desiccation tolerance. *Planta* 187: 395-404.
- Attree, S.M., T.E. Taurus, D.I. Dunstan and L.C. Fowke (1990) Somatic embryo maturation, germination, and soil establishment of plants of black and white spruce (*Picea mariana* and *Picea glauca*). *Can. J. Bot.* 68: 2583-2589.
- Bauer, D.H., H. Muller, J. Reich, H. Riede, V. Ahrenkiel, P. Warthoe and M. Strauss (1993) Identification of differentially expressed mRNA species by an improved display technique (DDRT-PCR). *Nucleic Acids Res.* 21: 4272-4280.
- Bell, L.M., R.N. Trigiano and B.V. Conger (1993) Relationship of abscisic acid to somatic embryogenesis in *Dactylis glomerata*. *Env. Exp. Bot.* 33: 495-499.
- Beyreuther, K., H. Raufuss, O. Schrecker and W. Hengstenberg (1977) phosphoenolpyruvate- dependent phosphotransferase system of *Staphylococcus aureus*. 1. Amino acid sequence of the phosphocarryer HPr. *Eur. J. Biochem.* 75: 275-286.
- Binarova, P. and J. Dolezel (1988) Alfalfa embryogenic cell suspension culture: Growth and ploidy level stability. *J. Plant Physiol.* 133:561-566.
- Binh, D.Q. and L.E. Heszky (1990) Restoration of the regeneration potential of long-term cell culture in rice (*Oryza sativa* L.) by salt pretreatment. *J. Plant Physiol.* 136: 336-340.
- Borkird, C., J.H. Choi and Z. R. Sung (1986) Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on the expression of embryogenic program in carrot. *Plant Physiol.* 81: 1143-1146.
- Boulay, M.P., P.K. Gupta, P. Krogstrup and D.J. Durzan (1988) Development of somatic embryos from cell suspension cultures of Norway spruce (*Picea abies* Karst). *Plant Cell Rep.* 7: 134-137.
- Boyd, D. A., D. G. Cvitkovitch and I. R. Hamilton (1994) Sequence and expression of the genes for HPr (*ptsH*) and Enzyme I (*ptsI*) of the phosphoenolpyruvate- dependent phosphotransferase transport system from *Streptococcus mutans*. *Infect. Immun.* 62: 1156-1165.
- Boyer, C., J.L. Hilbert and J. Vasseur (1993) Embryogenesis-related protein synthesis and accumulation during early acquisition of somatic embryogenesis competence on *Cichorium*. *Plant Sci.* 93: 41-53.
- Bozhkov, P.V., S.B. Mikhlina, G.A. Shiryayeva and L.A. Lebedenko (1993) Influence of nitrogen balance of culture medium on norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst) somatic embryogenesis: High frequency establishment of embryonal-suspensor mass lines from mature zygotic embryos. *J. Plant Physiol.* 142: 735-741.

- Bregitzer, P., D.A. Somers and H.W. Rines (1989) Development and characterization of friable, embryogenic oat callus. *Crop Sci.* 29: 798-803.
- Brown, D.C.W. (1988) Germplasm determination of *in vitro* somatic embryogenesis in alfalfa. *HortSci.* 23: 526-530.
- Brown, C., F.J. Brooks, D. Pearson and R.J. Mathias (1989) Control of embryogenesis and organogenesis in immature wheat embryo callus using increased medium osmolarity and abscisic acid. *J. Plant Physiol.* 133: 727-733.
- Buchheim, J.A., S.M. Colburn and J.P. Ranch (1989) Maturation of soybean somatic embryos and the transition to plantlet growth. *Plant Physiol.* 89:768-775.
- Bui Dang Ha, D. and I.A. Mckenzie (1973) The division of protoplasts from *Asparagus officinalis* L. and their growth and differentiation. *Protoplasma* 78: 215-221.
- Bui-Dang-Ha, D., B.Norrel and A.Masset (1975) Regeneration of *Asparagus officinalis* L. through callus derived from protoplasts. *J. Exp. Bot.* 26 (91): 263-270.
- Carman, J.G. (1988) Improved somatic embryogenesis in wheat by partial simulation of the in-ovulo oxygen, growth-regulator and dessication environments. *Planta* 175: 417-424.
- Chee, P.P. and D.M. Tricoli (1988) Somatic embryogenesis and plant regeneration from cell suspension cultures of *Cucumis sativas* L. *Plant Cell Rep.* 7: 274-277.
- Chee, R.P. and D.J. Cantliffe (1989) Inhibition of somatic embryogenesis in response to 2,3,5-triiodobenzoic acid and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in *Ipomoea batatas* (L.) Lam. Cultured *in vitro*. *J. Plant Physiol.* 135: 398-403.
- Chen, L.J. and D.S. Luthe (1987) Analysis of proteins from embryogenic and non-embryogenic rice (*Oryza sativa* L.) calli. *Plant Sci.* 48: 181-188.
- Chibbar, R.N., J. Shyluk, F. Georges, C.S. Mallard and F. Constabel (1988) Esterase isozymes as markers of somatic embryogenesis in cultured carrot cells. *J. Plant Physiol.* 133: 367-370.
- Chin, C.K. (1982) Promotion of shoot and root formation in *Asparagus* *in vitro* by ancymidol. *HortSci.* 17 (4): 590-591.
- Choi, J.H., L.S. Liu, C. Borkird and Z.R. Sung (1987) Cloning of genes developmentally regulated plant embryogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84: 1906-1910.
- Close, K.R. and L.A. Ludeman (1987) The effect of auxin-like plant growth regulators and osmotic regulation on induction of somatic embryogenesis from elite maize inbreds. *Plant Sci.* 52: 81-89.
- Coppens, L. and D. Dewitte (1990) Esterase and peroxidase zymograms from barley (*Hordeum vulgare* L.) callus as a biochemical marker system of embryogenesis and organogenesis. *Plant Sci.* 67: 97-105.
- Corriols-Thevenin, L. (1979) Different methods in asparagus breeding. In: Proc. 5<sup>th</sup> International Asparagus Symposium (G. Reuther, ed) pp. 8-20. Eucarpia Section Vegetables. Geisenheim Forschungsanstalt, Germany.
- Crouch, M.L. (1982) Non-zygotic embryos of *Brassica napus* L. contain embryo-specific proteins. *Planta* 156: 520-524.

- Crouch, M.L. and I.M. Sussex (1981) Development and storage-protein synthesis in *Brassica napus* L. embryos in vivo and in vitro. *Planta* 153: 64-74.
- Dasgupta, J. and J.D. Bewley (1982) Desiccation of axes of *Phaseolus vulgaris* during development causes a switch from a developmental pattern of protein synthesis to a germinative pattern. *Plant Physiol.* 70: 1224-1227.
- Dayhoff, M. O., W. C. Baker and L. T. Hunt (1983) Establishment homologies in protein sequence. *Methods. Enzymol.* 91: 524-545.
- Debergh, P.C. (1983) Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium. *Physiol. Plant.* 59:270-276.
- Debergh, P.C., Y. Harbauoui 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.* 53:181-187.
- Delbreil, B. and M. Jullien (1994) Evidence for in vitro induced mutation which improves somatic embryogenesis in *Asparagus officinalis* L. *Plant Cell Rep.* 13: 372-376.
- Depta, H., K.H. Eisele and R. Hertel (1983) Specific inhibition of auxin transport: action on tissue segments and *in vitro* binding to membranes from maize coleoptiles. *Plant Sci. Lett.* 31: 181-192.
- De Reuse, H., A. Roy and A. Danchin (1985) Analysis of the *ptsH-ptsI* -orr region in *Escherichia coli* K-12: nucleotide sequence of the *ptsH* gene. *Gene* 35: 199-207.
- Desjardins, Y., H. Tiessen and P.M. Harney (1987) The effect of sucrose and ancymidol on the in vitro rooting of nodal sections of asparagus. *Hortscience* 22:131-133.
- Deutscher, J., B. Pevec, K. Beyreuther, H. H. Kiltz and W. Hengstenberg (1986) Streptococcal phosphoenolpyruvate-sugar phosphotransferase system: amino acid sequence and site of ATP-dependent phosphorylation of HPr. *Biochemistry* 25: 6543-6551.
- de Vries, S.C., H. Booij, P. Meyerink, G. Huisman, H.D. Wilde, T.L. Thomas and A. van Kammen (1988) Acquisition of embryogenic potential in carrot cell-suspension cultures. *Planta* 176: 196-204.
- DeWald, S.G., R.E. Litz and G.A. Moore (1989) Maturation and germination of mango somatic embryos. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 114: 837-841.
- Dobinson, K.F., R.E. Harris and J.E. Hamer (1993) *Grasshopper*, a long terminal repeat (LTR) retroelement in the phytopathogenic fungus *Magnaporthe grisea*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 6: 114-126.
- Doolittle, R.F., D.F. Feng, M.S. Johnson and M.A. McClure (1989) Origins and evolutionary relationships of retroviruses. *Quart. Rev. Biol.* 64: 1-29.
- Dunstan, D.I., F. Bekkaoui, M. Pilon, L.C. Fowke and S.R. Abrams (1988) Effects of abscisic acid and analogues on the maturation of white spruce (*Picea glauca*) somatic embryos. *Plant Sci.* 58: 77-84.
- Eisermann, R., R. Fischer, U. Kessler, A. Neubauer and W. Hengstenberg (1991) *Staphylococcal* phosphoenolpyruvate- dependent phosphotransferase system: purification and protein sequencing of the *Staphylococcus carnosus* histidine- containing protein, and cloning and DNA sequencing of the *ptsH* gene. *Eur. J. Biochem.* 197: 9-14.

- Etienne, H., P. Montoro, N. Michaux-Ferriere and M.P. Carron (1993a) Effects of desiccation, medium osmolarity and abscisic acid on the maturation of *Hevea brasiliensis* somatic embryos. *J. Exp. Bot.* 44: 1613-1619.
- Etienne, H., B. Sotta, P. Montoro, E. Miginiac and M.P. Carron (1993b) Comparison of endogenous ABA and IAA contents in somatic and zygotic embryos of *Hevea brasiliensis* (Mull. Arg.) during ontogenesis. *Plant Sci.* 92: 111-119.
- Evans, D.A. and O.L. Gamborg (1982) Chromosome stability of cell suspension cultures of *Nicotiana* spp. *Plant Cell Rep.* 1: 104-107.
- Everett, N.P., M.J. Wach and D.J. Ashworth (1985) Biochemical markers of embryogenesis in tissue cultures of the maize inbred B73. *Plant Sci.* 41: 133-140.
- Finer, J.J. and A. Nagasawa (1980) Development of an embryogenic suspension culture of soybean (*Glycine max* Merrill.). *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 15: 125-136.
- Finkelstein, R.R. and M. L. Crouch (1984) Precocious germinating rapeseed embryos retain characteristics of embryogeny. *Planta* 162: 125-131.
- Flinn, B.S., D.R. Roberts, C.H. Newton, D.R. Cyr, F.B. Webster and E.P. Taylor (1993) Storage protein gene expression in zygotic and somatic embryos of interior spruce. *Physiol. Plant.* 89: 719-730.
- Franken, A.A. (1970) Sex characteristics and inheritance of sex in asparagus (*Asparagus officinalis* L.) *Euphytica* 19: 277-287.
- Fransz, P.F., N.C.A. de Ruijter and J.H.N. Schel (1989) Isozymes as biochemical and cytochemical markers in embryogenic callus cultures of maize (*Zea mays* L.). *Plant Cell Rep.* 8: 67-70.
- Fujii, J.A.A., D. Slade, R. Olsen, S.E. Ruzin and K. Redenbaugh (1990) Alfalfa somatic embryo maturation and conversion to plants. *Plant Sci.* 72: 93-100.
- Fujimura T. and A. Komamine (1979) Synchronization of somatic embryogenesis in a carrot cell suspension culture. *Plant Physiol.* 64:162-164.
- Fujimura T. and A. Komamine (1980) Mode of action of 2,4-D and zeatin on somatic embryogenesis in a carrot cell suspension culture. *Z. Pflanzenphysiol.* 95: 355-358.
- Galston, A.W. (1948) On the physiology of root initiation in excised asparagus stem tips. *Am. J. Bot.* 35: 281-287.
- Gawel, N.J. and C.D. Robacker (1990) Genetic control of somatic embryogenesis in cotton petiole callus cultures. *Euphytica* 49: 249-253.
- Gleddie, S., W. Keller and G. Setterfield (1983) Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants and cell suspensions of *Solanum melongena* (eggplant). *Can. J. Bot.*, 61: 656-666.
- Goldberg, R.B., S.J. Barker and L. Perez-Grau (1989) Regulation of gene expression during plant embryogenesis. *Cell* 56: 149-160.
- Gonzy-Treboul, G., M. Zagorec, M. C. Rain-Guion and M. Steinmetz (1989) Phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system in *Bacillus subtilis*: nucleotide sequence of *ptsX*, *ptsH* and the 5'-end of *ptsI* and evidence for a *ptsHI* operon. *Mol. Microbiol.* 3: 103-112.

- Gorter, C.J. (1965) Vegetative propagation of *Asparagus officinalis* by cuttings. J. Hort. Sci. 40: 177-179.
- Grandbastien, M.A. (1992) Retroelements in higher plants. Trends. Genet.. 8: 103-108.
- Gray, D.J. (1987) Quiescence in monocotyledonous and dicotyledonous somatic embryos induced by dehydration. HortScience 22: 810-814.
- Gray, D.J. and A. Purohit (1991) Somatic embryogenesis and development of synthetic seed technology. Critical Rev. Plant Sci. 10: 33-61.
- Grimes, H.D. and T.K. Hodges (1990) The inorganic NO<sub>3</sub><sup>-</sup>:NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ratio influences plant regeneration and auxin sensitivity in primary callus derived from immature embryos of indica rice (*Oryza sativa* L.). J. Plant Physiol. 136: 362-367.
- Guimaraes, M.J., F. Lee, A. Zlotnik and T. McClanahan (1995) Differential display by PCR: novel findings and applications. Nucleic Acids Res. 23: 1832-1833.
- Hahne, G., J.E. Mayer and H. Lorz (1988) Embryogenic and callus- specific proteins in somatic embryogenesis of the grass, *Dactylis glomerata* L. Plant Sci. 55: 267-279.
- Hakman, I. (1993) Embryology in norway spruce (*Picea abies*). An analysis of the composition of seed storage proteins and deposition of storage reserves during seed development and somatic embryogenesis. Physiol. Plant. 87: 148-159.
- Hakman, I. and S. von Arnold (1988) Somatic embryogenesis and plant regeneration from suspension cultures of *Picea glauca* (White spruce). Physiol. Plant. 72: 579-587.
- Hammatt, N. and M.R. Davey (1987) Somatic embryogenesis and plant regeneration from cultured zygotic embryos of soybean (*Glycine max* L. Merr.) J. Plant Physiol. 128: 219-226.
- Hansen, L.J., D.L. Chalker and S.B. Sandmeyer (1988) Ty3, a yeast retrotransposon associated with tRNA genes has homology to animal retroviruses. Mol. Cell Biol. 8: 5245-5256.
- 原田隆・八鍬利郎 (1973) アスパラガスの形態形成に関する研究 (第3報) 組織培養におけるカルス形成および器官分化の経時的観察. 北海道大学農学部邦文紀要 8: 175-181.
- 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 cyto-histological characteristics. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 98: 143-148.
- Hilbert, J-L., T. Dubois and J. Vasseur (1992) Detection of embryogenesis-related proteins during somatic embryo formation in *Cichorium*. Plant Physiol. Biochem. 30: 733-741.
- 平林泰平 (1990) セルリーの不定胚誘導. 農耕と園芸 (別). バイオホルティ 5: 22-23.
- Hirochika, H. (1993) Activation of tobacco retrotransposons during tissue culture. EMBO J. 12: 2521-2528.
- Hirochika, H. (1995) Activation of plant retrotransposons by stress, in: modification of gene expression and non-mendelian inheritance. K. Oono and F. Takaiwa (Eds.) National Institute of Agrobiological Resources, Tsukuba, Japan, pp. 15-21.
- Hirochika, H. and R. Hirochika (1993) Ty1-copia group retrotransposons as ubiquitous components of plant genomes. Jpn. J. Genet. 68: 35-46.



- Hodges, T.K., K.K. Kamo, C.W. Imbrie and M.R. Becwar (1986) Genotype specificity of somatic embryogenesis and regeneration in maize. *Bio/Technology* 4: 219-223.
- 本間義之・大沢高志・戸田幹彦(1991)びん内馴化法によるメロン不定胚由来個体の Vitrification の克服と育苗期間の短縮. 静岡農試研報. 36: 75-85.
- Hondermann, W. and B. Wiberg (1973) Breeding all-male varieties of asparagus by utilization of anther and tissue culture. *Z. Pflanzenzuecht.* 69: 19-24.
- Hu, C.Y. and P.J. Wang (1983) Meristem, Shoot Tip, and Bud Cultures. In: D.A. Evans, W.A. Sharp, P.V. Ammirato, Y. Yamada (eds.) *Handbook of plant cell culture, Vol 1 Techniques for propagation and breeding.* Macmillian Publishind Co., New York. pp 177-227.
- Ichi, T., T. Koda, I. Asai, A. Hatanaka and J. Sekiya (1986) Effects of gelling agents on in vitro culture of plant tissues. *Agric. Biol. Chem.* 50: 2397-2399.
- Inagaki, N., T. Harada and T. Yakuwa (1983) Studies on the anther culture of horticultural crops. VII. Investigation of optimal conditions for obtaining pollen-originating callus and its characteristics in *Asparagus officinalis* L. *J. Fac. Agr. Hokkaido Univ.* 61: 279-285.
- Ito, P.J. and T.M. Currence (1964) Inbreeding and heterosis in asparagus. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 86: 338-346.
- 伊藤梯右・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. 広島農技セ研報. 60: 35-45.
- Johnson, R.R., H.J. Cranston, M.E. Charverra and W.E. Dyer (1995) Characterization of cDNA for differentially expressed genes in embryos of dormant and nondormant *Avena fatua* L. caryopses. *Plant Mol. Biol.* 28: 113-122.
- Kamada, H. and H. Harada (1979) Studies on the organogenesis in carrot tissue cultures. II. Effects of amino acids and inorganic nitrogenous compound on somatic embryogenesis. *Z. Pflanzenphysiol.* 91:453-463.
- 鎌田博・原田宏(1979)不定胚分化. 植物組織培養. 原田宏・駒嶺穆(編). 理工学社. 東京. pp. 91-104.
- Kamada, H. and H. Harada (1981) Changes in the endogenous levels and effects of abscisic acid during somatic embryogenesis of *Daucus carota* L. *Plant Cell Physiol.* 22: 1423-1429.
- Kamada, H., K. Kobayashi, T. Kiyosue and H. Harada (1989) Stress induced somatic embryogenesis in carrot and its application to synthetic seed production. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 25: 1163-1166.
- Katekar, G.F. and A.E. Geissler (1980) Auxin transport inhibitors. IV. Evidence of a common mode action for a proposed class of auxin transport inhibitors: the phytotropins. *Plant Physiol.* 66: 1190-1195.
- Kawahara, R., S. Sunabori, H. Fukuda and A. Komamine (1992) A gene expressed preferentially in the globular stage of somatic embryogenesis encodes elongation factor 1  $\alpha$  in carrot. *Eur. J. Biochem.* 209: 157-162.
- Kermode, A.R. and J.D. Bewley (1988) The role of maturation drying in the transition from seed development to germination. V. Responses of the immature castor bean embryo to isolation from the whole seed: A comparison with premature desiccation. *J. Exp. Bot.* 39: 487-497.

- Khunachak, A., C.K. Chin, T. Le and T. Gianfagna (1987) Promotion of asparagus shoot and root growth retardants. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 11: 97-110.
- Kielly, G.A. and S.R. Bowley (1992) Genetic control of somatic embryogenesis in alfalfa. *Genome* 35: 474-477.
- Kitto, S.L. and J. Janick (1985) Hardening treatment increased survival of synthetically-coated asexual embryos of carrot. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 110: 283-286.
- Kiyosue, T., S. Satoh, H. Kamada and H. Harada (1991) Purification and immunohistochemical detection of an embryogenic cell protein in carrot. *Plant Physiol.* 95: 1077-1083.
- Kiyosue, T., K. Yamaguchi-Shinozaki, K. Shinozaki, K. Higashi, S. Sato, H. Kamada and H. Harada (1992) Isolation and characterization of a cDNA that encodes ECP31, an embryogenic-cell protein from carrot. *Plant Mol. Biol.* 19: 239-249.
- Kiyosue, T., K. Yamaguchi-Shinozaki, K. Shinozaki, H. Kamada and H. Harada (1993) cDNA cloning of ECP40, an embryogenic-cell protein in carrot, and its expression during somatic and zygotic embryogenesis. *Plant Mol. Biol.* 21: 1053-1068.
- 小林省蔵・生山巖・大河原敏文 (1992) 木本性作物の体細胞胚. バイオナーサリーシステムの開発に関する研究. 研究成果 276: 26-28.
- Kochba, J. and P. Spiegel-Roy (1977) The effects of auxin, cytokinins and inhibitors on embryogenesis in habituated ovular callus of the 'Shamouti' orange (*Citrus sinensis*). *Z. Pflanzenphysiol.* 81: 283-288.
- Koda, T., T. Ichi, H. Yamagishi and H. Yoshikawa (1988) Effects of phytohormones and gelling agents on plant regeneration from protoplasts of red cabbage. *Agric. Biol. Chem.* 52: 2337-2340.
- 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.
- Kohmura, H., 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. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 65: 311-319.
- Komatsuda, T. and K. Ohyama (1988) Genotypes of high competence for somatic embryogenesis and plant regeneration in soybean *Glycine max*. *Theor. Appl. Genet.* 75: 695-700.
- Kong, Y. and C.K. Chin (1988) Culture of asparagus protoplasts on porous polypropylene membrane. *Plant Cell Rep.* 7: 67-69.
- Kott, L.S. and W.D. Beversdorf (1990) Enhanced plant regeneration from microspore-derived embryos of *Brassica napus* by chilling, partial desiccation and age selection. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 23: 187-192.
- 古在豊樹 (1988) 植物組織培養と培養器内環境調節. 化学と生物 26: 113-119.
- Kumar, P.P., W.J. Richard and T.A. Thorpe (1989) Ethylene and carbon dioxide accumulation, and growth of cell suspension cultures of *Picea glauca* (white spruce). *J. Plant Physiol.* 135: 592-596.
- Kunitake, H. and M. Mii (1990) Somatic embryogenesis and plant regeneration from protoplasts of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) *Plant Cell Rep.* 8: 706-710.

- 国武久登・中島寿亀・森欣也・田中政信 (1995) 組織培養によるアスパラガス苗の大量生産システム. 組織培養 21: 374-379.
- 桑原宏司・中島寿亀・田中政信 (1989) 胚様体, 苗条原基の利用法の開発. I. アスパラガスの体細胞胚の誘導について. 佐賀農試研報. 25: 59-64.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.
- Lallemand, J., F. Briand, F. Breuils, D. Denoue and C. Rameau (1994) Identification of *Asparagus* varieties by isozyme patterns. Euphytica 79: 1-4.
- Lazarte, J.E. and S.A. Garrison (1980) Sex modification in *Asparagus officinalis* L. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 105 (5): 691-694.
- Lecouteux, C.G., F.M. Lai and B.D. McKersie (1993) Maturation of alfalfa (*Medicago sativa* L.) somatic embryos by abscisic acid, sucrose and chilling stress. Plant Sci. 94: 207-213.
- Levin, H.L., D.C. Weaver and J.D. Boeke (1990) Two related families of retrotransposons from *Schizosaccharomyces pombe*. Mol. Cell Biol. 10: 6791-6798.
- Liang, P. and A.B. Pardee (1992) Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. Science 257: 967-971.
- Liang, P., L. Averboukh and B. Pardee (1993) Distribution of cloning of eukaryotic mRNAs by means of differential display: refinements and optimization. Nucleic Acids Res. 21: 3269-3275.
- Liang, P., W. Zhu, X. Zhang, Z. Guo, R.P. O'Connell, L. Averboukh, F. Wang and A.B. Pardee (1994) Differential display using one-base anchored oligo-dT primers. Nucleic Acids Res. 22: 5763-5764.
- Linsmaier, E.U. and F. Skoog (1965) Organic growth factors requirements of tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 18: 100-127.
- Lipman, D. J. and W. R. Pearson (1985) Rapid and sensitive protein similarity searches. Science 227: 1435-1441.
- Litz, R.E. (1986) Effect of osmotic stress on somatic embryogenesis in *Carica* suspension cultures. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 111: 969-972.
- Loo, S.W. (1946) Cultivation of excised stem tips of asparagus in vitro. Am. J. Bot. 32: 13-17.
- Loptien, H. (1979) Identification of the sex chromosome pair in asparagus (*Asparagus officinalis* L.). Z. Pflanzenzuchtg. 82: 162-173.
- Ma, H., M. Gu and G.H. Liang (1987) Plant regeneration from cultured immature embryos of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. Theor. Appl. Genet. 73: 389-394.
- MacRae, S. and J. van Staden (1990) *In vitro* culture of *Eucalyptus grandis*: Effect of gelling agents on propagation. J. Plant Physiol. 137: 249-251.
- Maestri, E., F.M. Restivo, G.P.M. Longo, A. Falavigna and F. Tassi (1991) Isozyme gene markers in the dioecious species *Asparagus officinalis* L. Theor. Appl. Genet. 81: 613-618.
- Marks, G.E. (1973) Selecting asparagus plants as sources of haploids. Euphytica 22: 310-316.

- Martinelli, L., A. Scienza, P. Villa, P. de Ponti and E. Gianazza (1993) Enzyme markers for somatic embryogenesis in *Vitis*. J. Plant Physiol. 141: 476-481.
- Mathews, H., C. Schopke, R. Carcamo, P. Chavarriaga, C. Fauquet and R.N. Beachy (1993) Improvement of somatic embryogenesis and plant recovery in cassava. Plant Cell Rep. 12: 328-333.
- Matsubara, S. (1973) Population effect in lateral bud culture of asparagus and promotion of root formation by transplanting. J. Japan Soc. Hort. Sci. 42 (2): 142-146.
- Matsuoka, H. and K. Hinata (1979) NAA-induced organogenesis and embryogenesis in hypocotyl callus of *Solanum melongena* L. J. Exp. Bot. 30: 363-370.
- May, R.A. and K.C. Sink (1995) Genotype and auxin influence direct somatic embryogenesis from protoplasts derived from embryogenic cell suspensions of *Asparagus officinalis* L. Plant Sci. 108: 71-84.
- McClintock, B. (1984) The significance of responses of the genome to challenge. Science 226: 792-801.
- McHale, M.T., I.N. Roberts, S.M. Noble, Ch. Beaumont, M.P. Whitehead, D. Seth and R.P. Oliver (1992) Cft-I: an LTR-retrotransposon in *Cladosporium fulvum*, a fungal pathogen of tomato. Mol. Gen. Genet. 233: 337-347.
- McKersie, B.D., S.R. Bowley, T. Senaratna, D.C.W. Brown and J.D. Bewley (1988) Application of artificial seed technology in the production of hybrid alfalfa (*Medicago sativa* L.). In Vitro Cell Dev. Biol. 24: 71A (abstract).
- Milborrow, B.V. (1974) The chemistry and physiology of abscisic acid. Annu. Rev. Plant. Physiol. 25: 259-307.
- Mizobuchi-Fukuoka, R., K.T. Yoshida, S. Naito and G. Takeda (1996) Cloning of a gene that is specifically expressed during somatic and zygotic embryogenesis in rice. Breed. Sci. 46: 35-38.
- Mohanty, B.D. and P.D. Ghosh (1988) Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf callus of *Hordeum vulgare*. Ann. Bot. 61:551-555.
- Momiyama, T., J.C. Afele, T. Saito, T. Kayano, Y. Tabei, F. Takaiwa, K. Takayanagi and S. Nishimura (1995) Differential display identifies developmentally regulated genes during somatic embryogenesis in eggplant (*Solanum melongena* L.). Biochem. Biophysic. Res. Comm. 213: 376-382.
- Monna, L., A. Miyao, T. Inoue, S. Fukuoka, M. Yamazaki, H.S. Zhong, T. Sasaki and Y. Minobe (1994) Determination of RAPD markers in rice and their conversion into sequenced tagged sites (STSs) and STS-specific primers. DNA Res. 1: 139-148.
- Morel, G.M. (1972) Morphogenesis of stem apical meristem cultivated in vitro: Application to clonal propagation. Phytomorphology 22: 265-277.
- Mou, L., H. Miller, J. Li, E. Wang and L. Chalifour (1994) Improvements to differential display method for gene analysis. Biochem. Biophysic. Res. Comm. 199: 564-569.
- 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: 158-161.
- Murashige, T. and F. Skoog (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497.

- Narasimhulu, S.B. and V.L. Chopra (1988) Species specific shoot regeneration response of cotyledonary explants of *Brassicacae*. *Plant Cell Rep.* 7: 104-106.
- 西村繁夫・齊藤猛雄・山口真美子 (1990) 不定胚形成の現状と誘導技術. 農耕と園芸 (別). バイオホルティ 5: 9-15.
- Noller, H. F. and R. A. Garrett (1979) Structure of 5S ribosomal RNA from *Escherichia coli*: Identification of kethoxal- reactive sites in the A and B conformations. *J. Mol. Biol.* 132: 621-636.
- Nomura, K. and A. Komamine (1985) Identification and isolation of single cells that produce somatic embryos at a high frequency in a carrot suspension culture. *Plant Physiol.* 79: 988-991.
- Nyman, L.P. and J. Arditti (1984) Effects of 2,3,5-triiodobenzoic acid on plantlet formation from cultured tissues of taro *Colocasia esculenta* (L.) Shott (Aracea). *Ann. Bot.* 54: 459-466.
- Obendorf, R.L. and S.H. Wettlaufer (1984) Precocious germination during *in vitro* growth of soybean seeds. *Plant Physiol.* 76: 1023-1028.
- Parrot, W.A., G. Dryden, S. Vogt, D.F. Hildebrand, G.B. Collins and E.G. Williams (1988) Optimization of somatic embryogenesis and embryo germination in soybean. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 24: 817-820.
- Peng, J. and T.K. Hodges (1989) Genetic analysis of plant regeneration in rice (*Oryza sativa* L.). *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 25: 91-94.
- Postma, P. W. and J. W. Lengeler (1985) Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system of bacteria. *Microbiol. Rev.* 49: 232-269.
- Preil, W. and A. Beck (1991) Somatic embryogenesis in bioreactor culture. *Acta Hort.* 289: 179-192.
- Pries, A., H. Priefert, N. Kruger and A. Steinbuchel (1991) Identification and characterization of two *Alcaligenes eutrophus* loci relevant to the poly ( $\beta$ - hydroxybutyric acid)- leaky phenotype which exhibit homology to *ptsH* and *ptsI* of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 173: 5843-5853.
- Rance, I.M., W. Tian, H. Mathews, A. de Kochko, R.N. Beachy and C. Fauquet (1994) Partial desiccation of mature embryo-derived calli, a simple treatment that dramatically enhances the regeneration ability of indica rice. *Plant Cell Rep.* 13: 647-651.
- Ranch, J.P., L. Oglesby and A.C. Zielinski (1985) Plant regeneration from embryo-derived tissue cultures of soybean. *In Vitro* 21: 653-658.
- Rao, P.V.L. (1992) Difference in somatic embryogenetic ability of cultured leaf explants of four genotypes of *Solanum melongena* L. *Agronomie*, 12: 469-475.
- Redenbaugh, K., B.D. Paach, J.W. Nicol, M.E. Kessler, P.R. Viss and K.A. Walker (1986) Somatic seeds; Encapsulation of as exual plant embryos. *Bio/technology* 4: 797-801.
- Reimann-Philipp, R., B. Zilm and H. Eresen (1959) Cytologische untersuchungen zur identifizierung der geschlechtschromosomen bei *Asparagus officinalis* L. in verbindung mit zuchtung rein mannlicher sorten. *Z. Pflanzenzuchtg.* 42: 295-304.
- Reinert, J. (1958) Morphogenese und ihre kontrolle an gewebeulturen aus karotten. *Naturwissenschaften* 45: 344-345.

- Restivo, F.M., T. Tassi, R. Biffi, A. Falavigna, E. Caporali, A. Carboni, M.L. Doldi, A. Spada and G.P. Marziani (1995) Linkage arrangement of RFLP loci in progenies from crosses between doubled haploid *Asparagus officinalis* L. clones. *Theor. Appl. Genet.* 90: 124-128.
- Reuther, G. (1977) Adventitious organ formation and somatic embryogenesis in callus of *Asparagus* and *Iris* and its possible application. *Acta Hort.* 78: 217-224.
- Reuther, G. (1983) *Asparagus*. In: D.A. Evans, W.A. Sharp, P.V. Ammirato, Y. Yamada (eds.) *Handbook of plant cell culture*, Vol. 2 Crop species. Macmillian Publishind Co., New York. pp 211-242.
- Rick, C.M. and G.C. Hanna (1943) Determination of sex in *Asparagus officinalis* L. *Amer. J. Bot.* 30: 711-714.
- Roberts, D.R., B.S. Flinn, D.T. Webb, F.B. Webster and B.C. Sutton (1990) Abscisic acid and indole-3-butyric acid regulation of maturation and accumulation of strage proteins in somatic embryos of interior spruce. *Physiol. Plant.* 78: 355-360.
- Roberts, D.R., W.R. Lazaroff and F.B. Webster (1991) Interaction between maturation and high relative humidity treatments and their effects on germination of Sitka spruce somatic embryos. *J. Plant Physiol.* 138: 1-6.
- Rosenberg, L.A. and R.W. Rinne (1986) Moisture loss as a prerequisite for seedling growth in soybean seeds (*Glycine max* L. Merr.). *J. Exp. Bot.* 37: 1663-1674.
- Royo, J., N. Nass, D.P. Matton, S. Okamoto, A.E. Clarke and E. Newbigin (1996) A retrotransposon-like sequence linked to the S-locus of *Nicotiana glauca* is expressed in styles in response to touch. *Mol. Gen. Genet.* 250: 180-188.
- Saier Jr., M. H. (1977) Bacterial phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase systems: structural, functional and evolutionary interrelationships. *Bacteriol. Rev.* 41: 856-871.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis and H. A. Erlich (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.
- 齊藤猛雄 (1990) 不定胚誘導法. 最新バイオテクノロジー全書 2. 野菜の組織・細胞培養と増殖. 農業図書. 東京. pp.287-299.
- Saito, T., M. Hirai and S. Nishimura (1996) Polypeptide profiles from somatic embryos and zygotic embryos of asparagus (*Asparagus officinalis* L.). *Plant Tissue Cult. Lett.* 13: 55-59.
- Saito, T. and S. Nishimura (1994) Improved culture conditions for somatic embryogenesis using an aseptic ventilative filter in eggplant (*Solanum melongena* L.). *Plant Sci.* 102: 205-211.
- 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.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2<sup>nd</sup> Ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Sato, S., Toya, R. Kawahara, R.F. Whittier, H. Fukuda and A. Komamine (1995) Isolation of a carrot gene expressed specifically during early-stage somatic embryogenesis. *Plant Mol. Biol.* 28: 39-46.
- 澤田博正・松本満夫・西村繁夫 (1990) カンショ ‘土佐紅’ における胚様体誘導とその増殖及び植物体再生. 高知園試研報. 5: 7-13.

- Schnierow, B. J., M. Yamada and M. H. Saier Jr. (1988) Partial nucleotide sequence of the *pts* operon in *Salmonella typhimurium*: comparative analysis on five bacterial genera. *Mol. Microbiol.* 3: 113-118.
- Senaratna, T., B.D. McKersie and S.R. Bowley (1989) Desiccation tolerance of alfalfa (*Medicago sativa* L.) somatic embryos, influence of abscisic acid, stress pretreatment and drying rates. *Plant Sci.* 65: 253-259.
- Sharp, W.R., M.R. Sondahl, L.S. Caldas and S.B. Maraffa (1980) The physiology of in vitro asexual embryogenesis. *Hort. Rev.* 2: 268-310.
- Shigeta, J., K. Sato, S. Tanaka, M. Nakayama and M. Mii (1996) Efficient plant regeneration of asparagus by inducing normal roots from in vitro multiplied shoot explants using gellan gum and glucose. *Plant Sci.* 113: 99-104.
- Shoemaker, R.C., S.E. Christofferson and D.W. Galbraith (1987) Storage protein accumulation patterns in somatic embryos of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant Cell Rep.* 6: 12-15.
- Smyth, D.R., P. Kalitsis, J.L. Joseph and J.W. SENTRY (1989) Plant retrotransposon from *Lilium henryi* is related to *Ty3* of yeast and the *gypsy* group of *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86: 5015-5019.
- Sneep, J. (1953a) The significance of andromonoecy for the breeding of *Asparagus officinalis*. *Euphytica* 2: 89-95.
- Sneep, J. (1953b) The significance of andromonoecy for the breeding of *Asparagus officinalis*. *Euphytica* 2: 224-228.
- Steward, F.C., M.O. Mapes and K. Mears (1958) Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures grown from freely suspended cells. *Am. J. Bot.* 45: 705-708.
- Steward, F.C. and M.O. Mapes (1971) Morphogenesis and plant propagation in aseptic cultures of asparagus. *Bot. Gaz.* 132: 70-79.
- Stirn, S. and H.J. Jacobsen (1987) Marker proteins for embryogenic differentiation patterns in pea callus. *Plant Cell Rep.* 6: 50-54.
- Street, H.E. and L.A. Withers (1974) "Tissue Culture and Plant Science 1974" Academic Press. New York. pp.71.
- Stuart, D.A., J. Nelsen and J.W. Nicol (1988) Expression of 7S and 11S alfalfa seed proteins in somatic embryos. *J. Plant Physiol.* 132: 134-139.
- Sung, Z.R. and R. Okimoto (1981) Embryogenic proteins in somatic embryos of carrot. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 78: 3683-3687.
- 田部井豊・山田朋宏・萱野暁明・尾崎武司・西尾剛 (1996) ジゴキシゲニン(DIG)を利用した高感度 RAPD 法：品種識別への応用。育雑 46: 307-308.
- Takeishi, K. and O. Gotoh (1982) Computer analysis of the sequence relationships among 4.5S RNA molecular species from various sources. *J. Biochem.* 92: 1173-1177.
- Tisserat, B. and T. Murashige (1977) Effects of ethephon, ethylene, and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on asexual embryogenesis in vitro. *Plant Physiol.* 60: 437-439.

- Tomes, D.T. (1985) Cell culture, somatic embryogenesis and plant regeneration in maize, rice, sorghum and millet. In: Cereal Tissue and Cell Culture. Bright, S.M.J. and M.G.K. Jones (eds.). Martinus Nijhoff/Junk, Amsterdam, pp. 175-203.
- Trolinder, N.L. and J.R. Goodin (1988) Somatic embryogenesis in cotton (*Gossypium*). II. Requirements for embryo development and plant regeneration. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 12: 43-53.
- Tsukahara, M. and T. Hirosawa (1992) Simple dehydration treatment promotes plantlet regeneration of rice (*Oryza sativa* L.) callus. *Plant Cell Rep.* 11: 550-553.
- Ulrich, T.U., E.S. Wurtele and B.J. Nikolau (1990) Sequence of EMB-1, and mRNA accumulating specifically in embryos of carrot. *Nucl. Acids Res.* 18: 2826.
- 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経路による植物体再分化. 北海道農試研報. 154: 103-109.
- 浦上敦子・永井信・吉川宏昭 (1995) アスパラガス品種・系統の早期検定について. 園学雑. 63: 767-772.
- Vakhitov, V. A., F. R. Gimalov and G. P. Shumyatsky (1989) Nucleotide sequence of 5S rRNA genes of polyploid wheat and *Aegilops* species. *Mol. Biol.* 23: 431-440.
- van der Knaap, E. and H. Kende (1995) Identification of a gibberellin-induced gene in deepwater rice using differential display of mRNA. *Plant Mol. Biol.* 28: 589-592.
- Vasil, I.K. (1987) Developing cell and tissue culture systems for the improvement of cereal and grass crops. *J. Plant Physiol.* 128: 193-218.
- Vasil, V. and I.K. Vasil (1981) Somatic embryogenesis and plant regeneration from suspension culture of pearl millet (*Pennisetum americanum*). *Ann. Bot.* 47: 669-678.
- von Arnold, S. and I. Hakman (1988) Regulation of somatic embryo development in *Picea abies* by abscisic acid (ABA). *J. Plant Physiol.* 132: 164-169.
- Voytas, D.F., M.P. Cummings, A. Konieczny, F.M. Ausubel and S.R. Rodermel (1992) *copia*-like retrotransposons are ubiquitous among plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 7124-7128.
- Walker, K.A. and S.J. Sato, (1981) Morphogenesis in callus tissue of *Medicago sativa*: the role of ammonium ion in somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 1:109-121.
- Welsh, J., C. Petersen and M. McClelland (1991) Polymorphisms generated by arbitrarily primed PCR in the mouse: application to strain identification and genetic mapping. *Nucleic Acids Res.* 19: 303-306.
- Wenck, A.R. (1988) Inhibition of somatic embryogenesis in orchardgrass by endogenous cytokinin. *Plant Physiol.* 88: 990-992.
- Whetherell, D.F. (1984) Enhanced adventive embryogenesis resulting from plasmolysis of cultured wild carrot cells. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 3: 221-227.
- Wilde, H.D., W.S. Nelson, H. Booji, S.C. de Vries and T.L. Thomas (1988) Gene expression programs in embryogenic and non-embryogenic carrot cultures. *Planta* 176: 205-211.



- Wilkinson, J.Q., M.B. Lanahan, T.W. Conner and H.J. Klee (1995) Identification of mRNAs with enhanced expression in ripening strawberry fruit using polymerase chain reaction differential display. *Plant Mol. Biol.* 27: 1097-1108.
- Williams, E.G. and G. Maheswaran (1986) Somatic embryogenesis: Factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. *Ann. Bot.* 57: 443-462.
- Wilmar, C. and M. Hellendoorn (1968) Growth and morphogenesis of *Asparagus* cells cultured in vitro. *Nature* 217: 369-370.
- Woese, C. R., K. R. Luehrsen, C. D. Pribula and G. E. Fox (1976) Sequence characterization of 5S ribosomal RNA from eight gram- positive procaryotes. *J. Mol. Evol.* 8: 143-153.
- Wolyn, D.J. and X. Feng (1993) Genotype, temperature, and sampling date affect embryogenesis in asparagus anther culture. *HortScience* 28: 216-217.
- Wu, L. F., J. M. Tomichi and M. H. Saier Jr. (1990) Structure and evolution of a multidomain multiphosphoryl transfer protein. Nucleotide sequence of the *fruB (HI)* gene in *Rhodobacter capsulatus* and comparisons with homologous genes from other organisms. *J. Mol. Biol.* 213: 687-703.
- Wurtele, E.S., H. Wang, S. Durgerian, B.J. Nikolau and T.H. Ulrich (1993) Characterization of a gene that is expressed early in somatic embryogenesis of *Daucus carota*. *Plant Physiol.* 102: 303-312.
- Xiong, Y. and T.H. Eickbush (1990) Origin and evolution of retroelements based upon their reverse transcriptase sequences. *EMBO J.* 9: 3353-3362.
- 八鍬利郎・原田隆・稲垣昇・志賀義彦 (1972) 園芸作物のやく培養に関する研究 (第1報) アスパラガスのやく培養におけるカルスの誘導と器官分化. *園学雑.* 41: 272-280.
- 八鍬利郎・原田隆・嵯峨紘一・志賀義彦 (1971a) アスパラガスの形態形成に関する研究 (第1報) 組織培養法による若茎柔組織からのカルス形成. *園学雑.* 40: 230-236.
- 八鍬利郎・原田隆・嵯峨紘一・志賀義彦 (1971b) アスパラガスの形態形成に関する研究 (第2報) カルス形成および器官分化におよぼす auxin および 6-benzyladenin の影響. *園学雑.* 40: 348-353.
- Yamada, T., H. Nakagawa and Y. Sinoto (1967) Studies on the differentiation in cultured cells. I. Embryogenesis in three strains of *Solanum* callus. *Bot. Gaz. Tokyo* 80: 68-74.
- Yang, H.J. (1977) Tissue culture technique developed for asparagus propagation. *HortScience* 12: 140-141.
- Yang, H.J. and W.J. Clore (1973) Induction of aerial crowns in *Asparagus officinalis* L., by kinetin-IAA treatment. *HortSci.* 8: 490-491.
- Yang, H.J. and W.J. Clore (1974a) Development of complete plantlets from moderately vigorous shoots plants of asparagus in vitro. *HortScience* 9: 138-140.
- Yang, H.J. and W.J. Clore (1974b) Improving the survival of aseptically cultured asparagus plants in transplanting. *HortScience* 9: 235-236.
- Yang, H.J. and W.J. Clore (1975) In vitro reproductiveness of asparagus stem segments with branch-shoots at a node. *HortScience* 10: 411-412.
- Zeevaart, J.A.D. (1980) Changes in the levels of abscisic acid and its metabolites in excised leaf blades of *Xanthium strumarium* during and after water stress. *Plant Physiol.* 66: 672-678.

- Zimmerman, J.L. (1993) Somatic embryogenesis: A model for early development in higher plants. *Plant Cell* 5: 1411-1423.
- Zimmerman, T.W. and B.G. Cobb (1989) Vitrification and soluble carbohydrate levels in *Petunia* leaves as influenced by media Gelrite and sucrose concentrations. *Plant Cell Rep.* 8:358-360.
- Ziv, M., G. Meir and A.H. Halevy (1983) Factors influencing the production of hardened glaucous carnation plantlets in vitro. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 2: 55-65.