

ニンニクのカルス形成に及ぼす植物生長調節物質 並びに低温の影響

工藤 りか*・藤目 幸擴・小松 良江・深田 典子・網本 邦広¹

Effects of plant growth regulators and cold pre-storage of bulb on callus formation of garlic.

Rika KUDOU*, Yukihiro FUJIME, Yoshie KOMATSU, Noriko FUKADA and Kunihiko AMIMOTO¹

Summary

The effects of sampling positions, plant growth regulators in the medium and cold pre-storage of bulbs on callus formation *in vitro* of garlic plant, *Allium sativum* L. were investigated.

In conclusion, shoot tips, basal plates and lower parts of foliage leaf were suitable for callus formation. Cold pre-storage of bulbs was effective on shoot formation rather than callus formation in the plots with NAA or NAA and BA. When shoot tips were cultured in the plots with 1 ~ 5 ppm 2, 4-D, cream yellow callus formation were promoted. When shoot tips were cultured in the plots with 1 ~ 5 ppm NAA, green callus formation were promoted.

Key words : garlic, callus formation, *in vitro*, sampling positions, plant growth regulators

緒 言

ニンニクの無病苗の育成には、茎頂培養により1個の小鱗茎の頂端分裂組織から1本の無病苗を育成する方法が調べられている⁽¹⁾。しかし、この方法では増殖効率が非常に悪いため、カルス組織から不定芽⁽³⁾あるいは不定胚⁽⁴⁾を誘導し1個の小鱗茎からいかに大量の無病苗を効率良く作出するかが重要となる。

ニンニクのカルス形成に関して、大澤ら⁽⁷⁾、小田ら⁽⁸⁾は小鱗茎の頂端分裂組織以外の外植体からカルスを誘導し小植物体を獲得したと報告している。また、薛ら⁽¹⁰⁾はembryogenic callusからの不定胚誘導と植物体再生を報告している。

一般に不定胚は、embryogenic callusと呼ばれる分裂活性および分化能力の高いカルスから誘導される。しかし、embryogenic callusの定義は植物によって様々であり、ニンニクについてはまだ明らかではない。

そこで本実験では、ニンニクの不定芽並びに不定胚誘導に適したカルスの形成条件を検討するため、供試部位の影響、培地に添加する植物生長調節物質の影響及び供試材料として用いる小鱗茎の

組織培養によるニンニクの優良系統の育成と増殖 (V)

¹ (株)四国総合研究所 761-01 高松市屋島西町2109番地

Shikoku Research Inst. Inc.

2109 Yashima-nishimachi Takamatsu 761-01

低温処理の影響を調査した。

材料及び方法

実験1 カルス形成に及ぼす供試部位の影響

供試材料には収穫後5℃の冷蔵庫で1年間貯蔵した‘平戸’，6ヵ月間貯蔵した‘太倉’，中国在来系統の‘C-1’及び‘C-2’を用いた。また，‘C-1’と‘C-2’の珠芽については，培養直前に圃場で採取したものを用いた。

供試部位として，‘平戸’と‘太倉’の5部位（小鱗茎の茎頂部，底盤部，普通葉の下部，中部，上部）と，‘C-1’と‘C-2’の2部位（珠芽，小鱗茎の茎頂部）を用いた⁽⁵⁾。

植物生長調節物質については，ナフタレン酢酸（NAA）とベンジルアデニン（BA）をそれぞれ0，1，2 ppmの濃度で組み合わせて添加し第1表に示した9処理区を設けた。

Table 1 Combinations of plant growth regulators in the media. (Exp. 1)

Plot	BA (ppm)	NAA (ppm)
A	0	0
B	0	1
C	0	2
D	1	0
E	1	1
F	1	2
G	2	0
H	2	1
I	2	2

置床組織の大きさは，茎頂部では葉原基2枚を含む直径0.1～0.2mm，他の供試部位ではすべて0.3×0.3×0.1cmとした。培養期間は100日とし，継代培養は培養70日後に行った。‘C-1’と‘C-2’については，0，1，2 ppmNAAと0，1 ppmBAの濃度で組み合わせた6処理区の培地に置床した。各処理区には1区当たり10試験管を用い，1試験管当たり1外植体を置床した。

実験2 カルス形成に及ぼす低温処理及び植物生長調節物質の影響

供試材料には，収穫後乾燥のみ（無処理区），収穫後乾燥させ5℃の冷蔵庫で1ヵ月間貯蔵（1ヵ月間貯蔵区），及び2ヵ月間貯蔵（2ヵ月間貯蔵区）した‘太倉’の小鱗茎の茎頂部を用いた。

植物生長調節物質については，NAA，2，4-ジクロロフェノキシ酢酸（2，4-D）とBAをそれぞれ0，5，10ppmの濃度で組み合わせて添加し第2表に示した10処理区を設けた。

Table 2 Combinations of plant growth regulators in the media. (Exp. 2)

Plot	BA (ppm)	2,4-D (ppm)	NAA (ppm)
I	0	0	5
II	5	0	5
III	0	5	0
IV	5	5	0
V	5	0	0
VI	0	0	10
VII	10	0	10
VIII	0	10	0
IX	10	10	0
X	10	0	0

置床組織の大きさは、茎頂部は葉原基2枚を含む直径0.1～0.2mmとした。培養期間は100日とし、継代培養は培養70日後に行った。各処理区には1区当たり15試験管を用い、1試験管当たり1外植体を置床した。

実験3 カルス形成に及ぼす植物生長調節物質の影響

供試材料には、収穫後5℃の冷蔵庫で1年間貯蔵した‘太倉’の茎頂部を用いた。

植物生長調節物質については、NAA、2, 4-DとBAをそれぞれ0, 0.1, 1, 2, 5 ppmの濃度で組み合わせて添加し第3表に示した21処理区を設けた。

Table 3 Combinations of plant growth regulators in the media. (Exp. 3)

Plot	BA (ppm)	NAA (ppm)	2,4-D (ppm)
a	0	0	0
b	0	1	0
c	1	1	0
d	2	2	0
e	1	5	0
f	2	5	0
g	1	10	0
h	2	10	0
i	0	0	0.1
j	0	0	1
k	1	0	1
l	2	0	1
m	0	0	2
n	1	0	2
o	2	0	2
p	0	0	5
q	1	0	5
r	2	0	5
s	0	0	10
t	1	0	10
u	2	0	10

置床組織の大きさは、茎頂部は葉原基2枚を含む直径0.1～0.2mmとした。培養期間は100日とし、継代培養は培養70日後に行った。各処理区には1区当たり15試験管を用い、1試験管当たり1外植体を置床した。

実験1～3においては基本培地として、Murashige and Skoog (MS) 培地 (1962) の基本組成に、サッカロース3%, 寒天0.9% (実験1) もしくはゲルライト0.1% (実験2, 実験3) を加え、pHを5.7～5.8に調整して用いた。培地量は、試験管 (25×150mm) あたり10mlずつを分注した。

培養条件については、ファイトロン内の人工照明室において23℃・16時間日長とし人工照明には植物育成用蛍光灯を用い、置床した組織の位置の照度は2,500lxであった。また、必要に応じて同一条件のグロースキャビネットを用いた。

鱗茎を小鱗茎に分けて保護葉を取り去った後、70%エチルアルコールで5分間、7.5%次亜塩素酸ナトリウムで3分間殺菌し、滅菌水で3回洗浄し培養に用いた。

結 果

実験1 カルス形成に及ぼす供試部位の影響

小鱗茎を供試材料に用いた場合、すべての品種についてほぼ同様の傾向が認められたので、以下には‘太倉’の結果について示した。

全供試部位について、カルス形成はNAAが1～2 ppm添加された処理区で認められた。1～2

ppmのNAAと1~2 ppmのBAを組み合わせる添加した場合、カルス形成率は80~100%を示したが、1~2 ppmのBAを単独で添加した場合はカルス形成率は低くなった。また、植物生長調節物質を添加しなかった処理区では、カルス形成率は低くなった。

茎頂部では、植物生長調節物質を添加しなかった処理区及び1 ppmのBAを単独で添加した処理区ではカルスは形成されなかった。底盤部及び普通葉下部は、他の供試部位に較べるとカルス形成率は高くなった。茎頂部、底盤部、普通葉下部においては、植物生長調節物質の添加によってシュートの形成も促進されたためカルスの量的な増加は認められなかった。また、普通葉は上部になるほど器官形成率は低くなり、普通葉中部、上部についても、カルスの形成は認められたが、量的な増加は認められなかった (Table 4)。

Table 4 Effects of sampling positions and plant growth regulators on shoot and callus formation. (Exp. 1)

Plot	ST ^z		BP ^z		LPF ^z		MPF ^z		UPF ^z	
	SF ^y	CF ^x	SF	CF	SF	CF	SF	CF	SF	CF
A	100	0	25	85	10	10	0	0	0	0
B	100	100	0	100	40	90	0	100	0	100
C	100	90	10	100	20	100	0	100	0	100
D	100	0	30	100	60	90	10	100	0	0
E	100	100	60	100	80	100	10	100	0	100
F	100	80	10	100	80	100	11	80	10	90
G	100	70	60	100	100	100	0	0	0	0
H	100	100	10	100	100	100	30	100	0	100
I	100	100	67	100	100	100	30	100	40	100

('Taiso', 70 days after explanting)

^z : ST: Shoot tip BP: Basal plate

LPF, MPF, UPF: Lower, middle or upper part of foliage leaf

^y : (Total number of explants with shoots / number of explants cultured) × 100 (%)

^x : (Total number of explants with callus / number of explants cultured.) × 100 (%)

中国在来系統の 'C-1' 及び 'C-2' の珠芽の茎頂部を置床した場合は処理区に対する傾向が異なり、'C-1' では1~2 ppmのNAAと1 ppmのBAを組み合わせる添加した処理区でカルス形成率は33~80%を示し、'C-2' では2 ppmのNAAを単独で添加した処理区で10%、2 ppmのNAAと1 ppmのBAを組み合わせる添加した処理区で20%だった (データ省略)。

実験2 カルス形成に及ぼす低温処理および植物生長調節物質の影響

小鱗茎の低温処理の影響については、5 ppm, 10ppmのNAAを単独で、または5 ppm, 10ppmのNAAとBAを組み合わせる添加した培地において認められた。つまり、無処理区ではこれらの培地においてカルス形成は認められたが、形成率は2, 4-D添加培地よりも低かった。1ヵ月間貯蔵区においては、カルス形成とシュート形成が認められ、2ヵ月間貯蔵区ではNAA 5 ppmの添加培地でシュート形成しか認められなかった。

無処理区、1ヵ月間貯蔵区、2ヵ月間貯蔵区について、植物生長調節物質に対するカルス形成の傾向が認められた。5 ppm, 10ppmの2, 4-Dを単独で添加、または5 ppm, 10ppmの2, 4-DとBAを組み合わせる添加した処理区で、黄白色をしたカルスの形成が促進された。5 ppm, 10ppmのNAAを単独で添加、または5 ppm, 10ppmのNAAとBAを組み合わせる添加した処理区では、緑色または緑白色カルスの形成が認められた。また、5 ppm, 10ppmのBAを単独で添加した処理区ではカルスの形成は認められず、シュートの形成が認められた (Fig. 1, 2)。

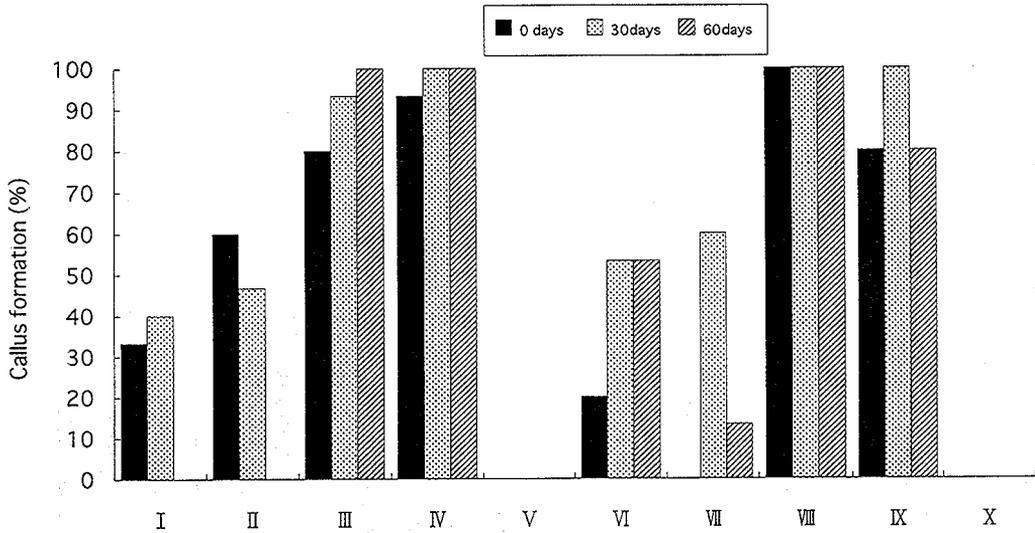


Fig. 1 Effects of cold pre-storage of bulb and plant growth regulator in the media on callus formation.

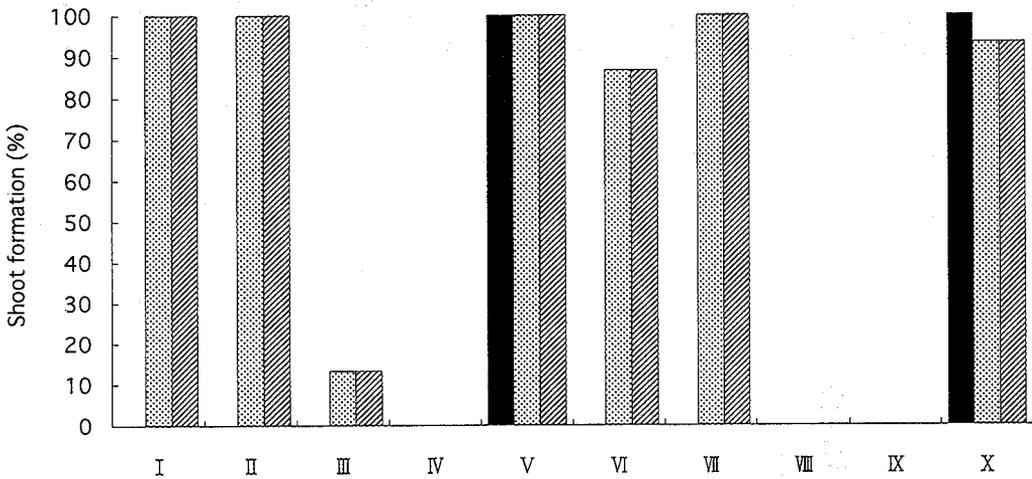


Fig. 2 Effects of cold pre-storage of bulb and plant growth regulators in the media on shoot formation.

また、本実験で形成されたシュートは、植物生長調節物質の添加濃度が高濃度であったために、莖葉が肥大し奇形葉となった。

実験3 カルス形成に及ぼす植物生長調節物質の影響

NAAとBAを添加したa, b, c, d, e, f区ではシュートが形成され、その基部に緑色のカルスが形成された。緑色のカルスは1~5 ppmのNAAと1~2 ppmのBAを添加したc, d, e区で増加が促進された。

1~5 ppmの2, 4-Dを添加したj, k, l, m, n, o, p, q, r区で黄白色のカルスの

形成が促進され、特に1～2 ppmのBAを組み合わせて添加した l, n, o でカルスの増加が促進された。

10ppmの2, 4-Dを添加した s, t, u 区では、完全にカルス化はするものの高濃度であるために組織が褐変するなどカルスの増加がやや抑制された (Fig. 3, 4)。

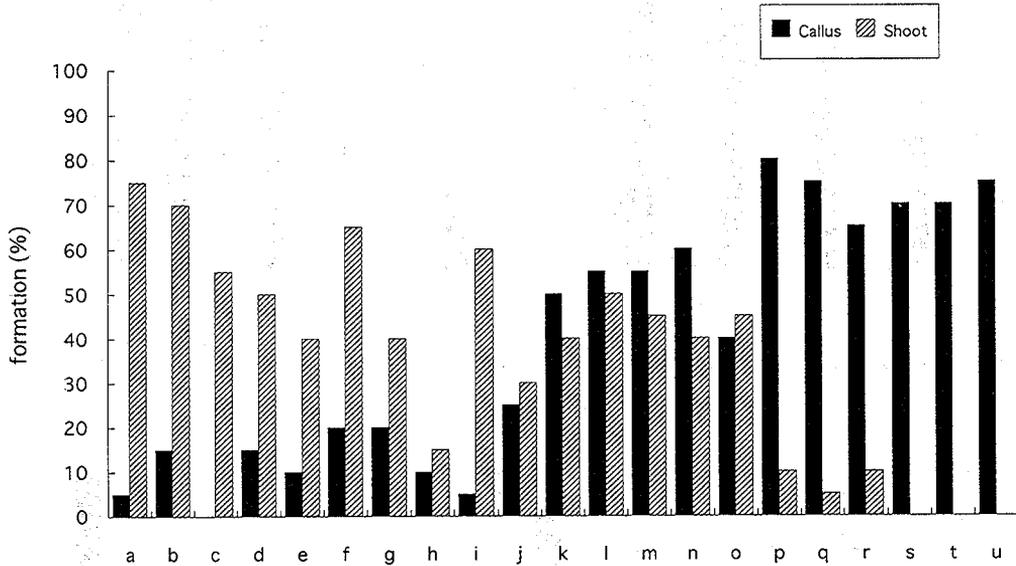


Fig. 3 Effects of plant growth regulators on organ formation (50 days after planting).

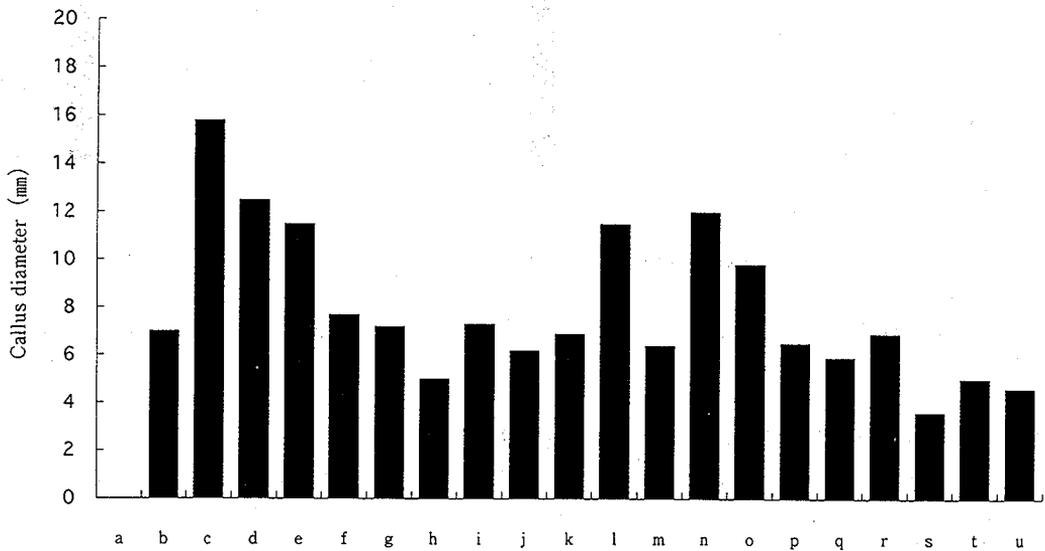


Fig. 4 Callus diameter 50 days after planting.

考 察

ニンニクのカルス形成に適した供試部位に関して、薛ら⁽¹⁰⁾は側球の底盤および花床部から embryogenic callus の誘導が認められたと報告している。大澤ら⁽⁷⁾は茎頂組織と普通葉中下部組織を用いて、 10^{-5} MのBAと 10^{-6} ~ 10^{-5} MのNAA共存培地においてカルス形成を促進させたと報告している。実験1においても、1~2 ppmのNAAを単独で添加した処理区、または1~2 ppmのNAAと1~2 ppmのBAを組み合わせる添加した処理区において、茎頂部、底盤部、普通葉下部でカルス形成は促進され、特に底盤部ではカルス形成率が高くなった。しかし、これらの供試部位ではシュート形成が旺盛なためカルスの量的な増加は認められなかった。また、普通葉は上部になるほどカルス形成率は低くなった。これは、上部になるほど組織の活性が低くなるためにカルス形成が抑制されたと考えられた。これらの結果から、茎頂部、底盤部、普通葉下部はカルス形成に適した供試部位であると考えられた。

小鱗茎の低温処理の効果はカルスの形成には顕著に認められず、NAAとBAを添加した処理区においてシュート形成を促進した。前報⁽²⁾および高樹⁽⁸⁾の報告においても低温刺激により試験管内のシュートが形成されその基部が肥大して球形が促進されることから、ニンニクは *in vitro* において低温処理によりカルス形成よりもシュート形成が促進されると考えられた。

また、カルスの形成に適した植物生長調節物質の添加濃度については、1~5 ppmの2, 4-Dは黄白色のカルスの形成を、1~5 ppmのNAAは緑色のカルスの形成を促進すると考えられた。薛ら⁽⁹⁾は花床部からのカルスの誘導にBAは阻害的に働くと報告しているが、本実験では1~2 ppmのBAを組み合わせる添加することでカルスの量的な増加は促進された。

カルス形成に及ぼす植物生長調節物質の影響については、2, 4-Dの添加によりカルスの形成が促進されたとの報告がある⁽²⁾⁽⁵⁾⁽⁷⁾。また薛ら⁽⁹⁾は、ニンニクの花床部組織を用いた場合、 $1\ \mu$ Mおよび $10\ \mu$ MのNAAの単独添加によりまず緑色の塊状カルスが形成され、その表面または花床部から直接乳白色で粒状のembryogenic callusが形成されたと報告している。本実験においても、NAAの単独添加またはBAとNAAを組み合わせる添加した処理区で、緑色または緑白色をしたカルスの形成が認められ、また2, 4-Dの単独添加またはBAと2, 4-Dを組み合わせる添加した処理区では黄白色のカルスの形成が認められた。しかしembryogenic callusの形成とそこからの不定胚誘導条件については今後明らかにする必要がある。

摘 要

不定胚誘導によるニンニクの無病苗の大量増殖を目的として、カルスの形成に適した供試部位、小鱗茎の低温処理と培地に添加する植物生長調節物質の影響を調査した。

本実験の結果より、ニンニクのカルス形成に適した供試部位は茎頂部、底盤部、普通葉下部であることが明らかとなった。小鱗茎の低温処理の影響は、NAAとBAを添加した処理区においてカルスの形成よりもシュート形成を促進した。カルスの形成に適した植物生長調節物質の添加条件については、1~5 ppmの2, 4-Dは黄白色のカルスの形成を、1~5 ppmのNAAは緑色のカルスの形成を促進し、BAを組み合わせる添加することでカルスの量的な増加は促進されると考えられた。

引用文献

- (1) BHOJHANI, S. S. : *In vitro* propagation of garlic by shoot proliferation. *Sci. Hort.* 13, 47-52 (1980).
- (2) DOLEZEL, J., F. J. NOVAK and L. HAVEL : Cytogenetics of garlic (*Allium sativum* L.) *in vitro* culture. *Nucl. Tech. Vitro. Cult. Plant Improv.* 11-19 (1986).
- (3) 藤目幸擴, 工藤りか, 奥田延幸 : ニンニクの *in vitro* 培養でのシュート並びに小球形成. *植物組織培養*, 10(1), 9-16 (1993).
- (4) FUJIME, Y., KUDOU, R., and ONO, M. M. : Effects of rotation rate in orbital shaking culture on embryoid formation of garlic. *Acta Horticulture.* 358, 199-203 (1994).
- (5) 工藤りか, 藤目幸擴, 網本邦広. : ニンニクの器官形成に及ぼす植物生長調節物質並びに供試部位の影響. *香大農学報*, 47(1), 15-22 (1995).
- (6) KUGINUKI, Y., S. NISHIMURA and N. ODA. : Effects of hormon concentration and parts of a bulb on regeneration of garlic callus. *Jpan. J. Breed.* 39: 26-28 (1989).
- (7) 大澤勝次, 栗山尚志, 菅原祐幸 : 組織培養による栄養繁殖野菜の大量増殖と利用に関する研究 I 植物体の大量誘導に及ぼす培養部位及び培地組成の影響. *野菜試験場報告A*, 9, 1-46 (1981).
- (8) 小田義信, 西村繁夫 : ニンニクカルスからの個体再分化. *育学雑*, 38(別2), 76-77 (1988).
- (9) 高樹英明 : ニンニクの芽の組織培養における栄養分, 生長調節物質及び温度の影響. *山形大紀要農学*, 11(1), 187-200 (1990).
- (10) 薛 恵民, 荒木肇, 八嶽利郎, 石 嶺 : ニンニクの底盤と花床部由来カルスにおける不定胚の形成と植物体再生. *園学雑*, 60(3), 627-634 (1991).

(1995年5月31日受理)