



Title	園芸植物の栄養繁殖に関する基礎的研究 : (第3報) ニンジンの組織培養におけるカルスならびに器官形成
Author(s)	入谷, 正樹; IRITANI, Masaki; 原田, 隆 他
Citation	北海道大学農学部邦文紀要, 12(4), 281-291
Issue Date	1981-06-30
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/11959
Type	departmental bulletin paper
File Information	12(4)_p281-291.pdf



園芸植物の栄養繁殖に関する基礎的研究

(第3報) ニンジンの組織培養における
カルスならびに器官形成

入谷正樹・原田 隆・八 鍬利郎

(北海道大学農学部果樹蔬菜園芸学教室)

(昭和55年11月1日受理)

Basic Studies on the Vegetative Propagation of Horticultural Plants

III. Callus and organ formation in the in vitro culture of tissue segments derived from carrot plant

Masaki IRITANI, Takashi HARADA
and Toshiro YAKUWA

(Department of Horticulture, Faculty of Agriculture,
Hokkaido University, Sapporo, Japan)

緒 言

ニンジンは貯蔵根を食用とする根菜類のため、採種または育種に当たっての本質的優良形質を知る場合根自体を切ってみなければ確認できない。また、ニンジンにおいてもヘテロシスは顕著でF₁化が進められているが、F₁育種に必要な雄性不稔系統の維持が難しいのが現状である。そこで優良形質が見い出された時、無性繁殖によって個体を増殖し、その形質を維持する容易な方法ならびに雄性不稔系統の維持という2点を目的として組織培養の活用を考え、培地・培養部位等の基礎的条件及び大量増殖を行うための方法について検討したので、その結果について報告する。

材料及び方法

I. カルスならびに器官の形成に及ぼす生長調節物質の影響

I-1. オーキシシンとサイトカイニン

i) 培養組織片の作製: ニンジン‘紅芯五寸’の肥大根より形成層を含む柔組織 (Fig. 1 cambium tissue) を取り出して培養した。すなわち肥大根の表皮を取り除き長さ約3 cmに横断したのち、アンチフォルミン液 (有効塩素1%, これに界面活性剤 Tween-20 を数滴添加したものに15分浸漬して表面殺菌を行った。次に滅菌水

で2度洗浄したのち、滅菌したコルクボーラー及び安全カミソリで直径5 mm, 厚さ1 mmの円盤状切片を作り三角フラスコに3切片ずつ置床した。

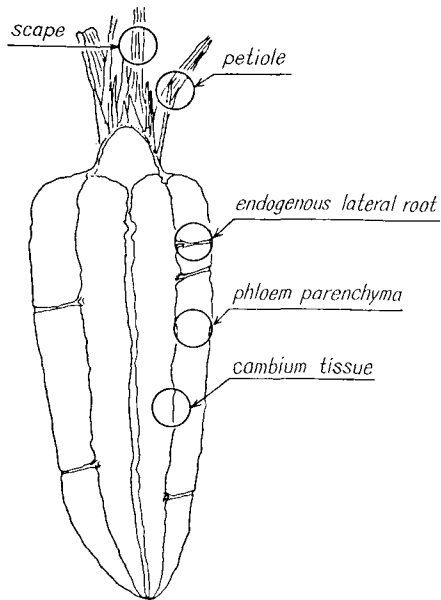


Fig. 1. Various types of tissues from which cultured segments were derived.

ii) 培地の調製: 基本培地としては Murashige and Skoog (以下 MS と略記) 培地を用い、これにシュクロース 20 g/l 及び生長調節物質を加え、1 N-HCl または 1 N-NaOH により pH=5.5 に調整し、最後に粉末寒天 7 g/l を加えた。これを加熱溶解後 100 ml 容三角フラスコに 25 ml ずつ分注し、アルミフイルドで封じたのち、120°C, 1 kg/cm² で 15 分間加圧殺菌した。なお、添加した生長調節物質については、オーキシンとして α -ナフタレン酢酸 (以下 NAA と略記) 0, 10⁻⁸, 10⁻⁷, 10⁻⁶ 及び 10⁻⁵ M の 5 段階、サイトカイニンとして N⁶-ベンジルアデニン (以下 BA と略記) 0, 10⁻⁶ 及び 10⁻⁵ M の 3 段階を用い、それぞれの組合せにより 15 区を設定した。

iii) 培養及び調査: 培養は 25°C 明所 (白色蛍光ランプ 1,000 lx, 16 時間日長) の条件下で行った。培養組織片数は 1 区当り 30 個, 1 フラスコ当り 3 個体で、カルスの大きさは次のような指数で表わした。すなわちカルスをまったく形成していないものを 0, 肉眼で認められる程度のもを 0.1, コメ粒大を 0.5, アズキ粒大を 1, ダイズ粒大を 2, ソラマメ粒大を 3 とし、それ以上のものについては、同様の増大率で指数を定めた。またカルス形成率は調査組織片数に対するカルスを形成した組織片数の割合で示した。

I-2. オーキシン類の比較

i) 培養組織片の作製: I-1. と同様とした。

ii) 培地の調製: I-1. と同様としたが、加えた生長調節物質は NAA, β -インドール酢酸 (以下 IAA と略記), β -インドール酪酸 (以下 IBA と略記), 2, 4-ジクロロフェノキシ酢酸 (以下 2, 4-D と略記) で濃度は各 10⁻⁵ M とした。またサイトカイニンは使用しなかった。

iii) 培養及び調査: I-1. と同様とした。

II. 培養組織片の種類及び大きさ

II-1. 培養組織片の種類

i) 培養組織片の作製: ニンジン '紅芯五寸' を用い Fig. 1. に示すとおり肥大根の形成層部, 内生分岐した側根部 (以下側根部と略記), 節部柔組織 (以下節部と略記) さらに葉柄及び花茎の 5 カ所から組織片を作製した。肥大根部の殺菌法は I-1. に準じ、形成層部・節部は直径 5 mm で厚さ 1 mm の円盤状切片, 側根部は 5 mm 平方で厚さ 1 mm の切片とした。一方葉柄及び花茎はアンチフォルミン液 (有効塩素 2%, Tween-20 数滴添加) に 30 分間浸漬し、葉柄は直径 2~3 mm で厚さ 1 mm, 花茎は直径 4~5 mm で厚さ 1 mm の切片とした。

ii) 培地の調製: 培地の調製はすべて I-1. と同様で、生長調節物質は NAA 0, 10⁻⁶ 及び 10⁻⁵ M とした。

なお、花茎ではサイトカイニンの影響もみるため、NAA 10⁻⁶, 10⁻⁵ M, BA 0, 10⁻⁶ M を組合せた 4 区を設定した。

iii) 培養及び調査: I-1. と同様とした。

II-2. 組織片の大きさ

i) 培養組織片の作製: ニンジン '紅芯五寸' の形成層部 (Fig. 1) を用い、殺菌法その他 I-1. と同様にして円盤状切片を作製した。大きさは直径 5 mm で厚さ 1 mm のもの、直径 10 mm で厚さ 2 mm のもの、及び直径 10 mm で厚さ 6 mm のものの 3 種とした。

ii) 培地の調製: I-1. と同様とした。

iii) 培養及び調査: I-1. と同様とした。

III. 品種間の比較

i) 培養組織片の作製: 3 品種 '紅芯五寸' '黒田五寸' '金時' の葉柄を用い II-1. と同様にして切片を作製した。

ii) 培地の調製: I-1. と同様とし、生長調節物質は NAA 10⁻⁶ 及び 10⁻⁵ M とした。

iii) 培養及び調査: I-1. と同様とした。

IV. 再生幼植物体の発育及び増殖

I~III. で得られた幼植物体について、鉢上げ時の活着率を高めその後の植物体の発育を良くするために、無菌的に幼植物体を分離し、生長調節物質を含まない基本培地に移植してその後の経過を観察した。

実験結果

I. カルスならびに器官の形成に及ぼす生長調節物質の影響

I-1. オーキシンとサイトカイニン

i) カルスの形成: カルス形成率を Fig. 2 に、カルスの生長を Fig. 3 に示した。カルス形成は培養開始後 1 週ごろから始まり、すべての区で認められ、NAA 高濃度区ではほぼ 100% の形成率を示した。カルスの生長は NAA 10⁻⁶ M, BA 10⁻⁶ M を含む区で最も大きく、次いで NAA 10⁻⁶ M, BA 10⁻⁵ M 区となった。また生長調節物質をまったく含まない区でも 57% のカルス形成、ならびに指数にして 0.8 の生長を示したことは、ニンジンにおける内生的な植物ホルモンレベルの高さを示すものと思われる。一方、カルスの誘導ならびに生長に及ぼす BA の影響は顕著には見られなかったが、カルスの性状に関しては大きな差異が認められ、BA を含まない区のカルスは緑色で比較的水分の多い軟かいものとなったが、BA 濃度が高くなるにつれてカルスの緑色は失われ黄褐色または白色の硬いカルスとなった。このようなカルスからは次に述べる器官形成が起りにくい傾向が見られた。

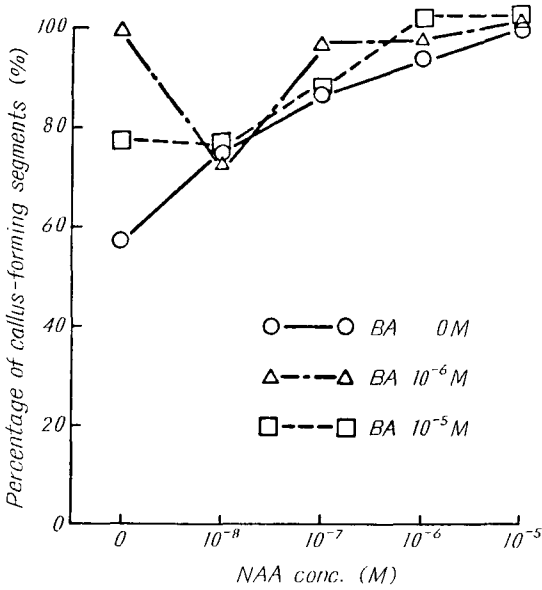


Fig. 2. Effect of growth regulators on callus formation in culturing disk-shaped segments (5 mm in diameter, 1 mm in thickness) derived from cambium tissue of carrot tap root. (culture period: 8 weeks).

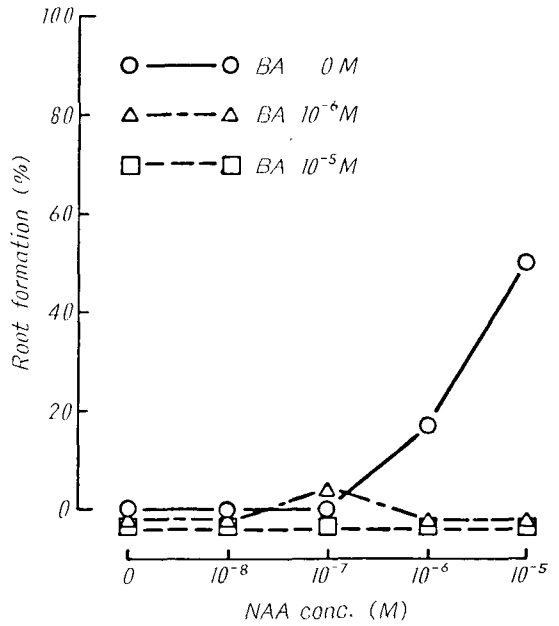


Fig. 4. Effect of growth regulators on root formation in culturing disk-shaped segments (5 mm in diameter, 1 mm in thickness) derived from cambium tissue of carrot tap root. (culture period: 8 weeks).

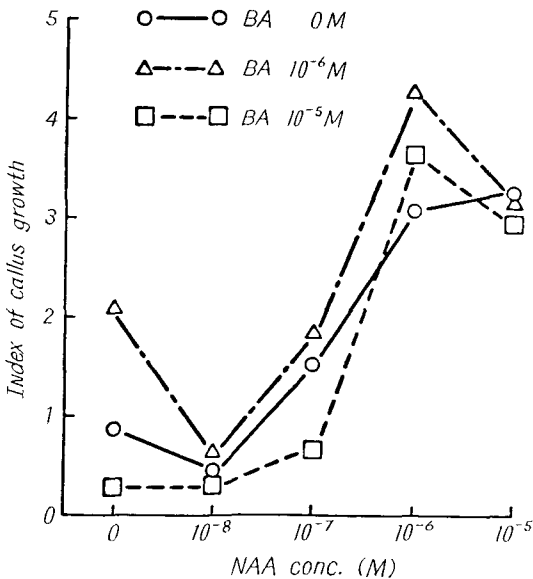


Fig. 3. Effect of growth regulators on callus growth in culturing disk-shaped segments (5 mm in diameter, 1 mm in thickness) derived from cambium tissue of carrot tap root. (culture period: 8 weeks)

growth index 0: no callus formation, 1: the same size as rice grain, 2: the same size as AZUKI bean, 3: the same size as soybean, 4: the same size as broad bean.

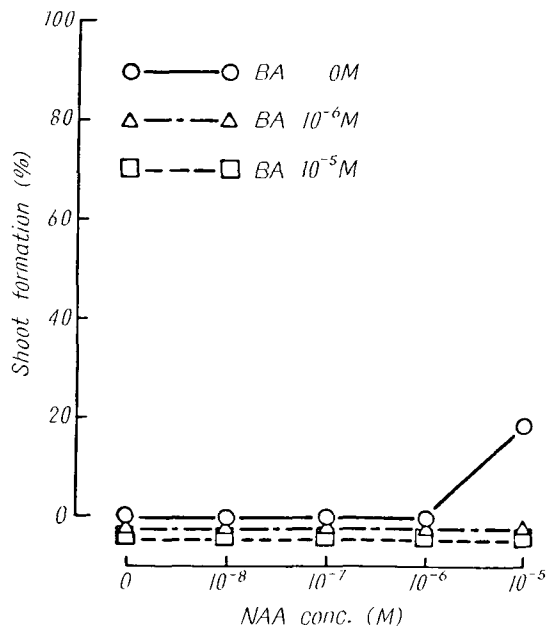


Fig. 5. Effect of growth regulators on shoot formation in culturing disk shaped segments (5 mm in diameter, 1 mm in thickness) derived from cambium tissue of carrot tap root. (culture period: 8 weeks).

ii) 器官形成: 根形成率を Fig. 4 に示した。根の形成は、培養開始3週間後、すなわちカルス誘導後約2週間ほどでカルスからの再分化が認められるようになった。生長調節物質の影響をみると、BA を含まない NAA 10^{-6} 、 10^{-5} M 区で高い形成率を示した。一方、BA 添加区では BA 10^{-6} M+NAA 10^{-7} M 区でわずか4%ほど分化したに過ぎなかった。根は比較的透明で2~3 cm 伸長したが、中には短い細根が密生したもの、太い主根と側根が発生したものなどがみられた。茎葉形成は根を形成したカルスにおいてのみ起こり、根形成後約2週間ほどで分化を開始した。茎葉形成率は Fig. 5. のとおりで、BA 無添加の NAA 10^{-5} M 区のみで約20%の茎の分化がみられた。茎数は分化初期には2~3本であったが、培養を続けるにつれ大量に形成されるようになった。以上のように、形成層を含む柔組織切片を培養した場合の器官形成にはオーキシン高濃度単用が有効であった。

1-2. オーキシン類の比較

i) カルスの形成: カルス形成率の経時的变化を Table 1 に示した。カルスはいずれのオーキシン類でも誘導され、培養後6週間までに形成率はほぼ一定となった。2, 4-D のカルス形成率はやや劣ったが全体に高いカルス形成率を示し、オーキシンの種類による影響はみられなかった。カルス生長の経時的变化は Fig. 6 に示すとおりで、培養6週間後までは NAA, IAA, IBA と同程度の生長を示したが、培養を続けるにつれ IAA では生長が衰え、全体的に生長の遅れた 2, 4-D と同程度となった。カルスの性状は NAA, IAA, IBA 間で差は見られなかったが、2, 4-D においては硬いカルスが誘導された。

ii) 器官形成: 根及び茎葉形成率を Fig. 7 に示した。根の形成は NAA, IBA で高く、茎葉形成は NAA

Table 1. Changes in callus formation in culturing carrot cambium tissue (5 mm in diameter, 1 mm in thickness) on medium containing auxins

auxins conc. 10^{-5} M	culture period (weeks)					
	2	4	6	8	10	12
IAA	98.0%	98.0%	98.0%	98.0%	98.0%	98.0%
NAA	94.5	94.5	94.5	97.9	97.9	97.9
2, 4-D	89.9	89.8	93.5	93.5	93.5	93.5
IBA	95.5	95.5	95.5	95.5	95.5	95.5

で最も高く(39%), 次いで IBA となった。しかし、2, 4-D では根および茎葉の形成はまったく認められなかった。形成された根および茎葉の性状に関して差は認められなかった。このように、4種のオーキシンの作用を 10^{-5} M の濃度で比較した場合においては、NAA がカルス誘導、器官形成に優れており、NAA 10^{-5} M 単用が器官形成に最も有効と思われた。

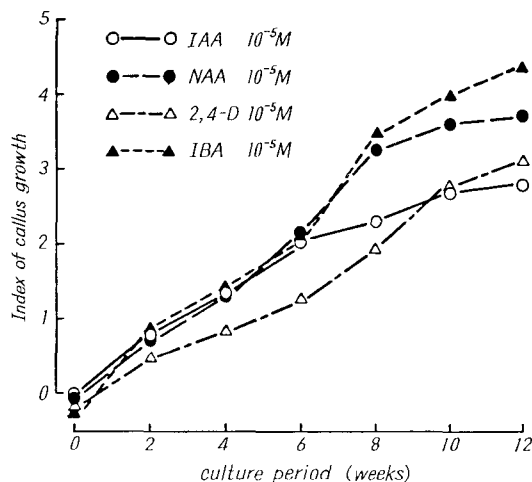


Fig. 6. Changes in callus growth in culturing carrot cambium tissue (5 mm in diameter, 1 mm in thickness) on medium containing auxins. (growth index are shown in Fig. 3).

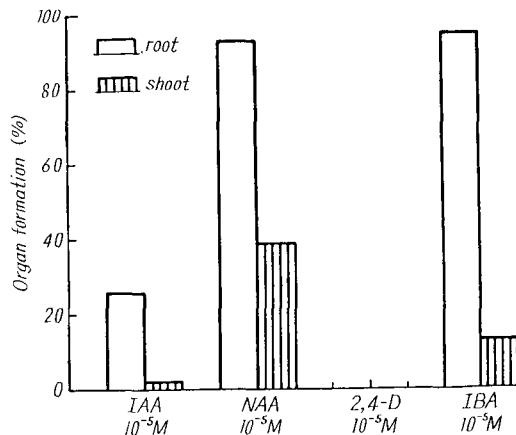


Fig. 7. Effect of growth regulators on organ formation in culturing disk-shaped segments (5 mm in diameter, 1 mm in thickness) derived from cambium tissue of carrot tap root. (culture period: 8 weeks).

II. 培養組織片の種類及び大きさ

II-1. 培養組織片の種類

i) カルスの形成：肥大根部培養におけるカルス形成率及び生長を Fig. 8 に示した。カルス形成、生長と

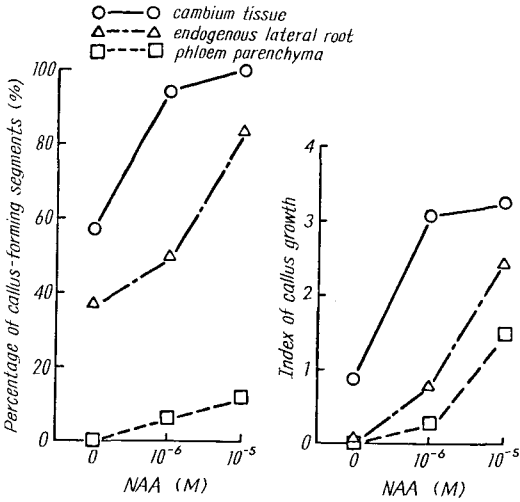


Fig. 8. The formation and growth of callus in culturing various types of segments of carrot tap root. (culture period: 8 weeks. growth index are shown in Fig. 3.)

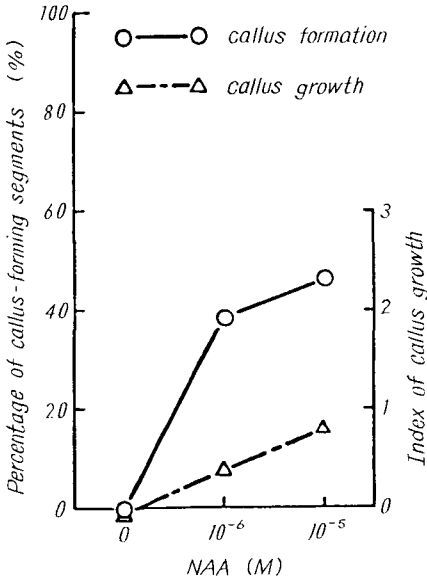


Fig. 9. Effect of growth regulators on the formation and growth of callus in culturing segment derived from petiole of carrot. (culture period: 8 weeks)

も形成層部においてまさっていたが、側根部でも NAA 10⁻⁵ M 区でかなり高いカルス形成、生長を示した。節部ではカルス形成率が著しく劣った。葉柄、花茎のカルス形成率及び生長は Fig. 9, 10 に示すとおりで、カルス

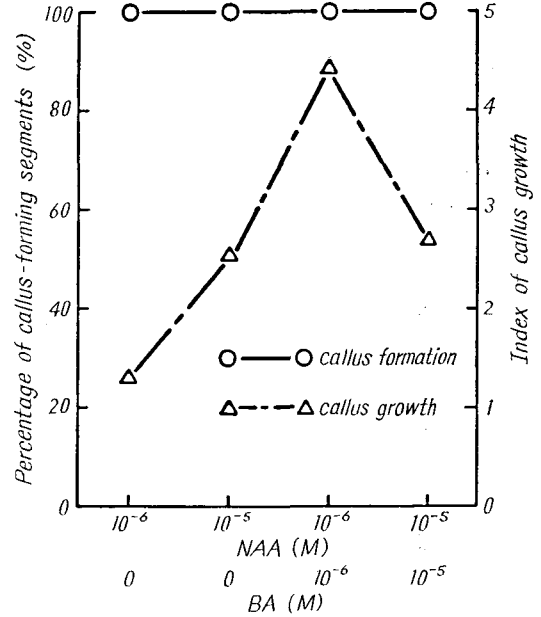


Fig. 10. Effect of growth regulators on the formation and growth of callus in culturing segment derived from scape of carrot. (culture period: 8 weeks. growth index are shown in Fig. 3.)

Table 2. Percentage of callus clumps forming root and shoot in culture of various types of tissues of carrot. (culture period: 8 weeks)

tissues of carrot	NAA (M)	Organ formation (%)	
		root	shoot
cambium tissue	10 ⁻⁶	17.7	0.0
	10 ⁻⁵	93.0	39.0
endogenous lateral root	10 ⁻⁶	23.3	10.0
	10 ⁻⁵	65.4	50.0
petiole	10 ⁻⁶	5.6	0.0
	10 ⁻⁵	57.1	28.6
scape*	10 ⁻⁶	15.4	0.0
	10 ⁻⁵	90.0	25.0
phloem parenchyma	10 ⁻⁶	3.3	0.0
	10 ⁻⁵	7.7	3.8

* no organ formation on medium containing BA.

の形成率は花茎ではすべての区で100%であったが、葉柄は最も高い 10^{-5} M区で45%程度であった。またカルスの生長も花茎の方がすぐれ、葉柄は劣った。

ii) 器官分化：根、茎葉形成率を Table 2 に示したが、各部位とも根の形成は NAA 10^{-6} 、 10^{-5} M の両区でみられたが、茎葉は主として NAA 10^{-5} M 区のみで形成された。側根部では NAA 10^{-6} M 区においても茎葉形成がみられ、器官形成能力の高い部位であると思われる。根の形成率は形成層部、花茎部で90%台と高く、側根部、葉柄はこれに次ぎ、節部では著しく劣った。茎葉の形成率は側根部が50%で最も高く、形成層部、葉柄、

花茎がこれに次ぎ、節部は著しく劣った。花茎の BA 添加区では器官形成が認められず、葉柄及び花茎においても生長調節物質に対する反応は、肥大根と同様に、器官形成には NAA 10^{-5} M 単用が有効と思われる。

II-2. 培養組織片の大きさ

i) カルスの形成：カルスは組織片の形成層の部分から誘導が始まり、やがて組織片全体を覆うように生長していった。Fig. 11 に示したように、直径5 mm、厚さ1 mm の切片で NAA 濃度の低い場合にややカルス形成率は低下したが、他の切片ではほぼ100%に近い形成率を示し、組織片が大きくなるほど生長調節物質を添加し

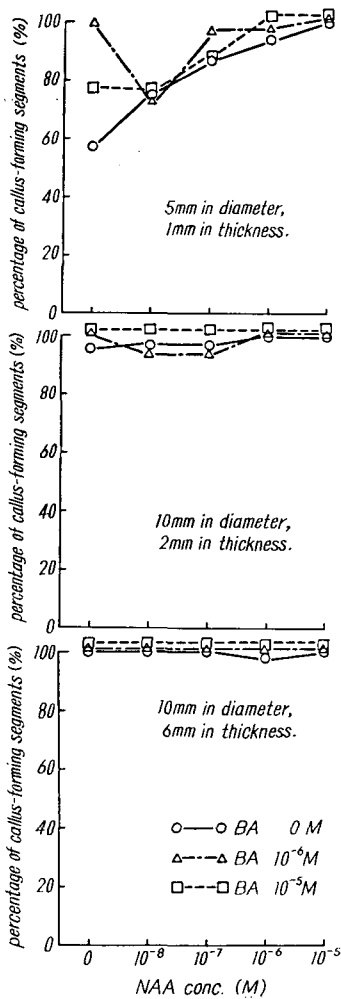


Fig. 11. Differences in callus formation in culturing segments of various sizes derived from cambium tissue of carrot tap root. (culture period: 8 weeks).

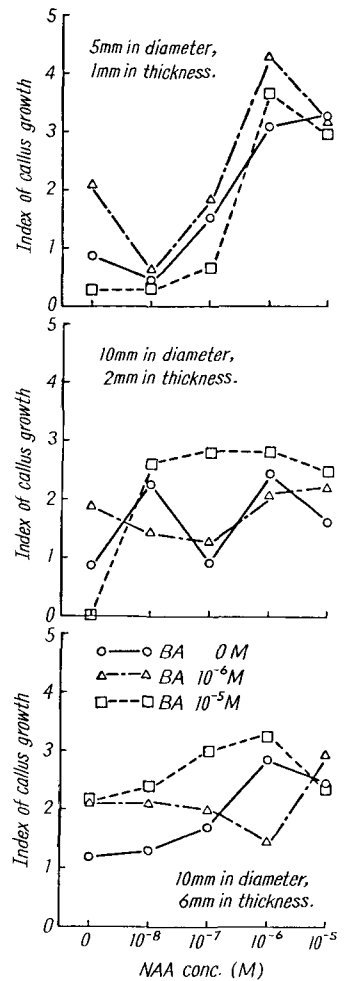


Fig. 12. Differences in callus growth in culturing segments of various sizes derived from cambium tissue of carrot tap root. (culture period: 8 weeks. growth index are shown in Fig. 3).

Table 3. Number of segments forming roots in culturing the segments of various sizes derived from carrot tap root on medium containing NAA and BA. (culture period: 8 weeks)

growth regulators		number of segments forming roots		
NAA (M)	BA (M)	a	b	c
0	0			
10 ⁻⁸	0			
10 ⁻⁷	0			
10 ⁻⁶	0	3/17		
10 ⁻⁵	0	9/18	5/6	2/12
0	10 ⁻⁶			
10 ⁻⁸	10 ⁻⁶			
10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	1/24		
10 ⁻⁶	10 ⁻⁶			
10 ⁻⁵	10 ⁻⁶			1/12
0	10 ⁻⁵			
10 ⁻⁸	10 ⁻⁵			
10 ⁻⁷	10 ⁻⁵			3/5
10 ⁻⁶	10 ⁻⁵			
10 ⁻⁵	10 ⁻⁵			1/8

a: 5 mm in diameter, 1 mm in thickness.
 b: 10 mm in diameter, 2 mm in thickness.
 c: 10 mm in diameter, 6 mm in thickness.

なくとも高いカルス形成率を示した。カルスの生長では、組織片が小さいほど生長調節物質、特にオーキシンの影響を受けカルスが生長したが、組織片が大きくなると生長調節物質の影響はあまりみられなかった (Fig. 12)。

ii) 器官形成：根を形成した組織片数を Table 3 に示した。これから明らかなように、組織片の小さい方が根を形成しやすく、生長調節物質の比較では、BA 無添加の NAA 10⁻⁵ M 区での形成率が高かった。莖葉は直径 5 mm、厚さ 1 mm のものの発根したカルスにおいてのみ形成され、前述の実験と同様の結果を示した。以上より、カルス及び器官形成には小さい組織片の方が適していると思われる。

III. 品種間の比較

i) カルスの形成：カルス形成率ならびに生長の経時的变化を Table 4, 5 に示した。‘紅芯五寸’の NAA 10⁻⁶ M 区以外ではほぼ 100% に近いカルス形成率を示

Table 4. Changes in callus formation in culturing petiole of various cultivars of carrot

cultivar	NAA (M)	culture period (weeks)					
		2	4	6	8	10	12
Kōshin-Gosun	10 ⁻⁶	34.5	40.0	50.0	50.0	50.0	50.0
	10 ⁻⁵	88.9	89.3	100.0	100.0	100.0	100.0
Kuroda-Gosun	10 ⁻⁶	87.0	90.5	90.5	90.5	90.5	90.5
	10 ⁻⁵	57.7	87.5	100.0	100.0	100.0	100.0
Kintoki	10 ⁻⁶	46.2	92.9	92.3	100.0	100.0	—*
	10 ⁻⁵	33.3	95.8	95.8	95.8	100.0	—

* no value was obtained because of finishing of culture.

Table 5. Changes in callus growth in culturing petiole of various cultivars of carrot

cultivars	NAA (M)	culture period (weeks)					
		2	4	6	8	10	12
Kōshin-Gosun	10 ⁻⁶	0.1	0.1	0.3	0.4	0.5	0.6
	10 ⁻⁵	0.1	0.3	1.0	2.3	3.5	4.3
Kuroda-Gosun	10 ⁻⁶	0.3	0.6	0.8	1.4	1.4	1.4
	10 ⁻⁵	0.1	0.5	1.2	2.4	2.4	2.9
Kintoki	10 ⁻⁶	0.1	0.5	1.1	1.4	1.8	—*
	10 ⁻⁵	0.1	0.4	1.3	1.7	1.9	—

* no value was obtained because of finishing of culture.

した。カルスの生長を見ると、3 品種とも NAA 10⁻⁵ M 区が優れ、品種では‘紅芯五寸’が最も良く、‘金時’では他の 2 品種に比べやや劣った。

ii) 器官形成：根、莖葉の形成を Table 6 に示した。3 品種とも NAA 10⁻⁵ M 区で高い根の形成率を示し、品種間に大きな差は認められなかった。一方、莖葉の形成は今までと同様 NAA 10⁻⁵ M 区でのみ起こり、‘紅芯五寸’‘黒田五寸’で 23~24% の形成が見られた。しかし、‘金時’では根の形成率が高いにもかかわらず、莖葉の形成がまったく認められなかった。このように、器官形成に関して欧州系品種である‘紅芯五寸’‘黒田五寸’と東洋系品種である‘金時’間に能力的に差異があるのではないかと考えられる。

Table 6. Number of callus clumps forming organs in culturing petiole of various cultivars of carrot. (culture period: 8 weeks)

cultivars	NAA (M)	number of forming organs	
		root	shoot
Kōshin-Gosun	10 ⁻⁶	5/23 (21.7)*	0
	10 ⁻⁵	24/25 (96.0)	6/25 (24.0)
Kuroda-Gosun	10 ⁻⁶	8/15 (53.3)	0
	10 ⁻⁵	11/13 (84.6)	3/13 (23.1)
Kintoki	10 ⁻⁶	2/13 (15.4)	0
	10 ⁻⁵	14/15 (93.3)	0

* percentage of organ-forming.

IV. 再生幼植物体の発育及び増殖

これまでの実験における器官形成の過程は、培地に組織片を置床後約1週間でカルスの誘導、生長が開始され、カルス誘導後約2週間で根の分化が始まり、茎葉は根を分化した組織においてのみ、早いもので根分化後約2週間で分化を開始した。茎葉数は分化初期には2~3本であったが、その後分化が活発となり培養容器内で大量に形成されるようになり、培養開始後約8週間で幼植物体が得られた。この多量の幼植物体をより確実に生育させ

るために Fig. 13 に示したような方法を用いて観察した。すなわち、密生した幼植物体を無菌的に取り出し、各々1個体ずつの幼植物体に分割し、比較的生育の進んだものから大型試験管に移植した。この移植培地は MS 基本培地のみとし、ここで根の生育を促し各個体を健苗にして、鉢上げ時の活着率を高め再生個体の維持を図った。一方、生育初期のものは NAA を添加した培地に移植し生育を進めたのち、上述の方法で鉢上げした。こうして *in vitro* で再生された個体は、早いもので培養開始後12週間で鉢上げが可能となった。また、茎葉形成したカルスにはまだ器官分化能力が失われておらず、このカルスを再度新しい培地に置床することによって植物体の再生を継続させることができた。したがって、*in vitro* の植物体再生組織片率はあまり高率ではなかったが、分割移植することによって多数の植物体を得ることが可能となる。鉢上げ後の生育をみると、2週間後ではまだ健全個体とはなっていないが、4週間後では完全に活着して新葉も展開し、12週間後では圃場で生育しているニンジンと変わらない程になり、根も直径2cm程に肥大し始めた。

考 察

ニンジンの組織培養については多くの研究^{12~14)}がなされ、プロトプラストからの植物体再生にも成功している^{1,3)}。本研究では、これらの研究を踏まえた上で、実際的に農業利用を図る目的で栄養繁殖に関する実験を

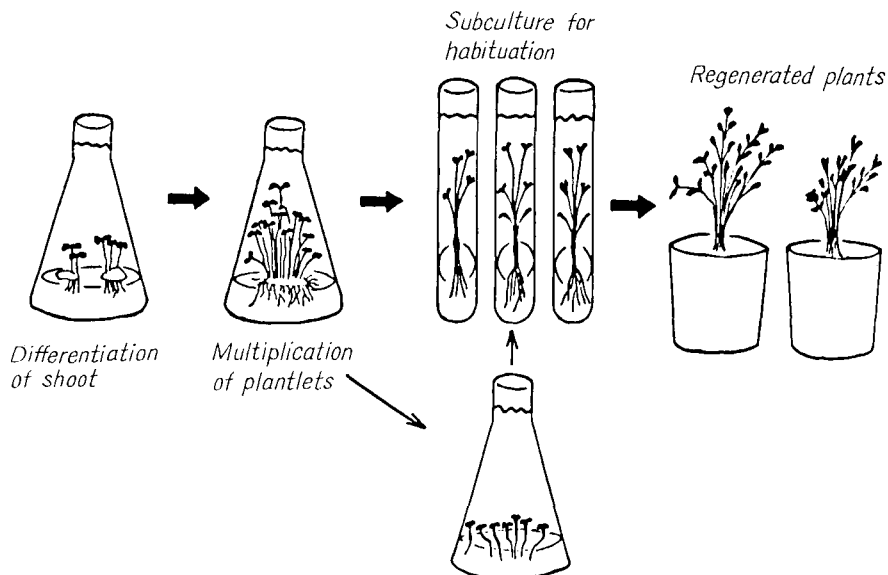


Fig. 13. Growth and multiplication of plantlets.

行った。

1. カルスの形成 一般に、カルス誘導ならびに器官形成はオーキシンとサイトカイニンの相互作用によって変化するとされるが^{6,9,11)}、本実験ではオーキシン、特に NAA 単独添加がカルス誘導及び器官形成に効果的であった。すなわち、継代培養をせず同一培地でカルス誘導、器官形成を行わせる場合、オーキシンの効果が大きくサイトカイニンの影響は少ないものと推察され、同様な結果は森⁷⁾によっても報告されている。次に組織片の部位についてみると WIGGANS¹⁶⁾は肥大根の各部位、すなわち形成層、節部及び木部柔組織の培養を行いカルスならびに器官形成の比較を行ったが、本実験のように形成層、節部、側根部、葉柄及び花茎の五つの部位を同一条件で培養した例は他にみられない。実際に大量増殖しようとする場合はできる限り試料を有効に利用することが望ましく、その意味において貴重な材料となるであろう。カルス形成はすべての部位でみられたが、カルス生長は形成層が最も良好で、これは WIGGANS¹⁶⁾の報告と一致した。また、組織片が小さいほどカルスの形成が良好であった。カルスの生長にはサイトカイニン(BA)を添加した方が良く、NAA 10^{-6} M + BA 10^{-6} M 区で生長が最も旺盛であった。しかし、BA 添加区はカルスの性状が NAA 単用区と異なり、白色の硬いカルスとなるものが多く、BA 濃度が高まることこの傾向も強まった。また、2, 4-D 10^{-5} M 区でもこの傾向がみられたが、これは石原²⁾によっても 2, 4-D の高濃度による作用として報告されている。

2. 器官形成 器官形成は主に形成層部、側根部、葉柄及び花茎で起こり、これらの部位にはいわゆる TORREY¹⁵⁾のいう meristemoids が多く含まれるものと考えられる。特に側根部の培養例は筆者らの知る限りでは報告されていないが、茎葉の形成率が最も高いことが明らかとなった。一連の実験において器官形成も高濃度の NAA (10^{-5} M) において優れた形成率を示し、オーキシン (IAA) が発根に有効であるとした WIGGANS¹⁶⁾、LEVINE ら^{4,5)}の報告と一致した。また、石原²⁾、REINERT ら¹⁰⁾はココナットミルク+オーキシン (2, 4-D, IAA) が根の形成には阻害的であることを報告しているが、本研究ではココナットミルクは用いなかったので比較はできない。サイトカイニンは茎葉形成にはかえって阻害的に働く結果となり、これは森⁷⁾の報告とも一致する。茎葉は発根したカルスにおいてのみ分化し、これらは幼植物体にまで生長した。森⁷⁾によると、茎葉形成は培養開始後 2 カ月くらいで始まり、形成個体数も 10 個体

前後であったが、本実験では早いもので培養開始後 5 週ごろから茎葉形成が認められ、2 カ月後では十分に茎葉を形成し、その数もかなり多くなった。また、東洋系品種‘金時’では NAA 10^{-5} M 区で発根は多いにもかかわらず茎葉の形成がみられず、欧州系品種の‘紅芯五寸’‘黒田五寸’との間には差があるものと思われる。

3. 再生幼植物体の発育及び増殖 *in vitro* で大量に形成された植物体をそのまま鉢上げしたのでは再生個体の活着が思わしくないことがわかり、効率的に幼植物体を発育、増殖させる方法について検討した。すなわち、再生植物体を無菌的に 1 個体ずつに分離し、新しい培地に移植することによって再生個体数の確保を図った。移植用培地はオーキシンを添加せず基本培地のみとした方が根の生長が促された。また一般的に植物体再生は、茎葉形成培地で継代培養し茎葉を形成させ、その後発根培地で根を形成させる⁸⁾が、本実験では同一培地で根、茎葉を形成させることができ、労力、時間の軽減にも有効と思われる。

以上のように、器官形成には MS 培地 + NAA 10^{-5} M で充分可能であり、組織培養による栄養繁殖は実用化できるものと考えられる。

摘 要

ニンジンの無性繁殖による形質の維持、増殖を目的として組織培養法の実験を行った。

材料は主に‘紅芯五寸’を用い、基本培地に Murashige and Skoog の培地、生長調節物質には主に NAA を添加した。結果の概略は以下の通りである。

1. オーキシン (NAA) とサイトカイニン (BA) の影響をみると、NAA 濃度が高い区 (10^{-6} M 及び 10^{-5} M) でカルス形成率は高く、カルスの生長は NAA 10^{-6} M + BA 10^{-6} M で最も良好であった。根の分化は NAA 10^{-6} M 及び 10^{-5} M 区でみられ、茎葉分化は BA 無添加で NAA 10^{-5} M 添加の区でのみ認められた。また NAA, IAA, IBA, 2, 4-D の比較では NAA 10^{-5} M においてカルス形成、器官分化ともに優れていた。

2. 植物体の各部位別の培養では、カルスの形成、生長とも、形成層部と花茎部がまさり、側根部はこれに次ぎ、節部、葉柄部は劣った。根の分化率は、NAA 10^{-5} M 区で形成層部 93%、花茎 90%、側根部 65%、葉柄 57%、節部 8% の順であった。茎葉分化率は、各部位とも NAA 10^{-5} M 区で側根部 (50%) が最も良く、ついで形成層部 (39%)、葉柄 (29%)、花茎 (25%)、節部 (4%) であった。培養組織片の大きさの比較では、組織片の小さいもの (直

径5 mm, 厚さ1 mmの円盤状切片) がカルス生長, 器官分化に優れていた。

3. 3品種間の比較では, 欧州系品種の‘紅芯五寸’と‘黒田五寸’との間に器官分化についての差は見られず, NAA 10^{-5} M区で根, 茎葉を分化したが, 東洋系品種‘金時’は, 前二者と異なり, 根の分化率は高かったが茎葉分化は認められなかった。

4. 茎葉は, 根を分化したカルス塊のみから発根後に発生し, やがて *in vitro* で大量に形成された。これらを根1~2本, 葉2~3枚をもつような一団体ずつの幼植物体に分割し, 基本培地のみの大型培養器に移植することによって, 根の数を多くすると同時に発育を促し, そして再生個体数を多くすると共に鉢上げ時の活着率も高め得た。

引用文献

- GRAMBOW, H. J., KAO, K. N., MILLER, R. A. and GAMBORG, O. L.: Cell division and plant development from protoplasts of carrot cell suspension cultures, *Planta*, **103**: 348-355. 1972
- 石原愛也: ニンジンの貯蔵根起源のカルス培養, とくにカルスの生長と器官の形成について, 日作紀, **34**: 225-233. 1965
- KAMEYA, T. and UCHIMIYA, H.: Embryoids derived from isolated protoplasts of carrot, *Planta*, **103**: 356-360. 1972
- LEVINE, M.: The growth of normal plant tissue *in vitro* as affected by chemical carcinogens and plant growth substances. I. The culture of the carrot tap root meristem, *Amer. J. Bot.*, **37**: 445-448. 1950
- LEVINE, M.: The effect of growth substances and chemical carcinogens on fibrous roots of carrot tissue grown *in vitro*, *Amer. J. Bot.*, **38**: 132-138. 1951
- LINSMAIER, E. M. and SKOOG, F.: Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures, *Physiol. Plant.*, **18**: 100-127. 1965
- 森 憲昭: 組織培養によるニンジンのF₁育成に関する研究(第1報). 培養部位・培地および培養温度について, 園芸学会昭和53年度春季大会研究発表要旨, 210-211. 1978
- MURASHIGE, T.: Clonal crops through tissue culture, Edited by W. BARZ, E. REINHARD and M. H. ZENK, In plant tissue culture and its bio-technological application. Springer-Verlag, Berlin., 392-403. 1977
- MURASHIGE, T. and SKOOG, F.: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiol. Plant.*, **15**: 473-497. 1962
- REINERT, J.: Über die Kontrolle der Morphogenese und die Induktion von Adventivembryonen an Gewebekulturen aus Karotten, *Planta*, **53**: 318-333. 1959
- SKOOG, F. and MILLER, C. O.: Chemical regulation of organ formation in plant cultured *in vitro*, *Symp. Soc. Exp. Biol.*, **11**: 118-130. 1957
- STEWART, F. C., MAPES, M. O. and SMITH, J.: Growth and organized development of cultured cells. I. Growth and division of freely suspended cells, *Amer. J. Bot.*, **45**: 693-703. 1958
- STEWART, F. C., MAPES M. O. and MEARS, K.: Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures grown from freely suspended cells, *Amer. J. Bot.*, **45**: 705-708. 1958
- STEWART, F. C.: Growth and organized development of cultured cells. III. Interpretations of growth from free cell to carrot plant, *Amer. J. Bot.*, **45**: 709-713. 1958
- TORREY, J. G.: The initiation of organized development in plants, *Advan. Morphogen.*, **5**: 39-91. 1966
- WIGGANS, S. C.: Growth and organ formation in callus tissues derived from *Daucus carota*, *Amer. J. Bot.*, **41**: 321-326. 1954

Summary

The present experiments were carried out to establish a method of vegetative propagation of carrot with excellent qualities. Special efforts were made to examine the effects of growth regulators, the differences in the type of tissues or cultivars and the influence of the size of the cultured segments related to callus and organ formation. The medium was prepared by adding 20 g/l sucrose, 7.0 g/l agar and growth regulators (N⁶-benzyladenine and NAA) to Murashige Skoog's medium (MS medium). The cultures were incubated under conditions of constant temperature (25°C) and 16-hour illumination with a 40-watt daylight fluorescent lamp (1,000 lx) per day. The experimental results are summarized as follows.

- In experiments using the disk-shaped seg-

ments (5 mm in diameter, 1 mm in thickness) of tap root tissue with cambium of cv. 'Kōshin-Gosun', callus formation was excellent at high concentrations of NAA (10^{-6} M, 10^{-5} M). The callus growth was optimal at 10^{-6} M of NAA and 10^{-6} M of BA. Root formation was observed at 10^{-6} M and 10^{-5} M of NAA. Shoot formation occurred on medium containing only 10^{-5} M of NAA.

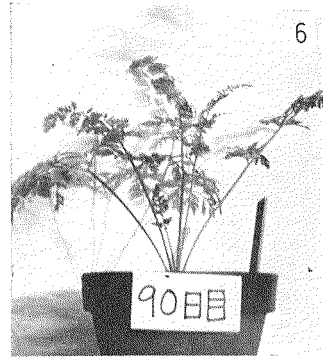
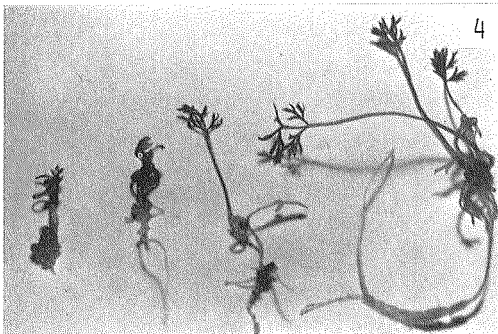
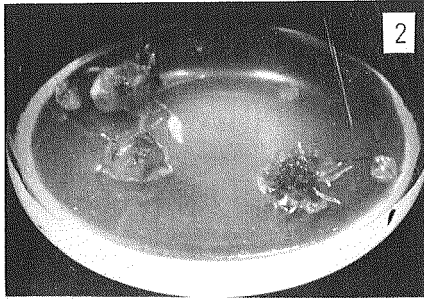
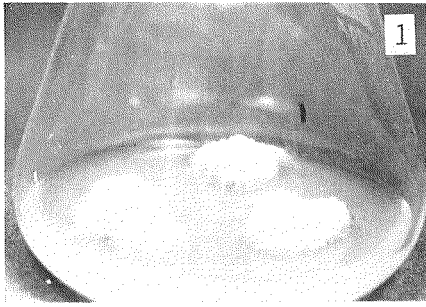
In comparison of NAA, IAA, IBA and 2, 4-D, callus and organ formation were optimal at 10^{-5} M of NAA.

2. Segments derived from various types of tissues were cultured on MS medium containing 10^{-6} M and 10^{-5} M of NAA. The formation and growth of callus were optimal in the tissue segments of the cambium of tap root and scape, good in the segments with endogenous lateral root, and not so good in the segments of the phloem parenchyma of tap root and petiole. Percentage of root formation was 93% in cambium tissue, 90% in scape, 65% in endogenous lateral root, 57% in petiole, 8% in phloem parenchyma. Shoot formation was observed in each segments at 10^{-5} M of NAA and it was optimal in the segments of endogenous lateral root (50%), followed by cambium tissue (39%), petiole (29%), scape (25%) and phloem parenchyma (4%). A definite relationship between organ formation and the size of segments were observed using

various sizes of tissue disks. Segments of small size (5 mm in diameter, 1 mm in thickness) were better than larger ones (10 mm in diameter, 2 mm in thickness and 10 mm in diameter 6 mm in thickness) for callus growth and organ formation.

3. Tissue segments of two European cultivars 'Kōshin-Gosun', 'Kuroda-Gosun' and an Oriental cultivar 'Kintoki' were cultured on MS medium containing 10^{-6} M and 10^{-5} M of NAA. With regards to the organ formation, no difference was seen between root and shoot formation of two European cultivars, namely in all these cultivars, root and shoot formation were equally observed at 10^{-5} M of NAA. In the Oriental cultivar 'Kintoki', root formation was induced at 10^{-5} M of NAA but no shoot formation was seen at any other concentration of NAA.

4. Shoot formation occurred only on callus clumps with roots already formed. One clump with many shoots was divided into several pieces with shoots and roots or with one shoot. Then the pieces were transplanted on the MS medium containing no growth regulators in order to enhance root growth. After 3 weeks of culturing for habituation, many plantlets were induced in test tubes, and then many completely normal plants were obtained through transplanting into soil.



PLATE

1. Callus formation in the tissue segment derived from carrot tap root.
2. Root formation from callus.
3. Shoot formation from callus.
4. Growth of regenerated plantlet.
5. Transplant of plantlet culturing for habituation on medium without growth regulators.
6. Growth of carrot plant after transplanting to soil.