

ギョウジャニンニクの芽生えおよび未熟胚からのカルス誘導と植物体再生

薛 惠民*・金澤俊成**・荒木 肇***・原田 隆・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 サントリー株式会社基礎研究所

(〒618 大阪府三島郡島本町若山台1-1-1)

** 岩手大学教育学部

(〒020 盛岡市上田3丁目18-33)

*** 新潟大学農学部

(〒959-17 新潟県中蒲原郡村松町石曾根)

(1995年1月6日受付)

(1995年11月25日受理)

ギョウジャニンニクのカルス経由の培養系を確立する目的で、芽生えおよび未熟胚からのカルス誘導と植物体再分化条件について検討し、カルスからの不定芽分化の様式を観察した。芽生えからのカルス誘導には2,4-Dが不可欠であり、BAの添加はカルスの生長に有効であった。未熟胚からのカルス誘導には基本培地の影響が認められ、MS培地およびBDS培地に比べてAZ培地が効果的であった。また、植物生長調節物質として2,4-D 1 μ MとBA 1 μ Mとの組合せが最も良好であった。カルスを誘導するための材料として、芽生えに比べて未熟胚の方が適していた。芽生え由来のカルスを用いて植物体再生について検討したところ、カルスからの器官分化においても基本培地が影響し、MS培地に比べてBDS培地が効果的であった。一方、不定芽の分化は多くの経路を通じて起こることが観察され、ギョウジャニンニクの形態形成の多様性が示唆された。

1. 緒言

ギョウジャニンニク (*Allium victorialis* L. ssp. *platyphyllum* Hult.) は、日本では北海道、東北地方に自生するユリ科ネギ属植物である。現在まで主に山菜として利用されてきたが、植物体内に抗血栓作用や脂肪抑制効果をもつ成分を含むことが明らかとなっている。近年、その需要が著しく伸びていることから、栽培化の研究が進められている¹⁻⁷⁾。ギョウジャニンニクの繁殖方法には主として種子繁殖と分けつによる栄養繁殖があるが、前者の場合には生育が極めて遅いため成株に至るまでに数年間を要し、後者の場合には増殖率が低いことが問題となっている^{1,7-10)}。そのため、組織培養による効率のよい増殖法を確立することが望まれている。ギョウジャニ

ニンニクにおいても、細胞工学の手法により生育特性の改良や他のネギ属植物との雑種の作成が考えられる。近年、ネギ属植物においてプロトプラストを利用した体細胞雑種の作出に関する研究が報告されている¹¹⁻¹⁸⁾。プロトプラスト培養系の効率を向上させるためにも、カルスからの植物体再生の培養系を確立しておくことは重要である。

現在までに茎頂および底盤部の培養により不定芽を誘導した報告が数例ある^{9,10,19)}。揚ら¹⁹⁾は底盤部の培養でカルスを誘導したが、カルスからの茎葉形成率は低かったことを報告している。Kanazawaら¹⁰⁾も底盤部組織および芽生えの培養においてカルスの形成が認められたことを報告している。しかし、カルスからの安定した植

物体再生の培養条件は確立していないのが現状である。

本研究では、ギョウジャニンニクにおいてカルスを經由した植物体再生系を確立することを目的として、芽生えおよび未熟胚からのカルス誘導と植物体再生の条件について検討し、カルスからの不定芽分化の様式についても観察を行った。

2. 材料および方法

(1) カルスの誘導

材料は北海道大学農学部附属農場蔬菜園に栽植してある成株から採取した種子を用いた。芽生えからのカルス誘導については、完熟種子を無菌発芽させた後、その芽生えを引き続き同じ培地で培養した。種子の発芽および芽生えの培養には AZ 培地²⁰⁾を基本培地とし、ショ糖 2% とゲルライト 0.2% を含み、2,4-D 0, 1, 10, 50 μM と BA 0, 0.01, 0.1, 1 μM を組み合わせて添加した 16 種類の培地を用いた。置床 8 か月後に芽生えからのカルス形成について調査した。

未熟胚からのカルス誘導については、未熟種子より摘出した未熟胚を用いた。開花数日後の花房から未熟種子(胚乳が糊状の状態)を取り出し、表面殺菌を行った後、解剖針で無菌的に約 3~5 mm の棒状胚を摘出して培地

に置床した。植物生長調節物質の影響を検討するため、BDS 培地²¹⁾を基本培地とし、2,4-D 0, 1, 10 μM と BA 0, 1, 10 μM を組み合わせて添加した 9 種類の培地を用いた。また、2,4-D 10 μM を添加した MS 培地、BDS 培地および AZ 培地を用いて基本培地の影響を検討した。それぞれ培養 135 日後と 120 日後にカルス形成について調査した。

(2) カルスの維持・増殖

芽生えの培養で誘導された各実験区のカルス (Table 1 を参照) を用いた。初代培養 8 か月後に、誘導されたカルスを約 3 mm 角に分割して、2,4-D 1, 5, 10 μM を添加した MS 培地に移植して継代培養した。移植 85 日後にカルスの生長について調査した。

(3) カルスからの植物体再生

継代培養 3 か月後に、(2)の実験で増殖させた 3 つの実験区 (Table 2 を参照) のカルスを材料とした。カルスを約 3 mm 角に分割して個体再生培地に移植し、不定芽の形成を検討した。培地は 2,4-D 1 μM を添加した MS 培地および BDS 培地の 2 種類の基本培地を用いた。移植 3 か月後にカルスからの不定芽形成について調査した。形成された不定芽を分割して、植物生長調節物質

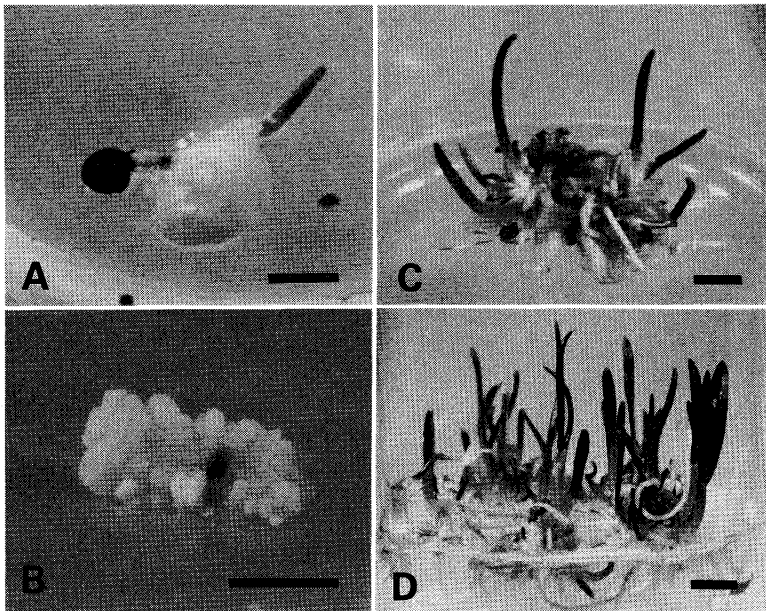


Fig. 1 Callus formation and plant regeneration.

Callus was induced from the basal plate of seedling on AZ medium containing 10 μM 2,4-D after 8 months of culture (A) and from the immature embryo on BDS medium containing 1 μM 2,4-D after 110 days of culture (B). Adventitious buds were differentiated from seedling-derived callus on BDS medium containing 1 μM 2,4-D after 4 months of culture (C). Plantlets were regenerated by transferring of adventitious buds on to MS medium containing 1 μM NAA and 1 μM kinetin after 5 months of culture (D). Scale bar indicates 5 mm.

Table 1. Effects of 2, 4-D and BA on callus induction from the seedling*¹.

2, 4-D(μ M)	BA(μ M)	No. of explants	Callus formation		Size of callus(mm)* ²
			Number	%	
0	0	24	0	0.0	—
	0.01	13	0	0.0	—
	0.1	14	0	0.0	—
	1	24	0	0.0	—
1	0	11	2	18.2	3.0 \pm 1.0
	0.01	25	9	36.0	3.8 \pm 0.9
	0.1	14	6	42.9	3.7 \pm 0.8
	1	10	2	20.0	1.0 \pm 0.0
10	0	24	7	29.2	2.7 \pm 1.0
	0.01	9	3	33.3	1.3 \pm 0.3
	0.1	7	2	28.6	8.0 \pm 2.0
	1	13	5	38.5	5.6 \pm 1.0
50	0	11	1	9.1	1.0
	0.01	10	0	0.0	—
	0.1	4	0	0.0	—
	1	11	0	0.0	—

*¹ AZ was used for basal medium. Morphogenic response was observed after 8 months of incubation.

*² Mean \pm SE(Standard error).

無添加および NAA 0, 1, 5 μ M とカイネチン 1 μ M を組み合わせた 4 種類の MS 培地に移植して茎葉形成および発根の頻度について検討した。調査は移植 5 か月後に行った。

培養の環境条件は以下の通りとした。芽生えからのカルス誘導のため、置床から 3~4 か月間は、種子の発芽に適する条件として 20°C, 4,000 lx, 8 時間日長とした。その他の培養は 25°C, 4,000 lx, 16 時間日長であった。

(4) 不定芽の分化様式の観察

再分化中のカルスを解剖針で分割し、解剖顕微鏡下(倍率 \times 15~25)でカルス内部の再分化の状態を観察した。

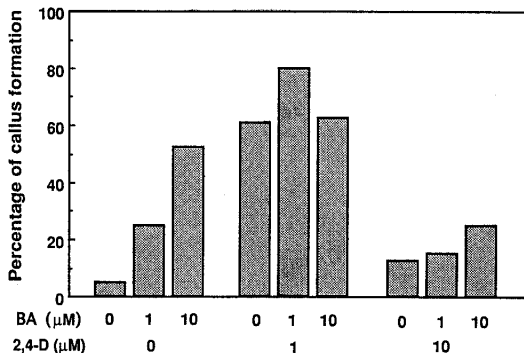


Fig. 2 Effects of 2, 4-D and BA on callus induction from immature embryos.

BDS was used for basal medium and more than 20 immature embryos were cultured in each medium.

3. 結果

(1) カルスの誘導

芽生えを培養すると、カルスは芽生えの基部に形成された。培養 8 か月後の調査において、2, 4-D 無添加では BA の濃度に関係なくカルスは形成されなかったが、2, 4-D 1 μ M および 10 μ M を添加するとカルスの形成が認められた(**Fig. 1-A, Table 1**)。特に、2, 4-D 1 μ M と BA 0.1 μ M を添加した区ではカルス形成率が 42.9% と他の区に比べて高かった。2, 4-D 50 μ M の高濃度になると、カルスの形成はほとんどみられなかった。カルスの大きさは実験区により顕著な差がみられ、2, 4-D 10 μ M と BA 0.1 μ M を添加した区で形成されたカルスは直径 8.0 mm と最も大きかった。

未熟胚の培養において、2, 4-D 無添加では BA 濃度が高くなるに従い、カルス形成率が上昇する傾向がみられた。本実験を行った条件内で最も高いカルス形成率は 50.0% であった(**Fig. 2**)。2, 4-D 1 μ M を添加すると、カルス形成率は上昇し、とりわけ 2, 4-D 1 μ M と BA 1 μ M を添加した区では 80.0% と最も高かった(**Fig. 1-B**)。しかし、2, 4-D 10 μ M になると、カルスの形成率は著しく抑制された。形成されたカルスは、2, 4-D 10 μ M の単独添加区を除いていずれの区においてもほぼ同じ大きさ(直径約 4 mm)であった。

未熟胚を 3 種類の基本培地で培養したところ、カルス形成の差異が認められた。MS 培地および BDS 培地ではカルス形成率が各々 15.0%, 35.0% と低かったの

に対して、AZ 培地では 60% と高かった (Fig. 3)。カルスの大きさも MS 培地では小さく、AZ 培地では直径

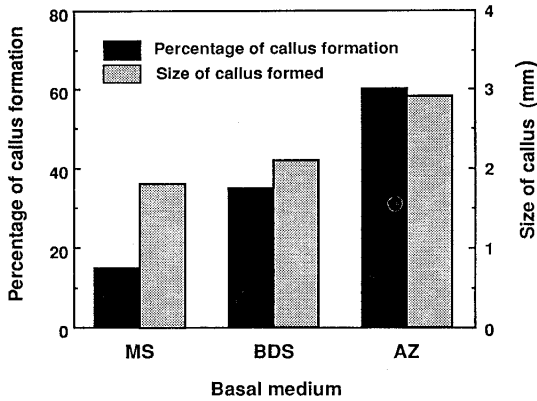


Fig. 3 Effect of basal medium on callus induction from immature embryos. 10 μ M 2, 4-D was added to basal medium and more than 20 immature embryos were cultured in each medium.

2.9 mm と最も大きかった。

(2) カルスの維持・増殖

2, 4-D を添加した培地に継代すると、カルスの増殖が認められた。その場合、2, 4-D 1 μ M の添加区ではカルスの維持率が 81.3% と最も高く、2, 4-D 濃度が高くなるに従って維持率が低下する傾向を示した (Table 2)。カルスの大きさについて 2, 4-D 1~10 μ M の範囲では顕著な差は認められなかった。

(3) カルスからの植物体再生

芽生え基部由来カルスを 2, 4-D 1 μ M 添加した MS 培地および BDS 培地に移植したところ、不定芽の形成が認められた (Fig. 1-C)。不定芽形成は MS 培地と BDS 培地とで顕著な差がみられ、BDS 培地ではその形成率が 59.5% と高く、カルス当りの不定芽形成数も 5.2 と多かった (Table 3)。

カルスから形成された不定芽を分割して培養すると、茎葉形成および発根が認められ、完全な植物体が得られ

Table 2. Effect of 2, 4-D on the growth of seedling-derived callus in subculture*1.

2, 4-D (μ M)	No. of calli transferred (A)	Callus growth		Size of callus (mm)*2
		No. of growing calli (B)	Percentage (B/A \times 100)	
1	16	13	81.3	8.9 \pm 1.0
5	19	9	47.4	8.9 \pm 0.9
10	20	9	45.0	10.0 \pm 1.0

*1 MS was used for basal medium. Morphogenic response was observed after 85 days of transferring.

*2 Mean \pm SE (Standard error).

Table 3. Effect of basal medium on the adventitious bud differentiation from the seedling-derived callus*1.

Basal medium	No. of calli transferred (A)	Adventitious bud differentiation		
		No. of calli (B)	Percentage (B/A \times 100)	Number per callus differentiated
MS	35	8	22.9	3.0
BDS	37	22	59.5	5.2

*1 1 μ M 2, 4-D was added to basal medium. Morphogenic response was observed after 3 months of transferring.

Table 4. Effects of NAA and kinetin on shoot, root and plantlet formation from the adventitious buds*1.

NAA (μ M)	Kinetin (μ M)	No. of calli transferred	Shoot			Root		Plantlet	
			%	Length (cm)	Number per formed callus	%	Number per plantlet	%	Number per formed callus
0	0	15	93.3	1.4	2.2	86.7	3.1	80.0	2.3
0	1	20	75.0	1.4	2.5	70.0	2.4	65.0	2.2
1	1	12	100	2.1	2.6	100	4.0	100	2.5
5	1	12	66.7	1.8	2.3	58.3	4.2	58.3	2.1

*1 MS was used for basal medium. Morphogenic response was observed after 5 months of transferring.

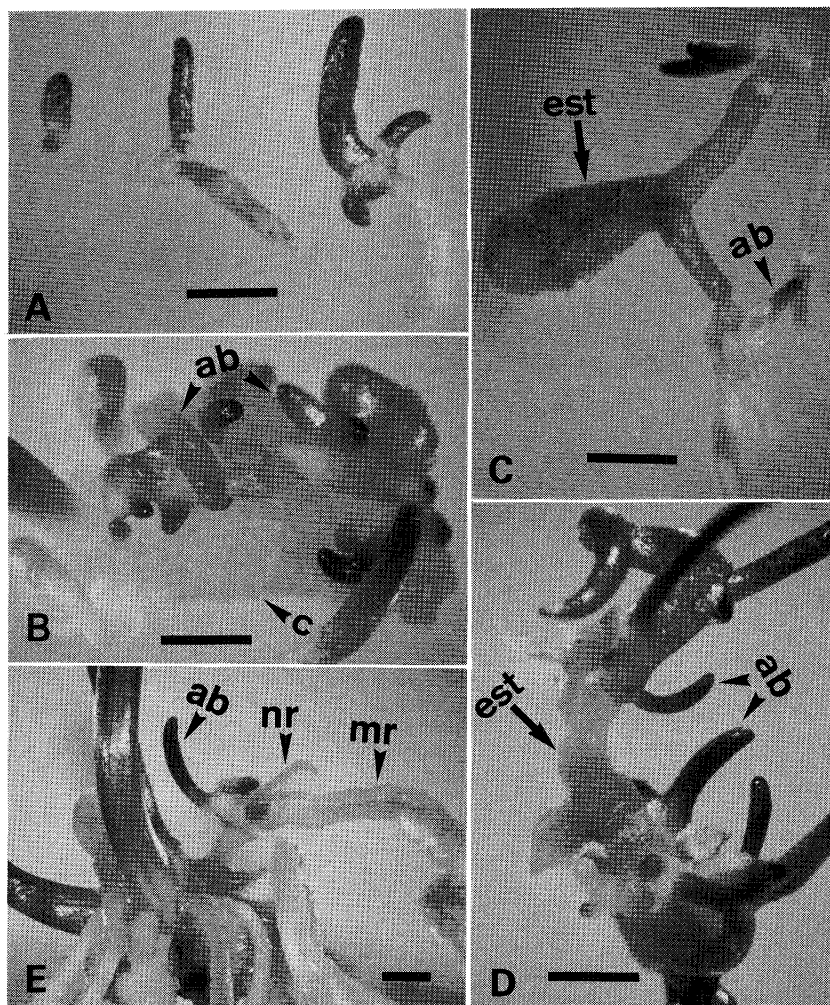


Fig. 4 Various pathways in shoot and plantlet regeneration.

Plantlet (A) and adventitious bud (B) regenerated from callus. Adventitious bud differentiation from the enlarged or stick tissue (C, D) and from the root of regenerated plantlet (E). Scale bar indicates 2 mm. c: callus, ab: adventitious bud, est: enlarged or stick tissue, mr: mother root, nr: new root.

た (Fig. 1-D), 植物生長調節物質無添加区および NAA $1 \mu\text{M}$ とカイネチン $1 \mu\text{M}$ を添加した区では茎葉形成率, 発根率および植物体形成率がいずれも 80% 以上の高い値を示した (Table 4). 特に, NAA $1 \mu\text{M}$ とカイネチン $1 \mu\text{M}$ を添加した区では植物体形成率が 100% と最も高く, 平均再生植物体数や茎葉長も他の区に比べてやや良好であった. 平均根数は NAA $1 \mu\text{M}$ および $5 \mu\text{M}$ とカイネチン $1 \mu\text{M}$ とを組み合わせで添加した区で多かった.

(4) 不定芽の分化様式の観察

解剖顕微鏡でカルス内部の再分化状態を観察したところ, 不定芽の形成には多数の様式が認められ, 以下の 4 つの型に類別された. 1) 完全な植物体の形成 (数ミリの茎葉および根を有する幼植物体が観察された) (Fig. 4-

A), 2) カルス組織からの不定芽形成 (Fig. 4-B), 3) カルスから形成された塊状または棒状の組織からの不定芽および植物体の形成 (Fig. 4-C, D), 4) 再生した幼植物体の根からの植物体形成 (Fig. 4-E), であった.

以上の 4 つの再分化様式の中で, 塊状や棒状の組織からの不定芽形成が高頻度で観察された.

4. 考 察

ギョウジャニンニクの芽生えおよび未熟胚を培養することによりカルスを誘導することが可能であった. 芽生えからのカルス誘導には 2, 4-D が不可欠であり, BA の添加はカルスの増殖に有効であることが明らかとなった. 初代培養で誘導された各実験区のカルスは, いずれも白色でコンパクトな形状を呈し, 形態的な差異は認め

られなかった。これらのカルスを継代増殖および植物体再生に用いたところ、カルス形成の培地組成による影響はみられなかった。このことから、多くの不定芽を得るためにはカルスの増殖の良好な条件が適していると判断し、2,4-D 10 μM と BA 1 μM を添加した培地がカルス誘導に最適であると考えられた。

未熟胚からも高頻度でカルスが誘導されたが、その誘導には基本培地による影響が認められ、MS 培地および BDS 培地に比べて AZ 培地が効果的であった。また、カルス形成には BA と 2,4-D の効果が認められ、2,4-D 1 μM と BA 1 μM との組合せが最も良好であった。

カルスを誘導するための材料について、芽生えを用いた場合には、培養8か月後においてもカルス形成率が42.9%と低かったのに対し、未熟胚を培養すると培養4か月後に80.0%の高い形成率が得られた。このことから、カルスの誘導には芽生えに比べて未熟胚の方が材料として適すると考えられる。

初代培養で誘導されたカルスを継代培養することにより、カルスの状態で長期間にわたり維持・増殖することができれば大量増殖などを行う際に好都合であるが、これに関する報告は極めて少ない。本実験において、芽生え由来のカルスを用いてカルスの維持・増殖条件を検討した結果、MS 培地に 2,4-D 1 μM を添加した条件が効果的であった。

芽生え由来のカルスからの器官分化には基本培地の影響が認められ、MS 培地に比べて BDS 培地が有効であった。これらの培地組成を比較すると、不定芽の形成が優れていた BDS 培地では、無機塩としてのリンおよびビタミンとしての Thiamin-HCl の含有量が MS 培地に比べて多く、窒素および亜鉛などの微量元素が少ないのが特徴である。これらの要素がギョウジャニンニクのカルスからの器官分化に関連していると推測される。

再分化中のカルスを分割して観察したところ、カルスからの茎葉分化は多くの経路を通じて起こることが認められ、ギョウジャニンニクの形態形成の多様性が示唆された。観察された再分化の様式は4つの型に分類された。その中に塊状や棒状組織からの不定芽形成が最も高い頻度であった。したがって、ギョウジャニンニクのカルスからの茎葉分化はこのような組織を経由するのが主要な経路であり、ネギ属植物の中においても特徴的であると考えられる。

金澤ら^{8,22)}はギョウジャニンニク成株の根から不定芽を形成することを観察し、*in vitro* 培養においても芽生えの幼根に不定芽が形成されることを認めている。本実験では、再生した植物体の根からも不定芽を形成するこ

とが観察され、これは金澤らの観察した再分化様式と類似するものと考えられる。

茂田ら⁹⁾はギョウジャニンニクの底盤から誘導された不定芽を液体振盪培養することにより、茎葉の伸長が促進され、根の分化および生育は固形、液体培地とも植物生長調節物質無添加が良好であったことを報告している。Kanazawa ら¹⁰⁾も底盤由来の不定芽からの発根は、植物生長調節物質無添加培地が良好であったことを述べている。本実験でも、植物生長調節物質無添加の場合に不定芽の植物体への生長は良好であったが、NAA 1 μM とカイネチン 1 μM を添加した培地でより高い植物体形成率が得られたことから、後者の培地組成がより有効なものと考えられる。

以上のように、ギョウジャニンニクにおいては、カルスの誘導および再分化について新たな知見が得られ、特に再分化の様式が多様であることが明らかとなった。

文 献

- 1) 高樹英明, 1988. 園学要旨, 昭 63 春: 334-335.
- 2) 高樹英明, 1988. 園学要旨, 昭 63 秋: 751.
- 3) 高樹英明, 1988. 園学要旨, 昭 63 秋: 354-355.
- 4) 高樹英明, 1989. 園学雑, 58(別 1): 360-361.
- 5) 高樹英明, 1990. 園学雑, 59(別 1): 394-395.
- 6) 金澤俊成, 瀬戸 晋, 水越ゆかり, 八鍬利郎, 1991. 園学雑, 60: 635-642.
- 7) 金澤俊成, 小林佐代, 八鍬利郎, 1992. 園学雑, 61: 947-953.
- 8) Kanazawa, T., H. Araki, T. Yakuwa, 1992. Acta Horticulturae, 319: 209-214.
- 9) 茂田潤一, 草柳朋子, 関 昌夫, 1990. 園学雑, 59(別 1): 260-261.
- 10) Kanazawa, T., Y. Nishi, N. Kasai, T. Harada, T. Yakuwa, 1991. J. Fac. Agr. Hokkaido Univ., 64: 279-291.
- 11) 綾部昌則, 角慎一郎, 1991. 第 12 回植物組織培養シンポジウム講演要旨集, p. 76.
- 12) 川崎 涉, 小島甚一郎, 加納正博, 木村 修, 村山玉樹, 1989. 第 11 回植物組織培養シンポジウム講演要旨集, p. 230.
- 13) 川崎 涉, 小島甚一郎, 加納正博, 木村 修, 斎藤朋子, 1989. 第 11 回植物組織培養シンポジウム講演要旨集, p. 229.
- 14) 松原幸子, 伊藤寿美子, 加藤康祐, 1986. 園学要旨, 昭 61 秋: 212-213.
- 15) 佐藤 裕, 浦上敦子, 永井 信, 1988. 育種, 38(別 2): 30-31.
- 16) 首藤博敏, 阿部利徳, 笹原健夫, 1990. 育種, 40(別 1): 212-213.
- 17) 高柳謙治, 1985. 農業および園芸, 60: 165-171.
- 18) 田代洋丞, 高橋英昭, 宮崎貞巳, 金澤幸三, 1984. 佐賀大農集, 57: 115-119.
- 19) 揚 躍生, 朱 政治, 金 武祚, 山本武彦, 1992. 育種, 42(別 1): 40-41.
- 20) Abo El-Nil, M. M., F. W. Zettler, 1976. Plant Sci.

Lett., 6: 401-408.
 21) Dunstan, D. I., K. C. Short, 1977. *Physiol. Plant*, 41:
 70-72.

22) 金澤俊成, 荒木 肇, 八鍬利郎, 1991. 園学雑, 60(別2):
 232-233.

Summary

Callus Formation and Plant Regeneration through *In vitro* Culture of Immature Embryo and Seedling in *Allium victorialis* L. ssp. *platyphyllum* Hult.

Hui-min XUE*, Toshinari KANAZAWA**, Hajime ARAKI***,
 Takashi HARADA and Toshiro YAKUWA

Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo 060, Japan

* Present address: *Inst. for Fundamental Res., Suntory Ltd., Wakayamadai, Shimamoto, Mishima, Osaka 618, Japan*

** *Faculty of Education, Iwate University, Morioka, Iwate 020, Japan*

*** *University Farm, Niigata University, Muramatsu, Niigata 959-17, Japan*

The present study was carried out to establish an efficient propagating condition of *Allium victorialis* L. ssp. *platyphyllum* Hult. through callus culture. The callus was efficiently induced from the seedling on AZ medium containing 1 to 10 μM 2, 4-D, especially in addition to BA. The immature embryo was more suitable for inducing callus than the seedling. It was found that AZ medium was most effective in enhancing callus formation from the immature embryo compared with MS or BDS medium. The rate of adventitious bud-differentiation from seedling-derived callus was higher on BDS medium than on MS medium. Some pathways were recognized in plant regeneration from seedling-derived callus. Shoot growth and root differentiation were accelerated by transferring the adventitious buds to the MS medium supplemented with 1 μM NAA and 1 μM kinetin.