

ニンニク (*Allium sativum* L.) カルスからの効率的植物体再生条件

佐藤健治・遠藤 岳・草柳朋子・茂田潤一

石川島播磨重工業(株)技術研究所  
(〒235 神奈川県横浜市磯子区新中原1番地)

(1994年6月4日受付)

(1995年5月12日受理)

ニンニク (*Allium sativum* L.) カルスから効率的に再分化植物体を得るための培養条件を検討した。リン茎から摘出した茎頂は、0.5 mg/l 2,4-D を含む MS 固形培地上で、盛んに増殖する乳白色のカルスを形成した。このようなカルスは、茎頂培養で作出した *in vitro* 幼植物体由来の茎頂、根の伸長帯および根端からも誘導された。これらのカルスは、0.2 mg/l NAA, 2.0 mg/l BA, 6~8 g/l Gelrite を含む MS 培地上で効率良く不定芽を分化した。*in vitro* 幼植物体の各組織から誘導されたカルスの不定芽分化率には明確な差は認められなかった。不定芽分化培地で2カ月間培養したときの不定芽の分化率は、リン茎茎頂由来カルス(15カ月間継代)で約20 shoots/g-callus、幼植物体の各組織由来カルス(5カ月間継代)で約30~40 shoots/g-callus であった。Gelrite 濃度の増加は、不定芽の分化を促進するとともに、水浸化の抑制に効果的だった。不定芽は植物生長調節物質を含まない MS 培地で容易に発根した。また、水浸状を呈した苗条は、通気性を付加した培養系で培養することで、正常な状態に回復した。

## 1. 結 言

ニンニクは、調味料や健康食品等の加工原料として非常に幅広く利用されており、その需要は近年増加している。しかし、ニンニクの増殖は栄養繁殖法に頼らざるを得ないため、増殖率が低いうえにウイルスの伝染を防ぐことができず、品質の低下や減収などの問題が深刻化している。このため、ウイルスに感染していない母球の獲得が強く望まれている。現在、茎頂培養法によってウイルスフリー苗が作出されているが<sup>1-4)</sup>、より効率的な大量増殖法としてカルスからの不定芽分化<sup>5-7)</sup>、苗条原基法<sup>8)</sup>、不定胚誘導<sup>9-12)</sup>などによる方法が検討されている。本研究では、ニンニクカルスから植物体を効率的に再分化させることを目的として、リン茎茎頂からのカルスの誘導、カルスからの植物体再分化に及ぼす植物生長調節物質の影響、培地の固さ、およびカルス誘導時の供試部位の影響について検討した。また、得られる再分化植物体の数はカルスからの再分化能だけでなく、カルスの増殖能にも支配されているため、カルスの増殖率についても検討した。

## 2. 材料および方法

ニンニク (*Allium sativum* L.) のリン茎を、保護葉を取り除いた後に70% エタノールで1分間、次亜塩素酸ナトリウム(有効塩素1%)に10分間浸漬して殺菌し、滅菌水で3回洗浄した。顕微鏡下で葉原基1~2枚を含む茎頂を底盤部ごと(1~2 mm)摘出した。3~5個の茎頂をNAA, 2,4-D, BAを様々な濃度で組み合わせたMS<sup>3)</sup>固形培地(2 g/l Gelrite)40 mlを分注した100 ml培養フラスコで培養し、1カ月後のshoot形成と3カ月後のカルス誘導状況を観察した。0.2~1.0 mg/l 2,4-D添加区で良好なカルスが誘導されたため、0.5 mg/l 2,4-Dで誘導されたカルスを、以後、約1カ月毎に0.5 mg/l 2,4-Dを添加したMS培地(2 g/l Gelrite)で継代培養(約1~2 gのカルスを40 mlの培地を含む100 mlの培養フラスコに移植)した。また、このカルスの増殖能を生重量の増加から求めた。生重量の測定は、16カ月継代(初代培養を含めると19カ月)したカルス1 gを供試材料とし、培地100 mlを分注した容積200 mlの培養UMサンプル瓶(47×62×109 mm)で継代しながら、

1カ月毎の培地更新の時にサンプル瓶内のすべてのカルスを取り出し、生重量を電子天秤で測定し、すべてのカルスを新鮮培地に移すという方法で行い、5カ月間の重量変化を経時的に記録した。

0.5 mg/l 2, 4-D で誘導されたカルスからの不定芽分化条件を検討するため、15カ月間継代培養(初代培養を含めると18カ月)を繰り返した茎頂由来カルス約1gを0~2 mg/l NAA, 0~3 mg/l BAを加えたMS培地(6 g/l Gelrite) 40 mlを分注した100 ml培養フラスコに移し、2カ月後の不定芽分化状況を調べた。また、培地の固さが不定芽分化に及ぼす影響を調べるため、0.2 mg/l NAA, 2.0 mg/l BA添加したMS培地を用い、Gelrite濃度を2~8 g/lとして比較を行った。

分化した不定芽は、植物生長調節物質を含まないMS

培地(6 g/l Gelrite) 15 mlを分注した試験管( $\phi 20 \times 150$  mm)に1~2本ずつ移植し、発根を促した。

通常、培養容器の蓋にはアルミホイルを使用しているが、カルスからの不定芽分化や不定芽からの発根に際して、しばしば水浸状を呈した不定芽、幼植物体の発生が認められた。更に、正常な不定芽(ここでの正常とは、水浸状を呈していないことを意味する)が水浸化することはあっても、その逆は全く起こらなかった。そこで、アルミホイルに直径5 mmの穴を明け、無菌的に通気の可能な膜(ミリシール; Millipore製)を装着した蓋を作成し、この蓋を用いた系で水浸状を呈した不定芽100本を培養し、通気の効果を検討した。

本実験の試験結果を用いて、カルス誘導に及ぼす供試部位の検討を行った。まず *in vitro* 幼植物体を作成する

**Table 1.** Effect of NAA, 2, 4-D and BA on the shoot formation and the callus induction from shoot apices.

Growth regulator (mg/l)			No. of shoot apex trans-ferred	No. of shoots* <sup>1</sup> (shoots/meristem)	Callus formation* <sup>2</sup>				
NAA	2, 4-D	BA			N	VYG	GYW	WGS	D
		0.0	5	1.0±0.0	5	—	—	—	—
		0.5	4	1.0±0.0	4	—	—	—	—
0.2	0.0	1.0	6	4.8±2.9	2	4	—	—	—
		2.0	5	5.4±4.2	2	3	—	—	—
		3.0	5	3.0±1.7	2	3	—	—	—
		0.0	5	1.6±1.0	1	4	—	—	—
0.5	0.0	0.5	5	2.0±1.4	2	3	—	—	—
		2.0	5	4.4±2.3	2	3	—	—	—
		0.0	5	1.0±0.6	3	2	—	—	—
1.0	0.0	0.5	5	1.2±1.0	2	3	—	—	—
		2.0	4	1.0±0.7	2	2	—	—	—
		0.0	9	1.2±1.2	—	—	9	—	—
0.0	0.2	0.5	9	1.3±1.3	—	3	—	6	—
		1.0	8	1.6±1.3	—	3	—	5	—
		0.0	8	1.1±0.7	—	—	8	—	—
0.0	0.5	0.5	6	1.0±0.7	—	2	—	4	—
		1.0	10	1.0±0.7	—	2	—	8	—
		0.0	5	0.2±0.4	—	—	5	—	—
0.0	1.0	0.5	8	0.3±0.9	—	1	—	7	—
		1.0	7	0.3±0.5	—	—	—	7	—
		2.0	7	0.4±0.7	—	—	—	7	—
		0.5	4	0.0±0.0	—	—	—	—	4
0.0	2.0	1.0	4	0.0±0.0	—	—	—	—	4
		2.0	4	0.0±0.0	—	—	—	—	4

The basal medium was MS medium supplemented with 30 g/l sucrose and 2 g/l Gelrite.

\*<sup>1</sup> Number of shoots (average ± s. d.) formed on shoot apices were counted after culture for one month.

\*<sup>2</sup> Callus formation was observed at the basal part of shoot apex after culture for three months; N=No callus induction, VYG=Vitrified callus with yellowish-green coloration, GYW=Globular-shaped callus with yellowish-white coloration, WGS=Vitrified white callus with green spot, D=Dead.

ために、植物生長調節物質を含まないMS培地(6 g/l Gelrite) 15 ml を分注した試験管(φ20×150 mm)で茎頂培養を行なった。草丈10~13 cmに生長した植物体から茎頂(リン茎の場合とほぼ同じ大きさ)、および根の伸長帯(根端より10~15 mm程度基部よりの部分2~3 mm)、根端(1~2 mm)を摘出し、3~5個の組織片を0.5 mg/l 2, 4-Dを含むMS培地(2 g/l Gelrite) 40 ml を分注した培養フラスコに置床し、カルス誘導を行った。3カ月間の初代培養の後、これらの組織から得たカルスを5カ月間継代培養(初代培養を含めると8カ月)した後、0.2 mg/l NAA, 2.0 mg/l BA, 6および8 g/l Gelriteを添加した培地に移植し、2カ月後に不定芽分化状況を観察した。カルスの継代やカルスの増殖能の測定(5カ月間継代培養したカルスを供試した)、カルスからの不定芽分化の条件はリン茎の茎頂由来カルスの場合に準じた。

なお、培地には炭素源として30 g/l ショ糖を加え、オートクレーブ前にpH 5.8に調整した。また、培養はすべて25°C, 3,000 lux, 16時間日長で行った。

### 3. 結果

茎頂からのshoot形成とカルス形成に及ぼす植物生長調節物質の影響をTable 1にまとめた。NAAとBAを組み合わせた試験区では、1個の茎頂より1~5.4本のshoot形成が認められた。最もshoot形成に効果的な植物生長調節物質の組成は、0.2 mg/l NAA, 2.0 mg/l BAであった。しかし、ここで形成したshootはすべて水浸状を呈していた。また、底盤部においてはカルスの形成が認められた組み合わせもあったが、ここで得られたカルスは、水浸状で淡い黄緑色を呈していた(VYG)。一方、2, 4-DとBAを組み合わせた試験区では良好なshoot形成は認められなかった。カルスの形成は、2, 4-D濃度が1.0 mg/l以下の場合に観察されたが、2, 4-D単独区ではいずれの茎頂からも乳白色を呈する緻密なカルス(GYW)が誘導されたのに対し、2, 4-DとBAを組み合わせた試験区ではVYGまたは白色で水浸状を呈し、所々グリーンスポットを有する塊状のカルス(WGS)が誘導された。Nagasawaら<sup>5,6)</sup>は幼苗の底盤部よりmorphogenic callus(緻密で黄色を呈し、表面がなめらかでこぶが多い状態で増殖する)を誘導し、また、薛ら<sup>11,12)</sup>は底盤を含む茎頂よりembryogenic callus(乳白色または透明で分裂部位をいたるところに有して盛り上がる形状)を誘導している。今回得られたGYWは、これらのカルスと共通する形態的特徴を有しており、植物体を再分化させる材料としてはGYWが適当と考えられた。GYWは、茎頂培養で作出した*in vitro* 幼植

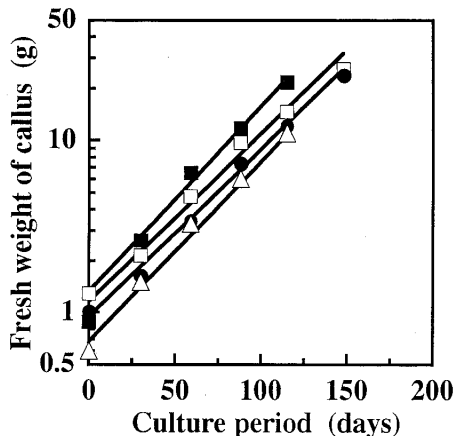


Fig. 1 Comparison of growth of calli originated from different tissues.

Calli were induced from shoot apex of bulb(□), and shoot apex(■), elongated zone of root(●) and root apex(▲) from *in vitro* propagated plantlets on MS medium supplemented with 0.5 mg/l 2, 4-D, 30 g/l sucrose and 2 g/l Gelrite. The calli were subcultured monthly on the same medium.

物の茎頂、根の伸長帯、根端からも同様に誘導された。このカルスは、初めの2カ月間の成長は非常に緩慢であったが、その後は、旺盛な増殖を示し、0.5 mg/l 2, 4-D添加区においてGYWの継代培養を繰り返しても形態的な変化は起こらなかった。

Fig. 1に各組織から得られたカルスの増殖(重量増加)を示す。継代培養中、培地の栄養素が充足しており、増殖に影響しないと仮定すると、増殖のステージは常に対数増殖期にあり、カルスの増殖は次式で与えられる。ただし、 $W_0$ は継代開始時のカルス重量、 $W_t$ は $t$ 日間培養した時のカルスの重量、 $a$ は比増殖速度である。

$$W_t = W_0 e^{at} \quad (1)$$

図から各カルスの比増殖速度は等しく、 $a=0.02 \text{ day}^{-1}$ と推定された。

リン茎茎頂由来カルスからの不定芽分化に及ぼすNAA, BAの効果をTable 2に示す。培養4週間後にはすべての試験区で不定根の分化が観察された。また、0.2~2.0 mg/l NAA, 0.5~3.0 mg/l BA添加区では、培養6週間後には不定芽の分化も観察された。不定根はカルス表面のいたるところで分化したのに対し、不定芽分化は局在化しており、この部位をカルスの形態的な特徴から特定することはできなかった。最も効果的な植物生長調節物質の組成は0.2 mg/l NAA, 2.0 mg/l BAで、1 gカルス当たり平均19.2本、最大で52.9本の不

**Table 2.** Effect of NAA and BA on the formation of adventitious shoots from calli\*<sup>1</sup> induced from shoot apices of bulbs.

Growth regulator (mg/l)		No. of calli	No. of adventitious shoots* <sup>2</sup> (shoots/g-callus)
NAA	BA		
0.0	0.0	4	R
	0.5	6	R
	2.0	5	R
	3.0	4	R
0.2	0.0	9	R
	0.5	10	0.8±1.2
	2.0	36	19.2±9.6
	3.0	12	9.9±6.7
0.5	0.0	10	R
	0.5	10	1.4±0.9
	2.0	7	4.8±3.8
	3.0	8	2.2±1.4
2.0	0.0	5	R
	0.5	4	R
	2.0	4	8.3±6.5
	3.0	5	2.2±1.3

The calli were cultured on MS medium supplemented with 30 g/l sucrose and 6 g/l Gelrite for two months.

\*<sup>1</sup> The calli which had been maintained on MS medium supplemented with 0.5 mg/l 2, 4-D, 30 g/l sucrose and 2 g/l Gelrite for more than 15 months were used for the experiment.

\*<sup>2</sup> Average±s.d. R indicates that only adventitious roots were produced on calli without formation of adventitious shoots.

**Table 3.** Effect of Gelrite concentration on the formation of adventitious shoot on calli\*<sup>1</sup> obtained from shoot apices of bulbs.

Concentration of Gelrite (g/l)	No. of calli	No. of adventitious shoots (shoots/g-callus)		
		Nonvitrified	Vitrified	Total
2	4	0	2.8±1.8* <sup>2</sup>	2.8±1.8
4	4	4.5±4.4	9.0±2.7	13.5±6.6
6	4	18.0±3.5	3.0±0.4	20.9±3.5
8	3	13.2±3.2	0	13.2±3.2

The calli were cultured on MS medium supplemented with 2 to 8 g/l Gelrite, 0.2 mg/l NAA, 0.2 mg/l BA and 30 g/l sucrose for two months.

\*<sup>1</sup> The calli which had been maintained on MS medium supplemented with 0.5 mg/l 2, 4-D, 30 g/l sucrose and 2 g/l Gelrite for more than 15 months were used for the experiment.

\*<sup>2</sup> Average±s.d.

定芽の分化が観察された。

Gelrite 濃度は、不定芽の再分化率と水浸状の程度に大きく影響した (Table 3)。Gelrite を 2 g/l 添加した試験区での不定芽分化は 1 g カルス当たり 2.8 本であったが、濃度が増加するほど不定芽数が増加し、6 g/l では 20.9 本であった。しかし、8 g/l では不定芽数が減少す

る傾向がみられた。Gelrite の濃度が 2 g/l では再分化した不定芽はすべて水浸状を呈していたが、Gelrite 濃度の増大に伴って水浸状を呈した不定芽の分化率は減少し、8 g/l で分化した不定芽 (13.2 shoots/g-callus) には水浸状のものは認められなかった。

*in vitro* 幼植物体の茎頂、根の伸長帯、根端より誘導

**Table 4.** Formation of adventitious shoots on calli\*<sup>1</sup> which were obtained from shoot apices, elongated zone of root and root apices of an *in vitro* propagated plants.

Explant	Concentration of Gelrite (g/l)	No. of calli	No. of adventitious shoots (shoots/g-callus)		
			Nonvitrified	Vitrified	Total
Shoot apex	6	10	17.7±6.2* <sup>2</sup>	13.8±4.3	31.5±10.4
	8	9	38.1±9.5	6.2±4.1	44.4±11.5
Elongated zone of root	6	10	18.3±6.2	12.4±3.7	31.1±7.2
	8	9	36.8±8.8	5.1±4.1	41.8±9.1
Root apex	6	10	27.1±9.4	9.1±3.5	35.6±9.9
	8	9	36.4±8.3	3.5±3.1	39.9±7.8

The calli were cultured on MS medium supplemented with 0.2 mg/l NAA, 2.0 mg/l BA and 30 g/l sucrose for two months.

\*<sup>1</sup> The calli which had been maintained for five months on MS medium supplemented with 0.5 mg/l 2, 4-D, 30 g/l sucrose and 2 g/l Gelrite were used for the experiment.

\*<sup>2</sup> Average±s. d.

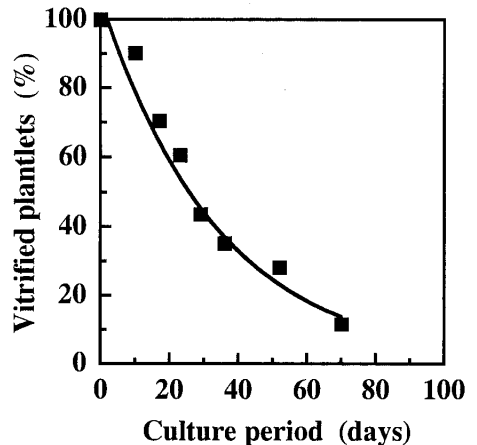
したカルスの不定芽分化数はりん茎莖頂由来カルスと異なり、いずれも 6 g/l より 8 g/l の方が大きかったが、水浸状の不定芽の分化は Gelrite 濃度が 6 g/l から 8 g/l になると半分以下に減少しており、培地が固くなると水浸化が抑制されるという点では同様な結果となった (Table 4)。しかし、由来部位の異なるカルス間での不定芽分化率には明確な差は認められなかった。

カルスから分離した不定芽は、植物生長調節物質を含まない MS 培地に移植すると数日～数週間で発根した。再分化した植物体には、形態的観察で変異と考えられる様な個体は認められなかった。また、再分化植物体からランダムに 10 本選出して根端細胞を DAPI で染色し<sup>14)</sup>、染色体数を調査したところ、いずれも  $2n=16$  が確認された。カルスから再生した植物体は、ソマクローナル変異を起こし易いと言われているが、今回の試験では少なくとも形態的または染色体数の変異を起こした個体は検出されなかった。得られた幼植物体を順化し、実験圃場で栽培したところ、1 年後には直径 2 cm 以上の球の形成も観察された。

水浸状の不定芽を通気性を付加した培養容器で培養した時の幼植物体の水浸化率の減少を Fig. 2 に示す。通常のアルミホイルで水浸状の不定芽を培養した場合、幼植物体の水浸化率の減少はまったく観察されず、透明根の分化も多く認められた。これに対し、通気性を付加した培養容器の場合は、培養日数の増加とともに幼植物体の水浸化率は減少し、白色根の分化が観察された。培養容器に通気性を付加することは、水浸状の不定芽を正常な状態に回復させることに効果的である。

#### 4. 考 察

カルスは継代培養によって無限に増殖させることが可



**Fig. 2** Effect of ventilation filter on the reduction of vitrified plantlets.

Only vitrified plantlets ( $N=100$ ) were transferred in test tubes containing MS medium supplemented with 30 g/l sucrose and 6 g/l Gelrite, with an aseptic ventilation filter. There was no reduction of vitrified plantlets when cultured without aseptic ventilation filters.

能である。今回カルスからの不定芽分化において、至適植物生長調節物質組成や Gelrite 濃度を検討した結果、各組織由来カルス (5 カ月間継代) で高い不定芽分化率が観察され、カルスからの安定的な不定芽分化条件が明らかとなった。ニンニクでは、ウイルスフリー苗獲得のため、1 莖頂から通常 1 個体を作成している。本方法は 1 個のりん茎莖頂から多数のウイルスフリー苗を作成することが可能であり、増殖を兼ねた効率的な方法と言える。0.5 mg/l 2, 4-D 添加区で誘導されたニンニクカルスは、潜在的に高い不定芽分化能を維持しており、カルスが

0.2 mg/l NAA, 2.0 mg/l BA, および 6~8 g/l Gelrite を含む培地に移植された時、この能力が発現するものと考えられる。

リン茎の茎頂から得たカルスと幼植物体の各組織から誘導されたカルスとの間には、形態的な違いは認められず、また増殖速度も等しく、不定芽分化培地では高い不定芽分化率を示した。従って、各部位から得られたカルスが同じ性質を有していたと考えられる。根端分裂組織由来カルスからの植物体再生は報告されているが<sup>15)</sup>、本実験において分裂組織を含まない根の伸長帯からも高い再分化能を有するカルスが得られたことは興味深い点である。

不定胚の定義として(1)形態および機能が接合胚に似ていること、(2)発育初期から茎極と根極が反対側に分化する2極構造をなす、(3)カルス表面で分化する場合、それらと維管束連絡を持たずに独立していること、(4)1つの細胞から形成されること、の4つの条件があげられている<sup>16)</sup>。今回、著者らが得たカルス(GYW)は、薛ら<sup>11,12)</sup>が得た embryogenic callus と形態的には類似する特徴を有していたが、植物体再分化の過程において上述の定義(2)を満足しておらず、embryogenic callus ではないものとする。

Ozeki<sup>17)</sup>は、ニンジンの胚軸から得た懸濁細胞が、不定胚に分化する細胞とアントシアニンを生産(不定胚形成は起こらない)する細胞とから構成されており、これらは細胞質密度の差から分離が可能であることを報告している。今回得たニンニクカルスも不定芽を分化し得る細胞(組織)とそうでない細胞とによって構成されていることが予想され、カルス表面での不定芽の局在化の原因になったものと考えられる。1gのカルスの不定芽分化能を  $R_{SF}$  とすると、カルスの増殖は(1)式で与えられるため、得られる再分化植物体の数  $N_s$  は、(2)式となる。

$$N_s = R_{SF} W_0 e^{0.021t} \quad (2)$$

本実験(不定芽分化培地で2カ月間培養)で得られた  $R_{SF}$  値は、15カ月間継代したリン茎由来のカルスで約 20 shoots/g-callus、および5カ月間継代した幼植物体由来のカルスで約 40 shoots/g-callus である。 $R_{SF}$  値を 20 shoots/g-callus とし、カルス( $W_0=1$  g)を1年間継代した場合、得られる幼植物体の数は約3万本となる。カルスの再分化能は、長期間の継代による低下が指摘されており<sup>12,18)</sup>、本実験で得られた  $R_{SF}$  値にも差が認められる。しかし、今回の試験ではカルスの起源が異なるため、継代の影響であると結論はできない。今後、この点に関して更に検討を重ね、継代期間と  $R_{SF}$  値の関係が明らかにされれば、計画的なウイルスフリー苗の作

出が可能となる。

苗条が水浸状を呈した場合、その後の順化率が低下するため、水浸状個体発生の防止が検討されている<sup>19)</sup>。培養効率の点からいえば、固形培地よりも液体培養の方が有利であるが<sup>20)</sup>、液体培養の場合には水浸状を呈す可能性が高くなる<sup>21)</sup>。このため、水浸状不定芽の分化率を抑制するか、または正常に回復させることが望ましい。高濃度の Gelrite 濃度は、不定芽分化を促進するとともに、不定芽の水浸化の抑制に効果的であり有効な手段であることが示された。また、通気膜の使用は、水浸状の不定芽を回復させる上で効果的であった。Gelrite 濃度の増加は培地表面からの水の蒸発を減少させ、通気膜は培養器内の水蒸気を培養系外に逃がすことが容易に予想できる。これらの処理の不定芽に対する効果は培養系の相対湿度の低下によるものと推察される。同様な現象は、アスパラガスの不定胚形成においても報告されており<sup>22)</sup>、培養器内の湿度は形態形成に影響を及ぼす重要な環境因子と考えられる。

## 文 献

- 1) Bhojwani, S. S., 1980. *Scientia Hort.*, **13**: 47-52.
- 2) Bhojwani, S. S., D. Cohen, P. R. Fry, 1982. *Scientia Hort.*, **18**: 39-43.
- 3) 森 憲昭, 1988. 農業および園芸, **63**(1): 169-174.
- 4) 志賀義彦, 1990. 野菜の組織・細胞培養と増殖(最新バイオテクノロジー全書編集委員会編), p. 149-160, 農業図書, 東京.
- 5) Nagasawa, A., J. J. Finer, 1988. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **15**: 183-187.
- 6) Nagasawa, A., J. J. Finer, 1988. *HortScience*, **23**(6): 1068-1070.
- 7) Rauber, M., J. Grunewaldt, 1988. *Plant Cell Reports*, **7**: 426-429.
- 8) 綾部昌則, 佐藤貞浩, 岩田 光, 谷口研至, 田中隆荘, 1987. 育種, **37**(別1): 132-134.
- 9) Abo El-Nil, M. M., F. W. Zettler, 1976. *Plant Sci. Lett.*, **6**: 401-408.
- 10) Abo El-Nil M. M., 1977. *Plant Sci. Lett.*, **9**: 259-264.
- 11) 薛 惠民, 荒木 肇, 石 嶺, 八鍬利朗, 1991. 園学雑, **60**: 627-634.
- 12) 薛 惠民, 荒木 肇, 八鍬利朗, 1991. 植物組織培養, **8**(3): 166-170.
- 13) Murashige, T., F. Skoog, 1962. *Physiol. Plant.*, **15**: 473-497.
- 14) 西林双龍, 1990. 植物組織培養, **7**(2): 127-129.
- 15) Shuto, H., T. Abe, T. Sasahara, 1993. *Japan. J. Beed.*, **43**: 349-354.
- 16) Reinert, J., Y. P. S. Bajaj, B. Zbell, 1977. In "Plant Tissue and Cell Culture", p. 389, Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, Edinburgh, Melbourne.
- 17) Ozeki, Y., A. Komamine, 1981. *Physiol. Plant.*, **53**: 570-577.

- 18) 柳野利哉, 柳田雅芳, 1989. 育雑, **39**(別2): 48-49.  
 19) 遠藤直美, 鈴木柳子, 佐藤忠夫, 1986. 東北農業研究, **39**: 303-304.  
 20) 川合正允, 1986. バイオインダストリー, **3**(4): 332-340.  
 21) 三位正洋, 露木美英, 1986. 農業および園芸, **61**(1): 181-189.  
 22) Saito, T., S. Nishizawa, S. Nishimura, 1991. Plant Cell Reports, **10**(5): 230-234.

---

### Summary

#### Efficient Plant Regeneration from Callus Cultures in Garlic (*Allium sativum* L.)

Kenji SATO, Takeshi ENDO, Tomoko KUSAYANAGI and Jun-ichi SHIGETA

*Research Institute, Ishikawajima-Harima Heavy Industries Co., Ltd.,  
 1 Shinnakahara-cho, Isogo-ku, Yokohama 235, Japan*

The aim of this study was to establish an efficient plant regeneration system from garlic callus (*Allium sativum* L.) through adventitious shoot formation. Shoot apices excised from field-grown bulbs formed globular shaped calli with yellowish-white coloration on an MS medium supplemented with 0.5 mg/l 2, 4-D, and they showed rapid growth on the same medium. Similar calli were also induced from shoot apex, elongated zone of root and root apex excised from *in vitro* plantlets produced through shoot apex culture. Adventitious shoot formation was observed on the surface of these calli when transferred to a medium supplemented with 0.2 mg/l NAA, 2.0 mg/l BA and 6 to 8 g/l Gelrite. The origin of calli did not affect the adventitious shoot formation. The regeneration capacity of bulb-derived calli which had been subcultured for 15 months and that of *in vitro* plantlet-derived calli having been subcultured for five months were 20 and 30~40 shoots/g-callus after culture for two months, respectively. Increased concentration of Gelrite in the medium enhanced adventitious shoot formation and repressed vitrification of the shoots. Root formation was observed in all adventitious shoots when they were transferred to growth regulator-free MS medium supplemented with 6 g/l Gelrite. Normal shoots were recovered from vitrified shoots which were grown in the culture vessels with an aseptic ventilation filter.