



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ベニヒメリンドウ(<i>Exacum affine</i> Balf.)組織のin vitroの培養における器官形成及び固体再生に関する研究
Author(s)	徐, 品三; Xu, Pinsan; 原田, 隆 他
Citation	北海道大学農学部農場研究報告, 27, 69-77
Issue Date	1991-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/13410
Type	departmental bulletin paper
File Information	27_p69-77.pdf



ベニヒメリンドウ (*Exacum affine* Balf.) 組織の *in vitro* 培養 における器官形成及び個体再生に関する研究

徐 品三・原田 隆・八俣 利郎

(北海道大学農学部果樹蔬菜園芸学講座)

(1990年12月28日受理)

緒 言

ベニヒメリンドウ (*Exacum affine* Balf.) はリンドウ科、エクサカム属の植物で、インド洋にあるソコトラ島原産の非耐寒性の一、二年草であり、花壇用や鉢物用の観賞植物として利用されている¹⁾。ベニヒメリンドウの需要は近年増大しつつあり、栄養繁殖による大量増殖が可能となれば、その効用が非常に大きいと考えられる。近年、観賞植物においては組織培養の技術が広く応用されつつあり、すでに多くの草花などでは、茎、茎頂及び葉などの *in vitro* 培養による大量増殖や培養苗の養成が行われている^{2,3,4,6)}。

本研究ではベニヒメリンドウの茎及び葉の組織から個体を再生させる培養系を確立するため、*in vitro* 培養における器官形成及び個体再生に及ぼす生長調節物質及びショ糖の影響について検討するとともに、*in vitro* 培養によって得られた培養物の器官を新しい培地に移殖して培養した場合のカルス、シュート及び根の形成に及ぼす植物生長調節物質の影響についても検討した。

材料及び方法

実験1. 茎及び葉の切片の培養におけるカルス、シュート及び根の形成に及ぼす生長調節物質の影響

(1) 茎切片の培養 鉢植えのベニヒメリンドウ (*Exacum affine* Balf.) の成植物の中位にある柔軟な茎を選び、節間部から取り出した長さ約5 mmの切片を培養した。培養切片数は容器(100 ml

三角フラスコ)当たり5とし、1区当たり25とした。植物材料の表面殺菌は次のように行った。クリーンベンチ内で70%エタノールに1分間浸漬したのち、界面活性剤 Tween 20 を数滴加えたアンチホルミン液(有効塩素1%)で10分間表面殺菌し、滅菌水で3回洗浄した。

基本培地は、MS培地、ショ糖30 g/l、寒天8 g/l及び生長調節物質を添加し、pHを5.5に調整したもので、容器当たり25 mlを分注した。調製後オートクレーブを用いて1.0 kg/cm²、120℃で、5分間殺菌した。また、培養条件は25℃、4000lx(白色蛍光灯)、16時間日長とした。植物生長調節物質は、オーキシンとしてNAA(0, 0.1, 1及び10 mg/l)を用い、サイトカイニンとしてはBA(0, 0.1, 1及び10 mg/l)を用いた。置床11週後にカルス、シュート及び根の形成について調査した。

(2) 葉切片の培養 成植物の葉から5 mm平方の大きさの切片を取り出して培養した。培地に添加した生長調節物質はNAA(0.1, 1及び10 mg/l)、BA(0, 0.1及び1 mg/l)とし、置床5週間後に調査を行った。その他はすべて実験1の(1)と同様である。

実験2. 葉切片の培養におけるカルス及びシュートの形成に及ぼす糖濃度の影響

本実験で使用した外植体の調製方法は実験1と同じである。培地の基本的な成分としてはMS培地と1/2 N-MS培地(MS培地のNH₄NO₃及びKNO₃の濃度を1/2に調整したもの)を用いた。これにショ糖3, 6, 12及び24%, ゲルライト0.2%, 生長調節物質としてNAA 1 mg/l及びBA 1 mg/lを添加したのち、pHを5.8に調整した。

その他はすべて実験1の(1)と同様である。培養6週間後にカルス及びシュートの形成について調査した。

実験3. 茎切片の培養で得られた培養体のカルス及び器官を移植した場合のカルス、シュート及び根の形成に及ぼす生長調節物質の影響

実験1の培養物を継続して70日間培養したのち、そのカルス、シュート及び根を取り出し移植して培養した。カルスは米粒大に分割し、シュートは基部で切り取り、根は長さ約1 cmの切片を取って移植した。いずれの場合も、外植体は100 ml三角フラスコ当たり5個、1区当たり15個を置床した。置床に当たっては、カルスは培地上におき、根切片は横にして置いたが、茎は直立させ基部約7 mmを培地中に挿入した。移植後の培養に用いた培地は、MS培地、ショ糖3%、寒天8 g/lを含み、これにIBA(0及び1.0 mg/l)とBA(0及び1.0 mg/l)を単独あるいは組み合わせて添加したものをを用いた。その他の条件はすべて実験1と同様である

実験4. 葉切片の培養で得られた培養体のシュートを移植して培養した場合のカルス、シュート及び根の形成に及ぼす生長調節物質の影響

葉切片を培養して得られた培養体から取り出したシュートを移植して培養したこと及び移植8週間後に調査したこと以外はすべて実験3と同様である。

結果及び考察

実験1. 茎及び葉の切片の培養におけるカルス、シュート及び根の形成に及ぼす生長調節物質の影響

(1)茎切片の培養 カルス形成及び器官形成に及ぼす生長調節物質の影響についてはTable 1に示したとおりである。すなわち、NAA 0.1, 1及び10 mg/lを添加した培地ではカルスを形成したが、NAA濃度とカルス形成率との間には一定の傾向が認められなかった。NAA無添加の培地ではカルスを形成せず、4週後から白くなる培養体

が多かった。BAの影響についてみると、BA添加の有無に関わらずカルスが形成されたが、BA 10 mg/lではカルス形成が全く見られなかった。この結果から、ベニヒメリンドウの茎切片からのカルス形成にはNAA添加が不可欠であることが明らかになった。NAA 0.1及び1 mg/l単用あるいはこれにBA 0.1又は1 mg/lを組み合わせると添加した場合に旺盛なカルスの増殖が見られ、大きなカルスが得られた。NAA濃度の上昇とともに、カルスの色が濃緑色から淡緑色に変わる傾向が見られた(Fig. 1)。高濃度のBAはカルス形成を抑制することがわかり、カルス形成に対してはNAA 0.1及び1 mg/lとBA 0.1及び1 mg/lを組み合わせると添加することが適切であると考えられる。

培養11週後の観察では、シュートと根の形成はほとんどカルスからの再分化であった。Table 1に示したように、シュートの分化についてはNAA 0.1及び1 mg/lとBA 1 mg/lとを組み合わせると添加した場合に認められ、シュート形成率はNAA 1 mg/l, BA 1 mg/lのとき最も高く、55%であったが、その他の培地ではシュート形成は見られなかった。しかし、シュートの平均数は、NAAが0.1 mg/lのように1/10の濃度になったときのほうが多く、9本であった。形成されたシュートはすべて良好な生長を示し(Fig. 2)、培養5週間後に幼植物となった。

根の形成については、NAA添加区で多く見られ、また、BAの有無にかかわらず認められた。しかし、根形成率はBA無添加区で最も高く、BAの濃度が高くなるにしたがって低くなることから、BAは根の形成に対して阻害的に働くものと考えられる。形成された根の長さは8-15 cmであり、また、1培養体当たりの平均根数はNAA 1 mg/l単独添加の培地で最も多く、16本であった。根の太さは2 mm以上のものが多く、根の表面は光沢があり、根毛はなく、緑色を呈していた(Fig. 3)。

以上の結果から、カルス、シュート及び根を形成しさらに幼植物を形成した培地はNAA 1 mg/lとBA 1 mg/lを組み合わせたものであることがわかった。さらに、この培地で2か月間

Table 1. Effects of NAA and BA on callus, shoot and root formation in *in vitro* culture of German violet (*Exacum affine* Balf.) stem segments^z.

NAA (mg/l)	BA (mg/l)	No. of explants cultured	Callus formation				Shoot formation			Root formation		
			No. of cultures	% ^y	Size ^x	Color	No. of cultures	% ^w	Average number	No. of cultures	% ^u	Average number
0	0	25	0	0	—	—	0	0	0	0	0	0
0	0.1	25	0	0	—	—	0	0	0	0	0	0
0	1	25	0	0	—	—	0	0	0	0	0	0
0	10	25	0	0	—	—	0	0	0	0	0	0
0.1	0	25	25	100	+++	Dark green	0	0	0	11	44	6
0.1	0.1	25	19	76	+++	Dark green	0	0	0	0	0	0
0.1	1	25	22	88	+++	Dark green	8	36	9	0	0	0
0.1	10	25	0	0	—	—	0	0	0	0	0	0
1	0	25	14	56	+++	Dark green	0	0	0	14	100	16
1	0.1	25	19	76	+++	Dark green	0	0	0	10	53	8
1	1	25	20	80	++	Dark green	11	55	3	3	15	2
1	10	25	0	0	—	—	0	0	0	0	0	0
10	0	25	24	96	++	Light green	0	0	0	4	17	11
10	0.1	25	25	100	++	Light green	0	0	0	10	40	8
10	1	25	20	80	+	Light green	0	0	0	8	40	4
10	10	25	0	0	—	—	0	0	0	0	0	0

^zObserved after 11 weeks of culture.^yPercentage of callus-forming cultures=(No. of callus-forming cultures/No. of cultures)×100.^xCallus size: +, size of rice grain: ++, soybean: +++, broad bean.^wPercentage of shoot-forming cultures=(No. of shoot-forming cultures/No. of cultures)×100.^uPercentage of root-forming cultures=(No. of root-forming cultures/No. of cultures)×100.**Fig. 1.** Callus formation in *in vitro* culture of stem segments excised from adult plants.**Fig. 2.** Shoot redifferentiation from calluses formed in *in vitro* culture of stem segments.

培養を続けたのちに、培養容器から幼植物を取り出して培養土を入れた鉢に植えたところ、健全で大きな植物体が得られ、活着率は20%であった。このように活着率が低かったのは、この場合シュート及び根がカルスから再分化したものであり、組織的につながっておらず、生理的な機能が充分働いていなかったことによると思われる。後

述する実験3, 4はこの点を改良するために行ったものである。

(2)葉切片的培養 カルス、シュート及び根の形成に及ぼす生長調節物質の影響をTable 2に示した。ほとんどの生存培養体はカルスを形成した。カルス形成率と生長調節物質の間には一定の関係が認められなかったが、NAA 1 mg/1とBA

Table 2. Effects of NAA and BA on callus, shoot and root formation of German violet (*Exacum affine* Balf.) leaf segments cultured *in vitro*^z.

NAA (mg/l)	BA (mg/l)	No. of cultured observed	Callus formation			Shoot formation		Root formation	
			No. of cultures	%	Size ^y	No. of cultures	%	No. of cultures	%
0.1	0	15	7	47	+	1	6	0	0
0.1	0.1	15	9	60	++	1	6	0	0
0.1	1	5	1	20	+++	1	20	0	0
1	0	20	13	65	++	3	15	4	20
1	0.1	20	18	90	+++	3	15	1	5
1	1	25	10	40	++	8	32	0	0
10	0	10	4	40	+	0	0	2	20
10	0.1	20	6	30	+++	2	10	2	10
10	1	15	8	53	+++	0	0	0	0

^z Observed after 5 weeks of culture.

^y Callus size : +, size of rice grain : ++, soybean : +++, broad bean.

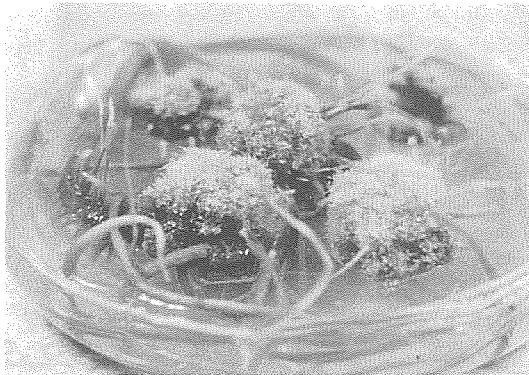


Fig. 3. Root redifferentiation from calluses formed in *in vitro* culture of stem segments.

0.1 mg/l の共存培地でカルス形成率が最も高かった。カルスは、BA 濃度が高くなるにつれて大きくなり、生長も良好であった。すべてのカルスが緑色を呈した。

シュートの形成は根の形成に比べてその時期がやや遅かった。シュートの形成・生長は、NAA を添加した区において認められた。NAA 0.1 及び 1 mg/l の区で形成率が高い傾向がみられ、特に、これに BA 1 mg/l を組み合わせて添加したときに高かった (32%)。また、NAA 1 mg/l を添加した培地では生長が非常に旺盛であり、平均シュート数が他の区と比較してはるかに多かつ

た。根は置床 4 週後に形成され始め、NAA 1 又は 10 mg/l 単用かこれに BA 0.1 mg/l を組み合わせて添加した培地でのみ形成された。この場合、根の形成率は BA 無添加のときが高く、BA を添加するとそれが低くなることから、BA は発根に対して抑制作用を示すことが明らかになった。平均根数は 6-8 本で、20 本以上のものもあった。また、根の色は淡緑色であった。

以上の結果から、ベニヒメリンドウ葉切片的の培養においては、カルスの形成には NAA 1 mg/l と BA 0.1 mg/l を組み合わせた培地が適していることがわかったが、シュート及び根の形成については、それに適する生長調節物質の種類や濃度について更に検討する必要があると考えられる。

実験 2. 葉切片的の培養における器官形成に及ぼす窒素成分濃度並びに糖濃度の影響

Fig. 4 に示したように、カルスの形成は、MS 培地と 1/2 N-MS 培地のいずれにおいてもショ糖 6% を添加した場合に形成率が最も高く、90% 以上であった。ショ糖濃度を 12% に高めた場合にはカルス形成率が著しく低下した。シュート形成については、Fig. 5 に示したように、MS 培地及び 1/2 N-MS 培地のいずれにおいてもショ糖 6% を添加すると著しく高いシュート形成率を示した。ショ糖 12% 以上では、シュート形成が著しく抑制された。

培養 4 週後の観察では、形成されたカルスの大

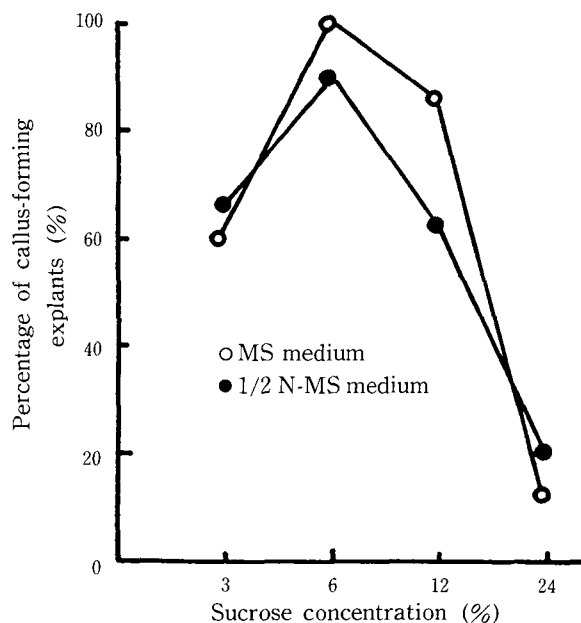


Fig. 4. Effect of sucrose and nitrogen compound concentrations on callus formation in *in vitro* culture of leaf tissues of German violet (*Exacum affine* Balf).

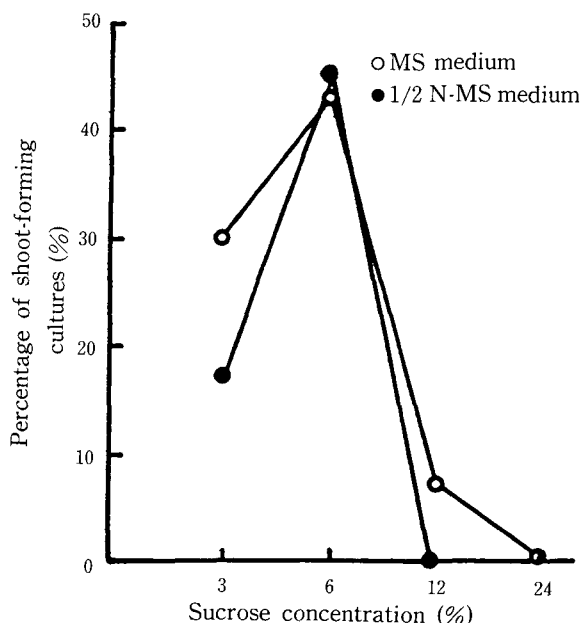


Fig. 5. Effect of sucrose and nitrogen compound concentrations on shoot formation in *in vitro* culture of leaf tissues of German violet (*Exacum affine* Balf).

きさ及び色に及ぼすショ糖濃度の影響については一定の傾向が認められなかった。なお、形成されたシュートは太くて短かったが、培養体当りの平均数が極めて少なかった。以上の結果から、カルスとシュートの形成に対する糖の至適濃度は6%かその前後であると考えられる。カルス形成はショ糖12%以上で抑制され、シュート形成は12%以上で抑制されることが明らかになった。

実験3. 茎切片の培養で得られた培養体のカルス及び器官を移植して培養した場合のカルス、シュート及び根の形成に及ぼす生長調節物質の影響

(1)カルスの移植・培養 緑色カルスを移植して培養すると、生長調節物質添加の有無に関わらずカルスは生長した(新しいカルス細胞が増殖した)が、これは初代培養の培地から取り込んだ生長調節物質の後作用によると考えられる。カルスの生長はIBA 1 mg/1 と BA 1 mg/1 を組み合わせた区で生長が旺盛であった。なお、12週間を過ぎると、すべてのカルスの生長が著しく衰えた。

シュートと根の形成は IBA 1 mg/1 単独添加区でみられたが、その他の添加区では全くみられなかった。根の形成率はシュートのそれより低かった。シュートは太く短いもので、平均数も少なかった (Table 3)。

(2)シュートの移植・培養 IBA 又は BA を添加した培地では、移植したシュートの基部においてカルスが形成された。特に、IBA 1 mg/1 と BA 1 mg/1 を添加した培地では形成率が最も高く100%であった。新たなシュートの増殖は、IBA 及び BA の有無に関わらず、培養3週間にはいずれの外植体を培養した場合においても見られた。根の形成については、生長調節物質無添加区あるいは IBA 1 mg/1 単独添加区で見られ、形成率80%であった。IBA 1 mg/1 単独添加区では根数が最も多かった。BA 添加培地では根がほとんど形成されなかったことから、BA の添加は発根を強く抑制するものと考えられる。培養10週間以降には着花している幼植物も見られた (Table 3, Fig. 6)。

Table 3. Effects of IBA and BA on callus, shoot and root formation, and flowering in transfer and *in vitro* culture of callus, shoots and roots that are obtained from German violet (*Exacum affine* Balf.) stem segments cultured *in vitro*².

Cultured explants	IBA (mg/l)	BA (mg/l)	No. of explants cultured	Callus formation		No. of shoot-forming cultures	No. of root-forming cultures	No. of cultures with flowers
				No. of cultures	Size ^Y			
Small callus clump	0	0	15	2	++	0	0	0
	1.0	0	15	5	++	2	9	0
	1.0	1.0	15	5	+++	0	0	0
	0	1.0	15	8	+	0	0	0
Whole shoot	0	0	15	0		15	12	3
	1.0	0	15	3	++	15	12	3
	1.0	1.0	15	15	+++	15	1	0
Root segment	0	1.0	15	12	++	15	0	0
	0	0	15	2	+	0	0	0
	1.0	0	15	11	++	1	1	0
	1.0	1.0	15	2	+	0	0	0
	0	1.0	15	1	+	0	0	0

²Observed after 4 weeks of culture

^YCallus size : +, size of rice grain : ++, soybean : +++, broad bean.



Fig. 6. Shoot proliferation and direct root differentiation in *in vitro* culture of a whole shoot excised from the cultures which are obtained in the primary culture.

(3)根切片の移植培養 生長調節物質添加の有無に関わらずカルス形成が見られたが、カルスの誘導には IBA 1 mg/l 単独添加が最も大きな効果を示した。シュート及び根は IBA 1 mg/l 単独添加培地においてのみわずかに形成されたが、形成率はきわめて低かった (Table 3)。

以上の結果から、カルス及び根切片を移植して培養した場合、IBA 単独添加は根及びシュートの形成に適していることが明らかになった。シュー

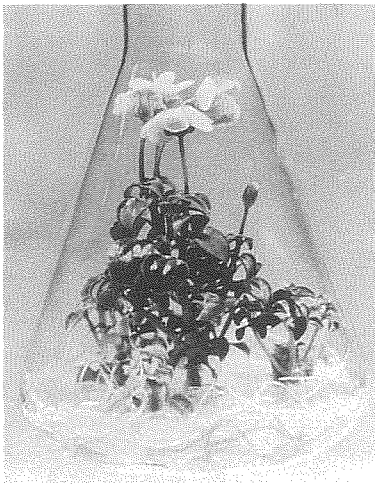
トを移植して培養した場合についてみるとつぎのとおりである。カルスの形成には IBA 無添加又は 1 mg/l と BA 1 mg/l を組み合わせて添加するのが適切であると思われる。また、根の形成には生長調節物質無添加あるいは IBA 1 mg/l 単独添加が適していると考えられる。さらに生長調節物質添加又は IBA 1 mg/l 単独添加及び生長調節物質無添加の場合にはカルス形成を抑制し、シュート及び根の形成を促進することが明らかになった。

実験 4. 葉切片の培養で得られたシュートを移植して培養した場合のカルス、シュート及び根の形成に及ぼす生長調節物質の影響

カルスは BA 無添加の培地では形成されなかったが、BA を添加するとカルスの形成がみられた。特に、BA 1 mg/l 単独添加区で形成率が最も高かったことから、BA は移植した組織のカルス形成に大きな影響を及ぼすことがわかった。シュートは、生長調節物質添加の有無に関わらずすべての区において分化したが、BA の添加はシュート形成を抑制する傾向を示した。根の形成についてはシュート形成とほぼ同じ傾向であったが、BA を添加した場合には根の形成は著しく抑

Table 4. Effect of IBA and BA on callus formation, shoot development and root differentiation from shoots which are formed in *in vitro* culture of German violet (*Exacum affine* Balf.) leaf segments, transferred and cultured^z.

IBA (mg/l)	BA (mg/l)	No. of shoots cultured	No. of callus- forming cultures	No. of shoot- developing cultures	No. of root- differentiating cultures
0	0	15	0	12	9
1	0	15	0	10	9
1	1	15	5	5	1
0	1	15	10	7	0

^z Observed after 8 weeks of culture.**Fig. 7.** An intact plantlet (with shoots, roots and flowers) in Erlenmeyer flask.**Fig. 8.** An adult plant obtained through *in vitro* culture and acclimation.

制された (Table 4)。

これらのことから、ベニヒメリンドウの組織を培養して得た培養体のシュートを基部より切り取り、これを移植して培養することにより発根させて幼植物を得るという増殖系を考える場合には、BAは無添加とし、IBAは無添加又は1 mg/lを添加することが適切であると考えられる。

以上の各実験を通じて得られた幼植物は、培養容器内で旺盛なシュートの発育及び根の伸長を示し、着花したものもあった (Fig. 7)。また、この幼植物を鉢上げして馴化したところ、完全な成植物となった (Fig. 8)。

以上の4種の実験によって、組織培養法によるベニヒメリンドウの大量増殖技術の確立は可能であることが示唆されたが、更に効率のよい大量増

殖法を確立するためには、外植体の種類、培地組成、培養方法などについて更に検討を加える必要があると考えられる。

摘 要

ベニヒメリンドウ (*Exacum affine* Balf.) の効率のよい栄養繁殖法を確立するための基礎的知見を得ることを目的として、茎及び葉組織の *in vitro* 培養における器官形成及び個体再生について調べた。今回は特にカルス、シュート及び根の形成・生長に及ぼす生長調節物質及びショ糖濃度の影響について検討するとともに、*in vitro* 培養によって得られた培養体の各部位 (カルス、茎、根) を移植して培養した場合のカルス、シュート及び根の再分化に及ぼす生長調節物質の影響につ

いて調査した。

1. 成植物の茎切片を培養した場合はつぎのとおりである。カルス形成は NAA 0.1 及び 1 mg/1 の単独添加又はこれに BA 0.1 又は 1 mg/1 を組み合わせて添加した場合に良好であった。シュートはカルスから再分化したものであったが、NAA 1 mg/1 及び BA 1 mg/1 のとき最も高い形成率 (55%) を示し、NAA 0.1 mg/1 及び BA 1 mg/1 のとき培養体当たりの平均茎数は最高の 9 本であった。根の形成は、BA の有無に関わらず NAA 添加区においてみられたが、NAA 1 mg/1 単用のとき形成率は最高 (100%) で平均数も最も多かった (16 本)。

2. 成植物の葉切片を培養した場合は次のとおりである。カルス形成率は NAA 1 mg/1 と BA 0.1 mg/1 を組み合わせて添加したときに 90% となり、カルスの生長は NAA と BA を組み合わせて添加した場合に良好であった。シュートの形成・生長には NAA と BA とを組み合わせて添加するのが適切であり、NAA 1 mg/1 及び BA 1 mg/1 のとき最も高い形成率 (32%) を示した。根は NAA 1 又は 10 mg/1 単用かこれに BA 0.1 mg/1 を添加した場合にのみ形成された。

3. 茎及び葉の切片の培養における糖濃度並びに窒素成分濃度の影響についてみると、窒素成分濃度に関わらず、シュート形成率は 6% のとき最も高かった。カルス形成率はショ糖 3% の場合に高かった。窒素成分濃度による差は、カルス形成率及びシュート形成率のいずれにおいても認められなかった⁵⁷⁾。

4. カルスを移植して培養すると、IBA 1 mg/1 と BA 1 mg/1 を組み合わせて添加したとき生長が最も盛んであった。

5. 培養体のシュートを基部より切り取って培養すると、ほとんどの外植体において新たなシュートの増殖がみられた。根の分化は、生長調節物質無添加又は IBA 単用の場合にみられ、分化率 80% であった。BA を添加すると根の分化が著しく抑制された。

6. 培養体の根の切片を培養すると、IBA 1 mg/1 単用のときカルス形成率が最も高く

(73%)、シュート及び根の分化も少数ながら見られた。

7. 培養体のシュートを移植して培養すると、そのシュートから直接発根し、4 週間以内に幼植物が得られたが、更に、この幼植物を鉢上げすると完全な成植物になった。

引用文献

1. 本田正次：原色園芸植物大図鑑、368.
2. 河原林和一郎・浅平 端：ウイルスフリー・ユリ球根の *in vitro* における増殖。園学雑、58：195-208, 1989
3. 松原幸子・陳 典・樹田正治：ニンニクのウイルスフリー株の育成・増殖・栽培。(第3報) *in vitro* 培養での増殖。園芸学会研究発表要旨(昭和63年度春季大会)、220-221, 1988
4. 河瀬晃四郎・水谷 博・吉岡麻理・福田園子：イリス属植物の組織培養による増殖。園学雑、59：644-645, 1990
5. KOZAI, T. and IWANAMI, Y.: Effects of enrichment and sucrose concentration under high photon fluxes on plantlet growth of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) in tissue culture during the preparation stage. *J. Jap. Soc. Hort. Sci.* 57(2) : 279-287, 1988
6. 原田 隆・八嶽利郎：園芸作物の無ウイルス個体作出に関する研究。第1報 食用ユリの生長点培養におけるオーキシン並びに pH の影響。北海道大学農学部邦文紀要、13(4) : 559-563, 1983
7. 石田雅士・松山剛士・北島 宣・傍島善次：ニワウメ (*Prunus Japonica* Thunb.) の茎頂培養について。園学雑、58 : 49-54, 1989

Studies on Callus Formation, Organ Differentiation and Plantlet Regeneration in *in Vitro* Culture of German Violet (*Exacum affine* Balf.) Tissues

Pinsan XU, Takashi HARADA and Toshiro YAKUWA

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

(Received December 28, 1990)

Summary

To establish an efficient vegetative propagation method of German violet (*Exacum affine* Balt.), stem and leaf segments were cultured *in vitro*, and effects of growth regulators and sucrose on callus, shoot and root formation were examined (primary culture). In addition, effect of growth regulators on callus, shoot and root formation was tested by culturing small callus pieces, whole shoots and root segments that were excised from the cultures obtained from the primary culture (secondary culture).

1. *In vitro* culture of stem segments of an adult plant showed the following results. Calluses were vigorously formed on the media containing 0.1 and 1 mg/l NAA alone or combined with 0.1 and 1 mg/l BA. Shoots, which were redifferentiated from calluses, showed the highest differentiation percentage with 1 mg/l NAA and 1 mg/l BA, and the largest average number (9) with 0.1 mg/l NAA and 1 mg/l BA. Root redifferentiation was observed in all treatments with NAA, and the highest rate (100%) and highest average number (16) were obtained with 1 mg/l NAA alone.

2. Results from *in vitro* culture of leaf segments were as follows: callus formation rate was the highest (90%) on the media with both 1 mg/l NAA and 0.1 mg/l BA, and vigorous growth of callus occurred with both NAA and BA; the combination of NAA and BA is suitable for the redifferentiation and growth of the shoots, and the highest redifferentiation percentage (32%) was shown at 1 mg/l of NAA and 1 mg/l of BA; root redifferentiation (redifferentiation rate, 20%) was observed when 1 or 10 mg/l NAA was added alone or combinationally with 0.1 mg/l BA.

3. Variations of sucrose concentrations affected the *in vitro* culture of stem and leaf segments. The highest callus formation rate was shown at 3% of sucrose, and the highest redifferentiation rate at 6% of sucrose, regardless of nitrogen compounds concentration. The nitrogen compounds concentration gave no difference in the rates of callus formation and shoot redifferentiation.

4. Callus, which were transferred and cultured, proliferated most vigorously with 1 mg/l IBA combined with 1 mg/l BA.

5. In the *in vitro* culture of whole shoots which were isolated from the cultures in the primary culture, new shoots proliferated on almost of all cultures, and roots redifferentiated on the media containing no growth regulator or IBA alone (shoot proliferation rate, 80%). An addition of BA noticeably inhibited root redifferentiation.

6. When segments of the primary culture-obtained roots were cultured, callus formation rate was the highest (73%) at 1 mg/l of IBA alone, and shoots and roots redifferentiated slightly.

7. The shoot, which were formed in the primary culture, transferred and cultured, differentiated roots directly from its tissue, and developed into a plantlet. The plantlet could be acclimated and grown into an intact adult plant.