一般報文

植物組織培養，8(3)，166-170 (1991)

ニンニクにおけるembryogenic callus形成と植物体再生の品種間差異

薛　恵民・荒木　肇*・八鍬利郎

北海道大学農学部
(〒060　札幌市北区北9条西9丁目)
*現在：新潟大学農学部附属農場
(〒959-17　新潟県中蒲原郡村松町)

(1991年4月3日受付)
(1991年6月28日受理)

ニンニク (*Allium sativum* L.) のembryogenic callus誘導には供試部位により形成率及び生長が異なり，底盤部組織はその誘導に最も適しており，2, 4-D 1 μM, *p*-CPA 10 μM, カイネチン 1 μM を添加したAZ培地でembryogenic callusが誘導された．Embryogenic callusの再分化能は経時的な消長を示し，培養期間が長期になるに従い，分化能が低下した．8品種・系統を用いembryogenic callus形成と個体再生に関して検討したところ品種間差異が認められたが，カルスの形成能と再分化能との間には必ずしも一定の関係を見いだすことができなかった．北海道在来種‘FB’系統と‘ホワイト’の2品種・系統はembryogenic callusの形成能と再分化能がいずれも高く，優良な培養系が作出された．Embryogenic callusをNAA 1 μMとBA 5 μMを添加したMS培地に移植することによりシュートが再生した．再生したシュートを植物生長調節物質無添加のMS培地に移植すると容易に発根し，鉢上げしたところりん茎を形成した．

1. 緒　言

ニンニク (*Allium sativum* L.) は香辛，滋養強壮野菜として多く利用されており，その需要は近年急速に伸びているが，多くの産地でウイルス病による品質の低下や減収が指摘されている．また，ニンニクは1球当り6～10個の鱗片しか形成せず，増殖率が低いことが栽培上の問題となっている[1]．従って組織培養を利用したニンニクの大量増殖は注目されており，これまでに茎頂培養[2~8]，カルス培養[9~14]，苗条原基法[1,15]などが報告されている．筆者らは珠芽と鱗茎の底盤部及び花床部から誘導した培養細胞内に不定胚発生を組織学的に確認し，これらから植物体の再生を観察した[16]．ニンニクは熱帯地域から寒地まで広く分布しており，その品種特性は極めて多様であるため[17]，組織培養に対しても反応が異なると推察されるが，この点についての研究は少ない．本研究では筆者らが確立した手法をもとにembryogenic callus誘導と供試部位の関係，再分化に及ぼすembryogenic callusの培養期間の影響及びembryogenic callus形成，個体再生能の品種間差異の検討を行った．

2. 材料及び方法

富良野市より分譲を受けた北海道在来種‘FB’系統を北海道大学附属農場で栽培し，収穫後約1か月間室温で貯蔵した鱗茎を材料とした．70％エチルアルコールと次亜塩素酸ナトリウム（有効塩素1％，Tween 20を2滴添加）により殺菌し，**Fig. 1**に示した4種類の組織片を摘出した．即ち，茎頂を含んだ約3 mm角の底盤部 (a)，1/2の大きさの茎頂を含んだ底盤部 (b)，2 mm角の底盤部組織 (c)，側球の貯蔵葉の3 mm角の肉質部 (d) を供試した．これらの組織片を後述するembryogenic callus誘導培地に置床して，80日間培養して embryogenic callus形成に及ぼす採取部位の影響を調査した．続いて茎頂を含んだ底盤部より誘導したembryogenic callusを培養開始後96日，145日及び159日目に，個体再生培地に移植してembryogenic callusの再分化能に及ぼす培養期間の影響を調査した．品種間差異の検討については，1980年ウルグアイから導入した‘UA’，‘UB’，‘UC’の3系統，北海道在来種の‘FA’，‘FB’，FC’の3系統及び‘ホワイト’，‘壱州早生’の2品

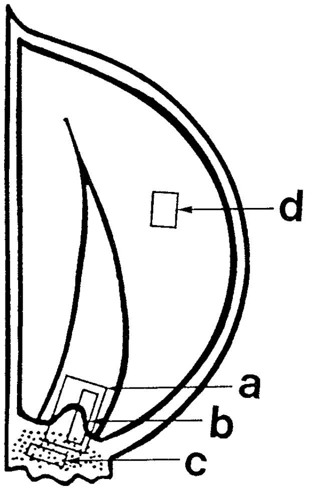

Fig. 1 Illustration of explant sources. Basal plate with shoot apex (a), basal plate with half size-shoot apex (b), basal plate (c) and storage leaf (d) were used.

種の合計8品種・系統の収穫後約4か月間貯蔵した鱗茎の茎頂を含んだ底盤部を用いた．これらをembryogenic callus誘導培地でカルスを誘導し，80日後に再分化培地に移植してembryogenic callus形成と再分化に関する品種間差異を検討した．なお，embryogenic callus誘導培地はAZ培地[18]を基本として2, 4-D 1 μM, *p*-chlorophenoxyaceticacid (*p*-CPA) 10 μM及びカイネチン1 μMを添加した固形培地で，再分化にはMS培地を基本とし，NAA 1 μMとBA 5 μMが添加された固形培地を用いた[16]．培地はpHを5.8に調整し，ジェランガム2 g/*l*を添加して固化させ，培養は25°C, 4,000 lx, 16時間日長下で行った．

3. 結　果

(1) Embryogenic callus形成に及ぼす採取部位の影響

Table 1に示したように，茎頂を含んだ底盤部(a)ではembryogenic callusの形成率は65.0%であり，形成されたカルスもアズキ大であったのに対し，底盤部組織(c)ではembryogenic callus形成率が87.5%と最も高く，カルスもソラマメ大に発育した．1/2の大きさの茎頂を含んだ底盤部(b)ではカルス形成率及び大きさは前述の2種の組織片の中間であった．また，塊状カルス(non-embryogenic callus)の形成はa, b, cの順で減少し，Embryogenic callus形成と相反する傾向を示した．貯蔵葉の肉質部(d)からはカルスの形成が認められなかった．シュート形成は茎頂が存在する組織片で多く認められ，茎頂を取り除いた組織片では少なかった．

(2) Embryogenic callusの再分化能の経時的変化

カルス誘導培地において一部に異常な形状の葉の分化も認められたが，96日間培養したカルスでは再分化能を保ち，正常なシュートの再分化率は75.9%と高かった(**Table 2**)．カルス誘導培地での培養日数が長くなるに従い，再分化能が低下し，145日及び159日間培養したカルスからはそれぞれ58.3%, 18.3%のシュート分

Table 1. Effect of explant source on embryogenic callus induction.

Mark	Explants	No. of explants cultured	No. of calli induced		No. of shoots formed
			Embryogenic (%)	Non-embryogenic	
a	Basal plate with shoot apex	20	13 (65.0)	5	18
b	Basal plate with half size-shoot apex	16	12 (75.0)	3	15
c	Basal plate	16	14 (87.5)	2	5
d	Storage leaf	19	0 (0.0)	0	0

Table 2. Effect of the culture period on shoot formation^{z}.

Culture period (days)	No. of calli transferred	No. of calli with shoot formation	
		shoot (%)	deform leaves (%)
96	108	82 (75.9)	22 (20.4)
145	24	14 (58.3)	3 (12.5)
159	60	11 (18.3)	3 (5.0)

^{z} Data were scored 2 months of culture after transferring to the differentiation medium.

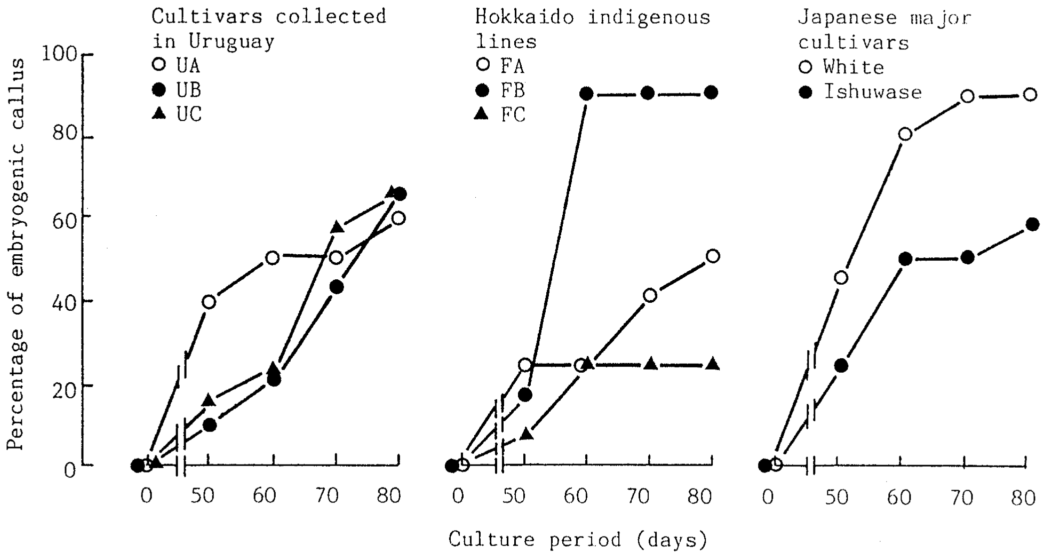

Fig. 2 Time course of changes in formation of embryogenic callus in different cultivars and lines.

化率となった.

(3) Embryogenic callus 形成の品種間差異

Embryogenic callus の形成には品種間差異が認められ，培養 80 日後で形成率は 'FB' と 'ホワイト' の 2 品種・系統が約 90% と最も高く，'UA', 'UB', UC', '壱州早生' 及び 'FA' の 5 品種・系統では 50～70% であり，'FC' では 20% と最も低かった (**Fig. 2**). またカルスの形成速度にも差異が認められた. 即ち，培養 50 日目で多くの品種・系統は 10～20% の形成率であったが，'UA' と '壱州早生' はその時点ですでに 40% 以上の形成率を示した. どの品種・系統も 80 日目まで徐々に形成率が高まったが，'FB' は培養 50～60 日目に形成率が高まり，その後の形成はみられなかった. また embryogenic callus の生長は培養 80 日にかけて持続的に進行したが，その生長にも品種・系統間で差異が認められた. 即ち，カルス形成率の良好であった 'FB' と 'ホワイト' がソラマメ大以上に発育したのに対し，'UC' と 'FC' は発育が極めて不良で，他はアズキ大からダイズ大程度であった.

(4) 個体再生における品種間差異

Embryogenic callus からのシュートの形成には 8 品種・系統間で差異が認められ，'FA', 'FB', 'ホワイト' 及び '壱州早生' の 4 品種・系統ではシュート形成率がいずれも 80% 以上と高く，特に 'FA' と 'ホワイト' は 100% に達した (**Table 3**). 'FA' のカルス当りのシュート数は 7.5 本にも達した. また，'UA', 'UB' 及び 'UC' の 3 系統では 50%～66.7% の形成率であった. 多くの場合はシュート形成と同時に根の形成も認められたが，

Table 3. Varietal differences in differentiation from embryogenic calli.

Cultivars and lines used	No. of calli transferred	No. of calli with shoot (%)	No. of shoots formed /callus	No. of plantlet formed /callus
UA	12	6 (50.0)	2.8	0.5
UB	9	6 (66.7)	3.3	3.3
UC	12	7 (58.3)	3.1	0.3
FA	8	8 (100)	7.5	1.8
FB	12	10 (83.3)	3.9	0.9
FC	14	10 (71.4)	2.0	0.5
White	12	12 (100)	4.4	0.9
Ishuwase	12	11 (91.7)	4.7	0.6

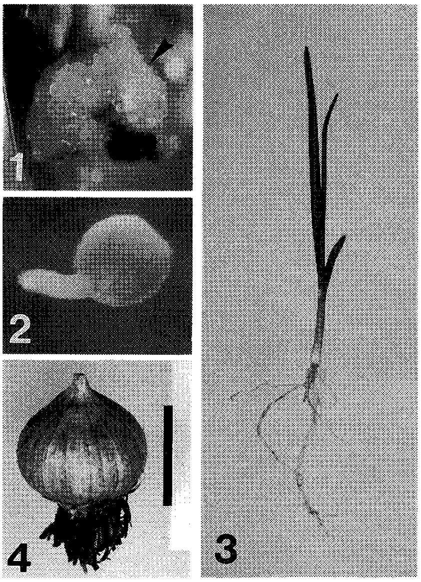

Fig. 3 Plant regeneration from embryogenic callus. 1: embryogenic callus (arrow), 2: somatic embryo isolated, 3: rooting from the differentiated shoot on MS medium without plant growth regulators and 4: a bulb formed in the pot composed of soil and vermiculite. Scale bar indicates 2 cm.

その頻度については品種・系統間により差異が認められ，'UB' ではシュートを形成するとすべて発根し植物体に生長できたが，他は発根が不調で，1カルス当りの再生植物体数は 'FA' で1.8，他は1以下であった．なお得られたシュートは生長調節物質無添加のMS培地に移植することによりすべて容易に発根し，土壌とバーミキュライトを混入したポットで栽培したところ鱗茎を形成した (**Fig. 3**)．

4. 考　察

不定胚形成を目的とした培養において，同一の培地を用いても供試部位や種・品種により形成頻度が異なることがしばしば報告されている[19,20]．鱗茎内の組織では，底盤部組織より最も高い embryogenic callus 形成率が認められ，釘貫らの結果[21]と同様の傾向を示した．また，供試部位によりカルス誘導に要する期間やカルスの生長が異なることも認められ，底盤組織はこれらの点からも他の組織に比べて優れているといえる．しかしながら embryogenic callus を誘導する際に長期間を必要とすることはニンニクの一つの特徴的な現象であるといえる．一方，貯蔵葉からの脱分化は困難であることが示唆され，栗山らの報告[4]と一致した．

多くの植物種ではカルスを長期間継代培養すると再分化能力が次第に低下することが認められている[19]．ニンニクにおいて，柳野らはカルスの培養期間が長くなるに従って茎葉再分化率が低下したことを報告している[22]．本研究でも embryogenic callus の再分化率には経時的な消長がみられ，カルスの維持培養期間が長期になるに従い分化能が低下した．不定胚形成能に品種間差が認められたことは，多くの植物種で報告されている[4,19,23~25]．本研究でも供試した8品種・系統の間に明確な不定胚形成能の差異が認められたが，その差異は形成率以外に形成速度や形成された embryogenic callus の大きさにも現われた．供試品種・系統の中では 'FB' と 'ホワイト' が embryogenic callus の高い形成率を示したが，高い形成率を示した品種・系統ほど形成速度や embryogenic callus の生長においても優れていると判断された．

個体再分化能について，供試した8品種・系統内で植物体の再生率は50～100％のばらつきを示し，ウルグアイから導入された系統が日本産の系統に比し低い傾向が認められ，embryogenic callus 形成能と再分化能の間に必ずしも一定の関係を見いだすことできない．例えば，'FA' では embryogenic callus の形成率は50％と低かったが，個体再生率は100％と高かった．

以上より，多数存在するニンニク品種・系統の不定胚形成に関する特性について大きな変異の存在が予想される．'FB' 及び 'ホワイト' の2品種は embryogenic callus 形成能及び個体再生能がいずれも高く，優良な培養系となると考えられた．

本研究の一部は文部省科学研究費補助金（課題番号 61440010）によって行われたので，ここに記して謝意を表する．

文　献

1) 森　憲昭，1988．農及園．**63**：169-174.
2) Bojwani, S. S., 1980. Scientia Horticulturae, **13**: 47-52.
3) Bojwani, S. S., D. Cohen and P. P. Fry, 1982. Scientia Horticulturae, **18**: 39-43.
4) 栗山尚志，大澤勝次，湯浅三男，森　憲昭，1976．野菜試育種年報，**3**：8-12.
5) 大澤勝次，栗山尚志，菅原裕幸，1981．野菜試報，**A9**：1-46.
6) Walkey, D. G. A., M. J. W. Webb, C. J. Bolland, A. Miller, 1978. J. Hort. Sci., **62**: 211-220.
7) 趙　順慶，李　鵬飛，範　懐忠，郭　碧霞，1987．華南農業大学学報，8(4)：1-8.
8) 高樹英明，水上克郎，柴田千鶴子，1989．園学雑，**58**，別2：234-235.
9) Kehr, A. E., G. W. Schaeffer, 1976. HortScience **11**: 422-423.
10) Novak, F. J., 1980. Z. Pflanzenzüchtg, **84**: 250-260.

11) 小田義信, 西村繁夫, 1988. 育雑, **38**, 別2 : 76-77.
12) 菅原祐幸, 大澤勝次, 我孫子和雄, 1979. 野菜試育種年報, **6** : 29-45.
13) 菅原祐幸, 大澤勝次, 栗山尚志, 1977. 野菜試育種年報, **4** : 21-26.
14) 山口彦之, 原納明博, 1987. 育雑, **37**, 別2 : 80-81.
15) 綾部昌則, 佐藤禎浩, 岩田 光, 谷口研至, 田中隆荘, 1987. 育雑, **37**, 別1 : 132-133.
16) 薛 恵民, 荒木 肇, 八鍬利郎, 1991. 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), (In press).
17) 石橋祐二, 小川 勉, 松葉徳行, 1987. 長崎総農林試研報, **15** : 96-111.
18) Abo El-Nil, F. W. Zettler, 1976. Plant Sci. Lett., **6** : 401-408.
19) 鎌田 博, 1980. 植物の化学調節, **15** : 62-78.
20) 折館寿朗, 1988. 農及園, **63** : 201-203.
21) 釘貫靖久, 小田義信, 西村繁夫, 1989. 育雑, **39**, 別1 : 26-27.
22) 柳野利哉, 柳田雅芳, 1989. 育雑, **39**, 別2 : 48-49.
23) 清沢茂次, 野村和成, 高木千明, 折館寿朗, 下中雅仁, 1988. p. 969-979, バイオインダストリー, CMC, 東京.
24) 西村繁夫, 斉藤猛雄, 山口真美子, 1990. p. 9-15, バイオホルティ **5**, 誠文堂新光社, 東京.
25) 小松田隆夫, 大山勝夫, 1987. 育雑, **37**, 別1 : 54-55.

Summary

Varietal Difference of Embryogenic Callus Induction and Plant Regeneration in Garlic (*Allium sativum* L.)

XUE, H. M., Hajime ARAKI* and Toshiro YAKUWA

Department of Horticulture, Faculty of Agriculture
Hokkaido University, Kita-ku Sapporo 060, Japan
*Present address : *University Farm, Niigata University*,
Muramatsu-cho Niigata Prefecture, 959-17, Japan

Embryogenic calli were induced from basal plates in high frequency on AZ medium supplemented with 1 μM 2, 4-D, 10 μM *p*-CPA and 1 μM kinetin in *Allium sativum* L.. They grew most vigorously when basal plate alone was used as the material. Adventitious shoots were differentiated from the embryogenic calli on MS medium supplemented with 1 μM NAA and 5 μM BA. Regenerating-potential from the embryogenic callus had a tendency to be reduced as the embryogenic calli were cultured for a long period. There were significant differences in the frequency of the embryogenic callus induction, the growth of embryogenic callus and the adventitious shoot differentiation among the cultivars and lines used. Though a definite relationship between the frequency of the embryogenic callus induction and the adventitious shoot differentiation was not recognized, two cultivars showed good responses in these morphogenesis. Some plantlets were obtained by transferring the differentiated shoots to MS medium without plant growth regulators for root development.