



Title	組織培養によるギョウジャニンニク (<i>Allium victorialis</i> L. ssp. <i>Platyphyllum</i> Hult.) の大量増殖
Author(s)	石川, 知紀; ISHIKAWA, Tomonori; 増田, 清 他
Citation	北海道大学農学部農場研究報告, 30, 1-7
Issue Date	1997-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/13428
Type	departmental bulletin paper
File Information	30_p1-7.pdf



組織培養によるギョウジャニンニク (*Allium victorialis* L. ssp. *platyphyllum* Hult.) の大量増殖

石川 知紀・増田 清・原田 隆

(北海道大学農学部園芸学講座)

田村 春人

(北海道大学農学部附属農場)

金澤 俊成

(岩手大学教育学部)

(1997年1月17日受理)

緒 言

耕地での安定したギョウジャニンニク栽培を行うためには、まず効率的な種苗生産法の開発が必要であるが、ギョウジャニンニクでは、株の発育が極めて遅いという特性があるので、株分けによる方法では、分割数が少なく、増殖効率が低いほか、ウイルス病伝搬の危険性がある。一方、ギョウジャニンニクの種子は他のネギ属植物に比べて発芽が遅く不揃いであり、乾燥したのち低温に保存しても、発芽率が急速に低下すること¹⁾、また、実生の初期生育が遅く、収穫可能な株に生長するまでに長い期間を要することなど、種子繁殖を利用する上での大きな障害がある²⁾。栄養繁殖は、母株の優良な特性が保存されるなどの利点があるが、ウイルス病害の防除が必要になる。このように、ギョウジャニンニク栽培においては、安定した種苗生産技術の確立が望まれている。

この場合、組織培養法による優良苗の大量増殖が効果的であると考えられるが、これまで、ネギ属植物においてはニンニク^{4,5)}、およびネギ^{7,8)}などで茎頂培養に関する報告があり、無病苗の生産に応用されている。しかし、ギョウジャニンニクの組織培養に関する研究報告は少なく、培養条件をはじめとして大量増殖のための技術が十分に検討されているとは言えない。

本研究では、組織培養法によるギョウジャニンニクの大量増殖と優良苗生産法の確立を目的とし

て、茎頂組織からの効率の良い不定芽分化法および植物体再生法について検討した。

材料および方法

実験 I. 成植物茎頂組織の *in vitro* 培養による器官形成および幼植物再生

1. 植物材料の調製

1994年11月上旬から1996年1月下旬にかけて、北海道大学農学部附属農場に栽植してあるギョウジャニンニク (*Allium victorialis* L. ssp. *platyphyllum* Hult.) 株から外植片を採取した。外植片は次のように調製した。

水洗した地下部のりん茎から根、繊維状となって外側を覆う前年の葉鞘基部および外側の葉鞘基部1ないし2枚を除去し、0.1% polyoxyethylene sorbitan monolaurate (Tween 20) を含む次亜塩素酸ナトリウム溶液 (有効塩素1%) に15分間浸漬した。水洗の後、りん茎の葉鞘および底盤部の大部分を切除し、底盤部組織を5 mm 程度つけた長さ2～3 cm、直径約5 mm の筒状組織片を作った。次にこの組織片を70%エタノールに1分間、0.1% Tween 20 を含む次亜塩素酸ナトリウム溶液 (有効塩素1%) に15分間浸漬して再度表面殺菌し、滅菌水で十分に洗浄した。その後、りん茎内部から1～2枚の葉原基、茎頂分裂組織および底盤部組織をもつ約0.5 mm 立方の組織 (以下茎頂組織という) (Fig. 1A) を無菌的に取り出し、外植片とした。

2. 培地作製および培養

培地は、MS培地³⁾を基本とし、各種生長調節物質を含み、Gelrite (Merck, Rathway, NJ) 2 g/lを加えて固化したものを用いた。培地にはオーキシンとして 1-naphthaleneacetic acid (NAA), 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), indole-3-butyric acid (IBA) および indole-3-acetic acid (IAA) を、サイトカイニンとして 6-benzylaminopurine (BAP) 6-furfurylamino-purine (カイネチン), zeatin (ゼアチン) および *N*-isopentenylaminopurine (2-iP) を、また、サイトカイニン類似物質として *N*-(2-chloro-4-pyridyl)-*N'*-phenylurea (CPPU) を、第1表に示した濃度で添加した。培地の pH は 5.7~5.8 に調整し、試験管 (12×1.2 cm) に 3 ml ずつ分注した後、120°C、1 kg/cm² で 12 分間高压滅菌を行った。

3. 調査

培養開始後 3 か月にわたり、カルス形成、器官分化および幼植物再生について調べた。また、次のような方法により、形態形成について組織学的に観察した。

不定芽を含む組織は FAA⁶⁾ (50%エタノール：氷酢酸：37%ホルマリン=18：1：1) で固定し、エタノールとブタノールの混合液により脱水した後、パラフィンに包埋した。8~10 μm の厚さの組織切片を作成した後、パラフィンを除去し、ヘマトキシリン液を用い染色した。

実験II. 不定芽形成系の維持と植物体再生効率の向上

1. 不定芽生長点部組織の *in vitro* 培養による不定芽の増殖

組織培養によって得られた、葉身の長さが 10~15 mm の不定芽から解剖顕微鏡下で茎頂部を摘出し、新たな培地に移して再び不定芽を誘導することを試みた。培地には、BAP 2 mg/l を添加した。その他の培養条件は実験 I と同様である。

2. 不定芽およびカルスをもつ分割培養体の *in vitro* 培養による不定芽の増殖

分化した不定芽の大きさが 3 mm 以下の時点で、カルス組織ごとに分割し、継代培養した。その他の方法については、実験II-1と同様である。

3. 幼植物の再生と順化

不定芽に由来する幼植物を無菌的に培養容器から取り出し、根部に付着している培地を取り除いた。これをハイポネックス溶液で湿潤化したパーミキュライトを入れた円筒形のガラス容器に移し、25°C、4×10³lx、16時間日長の条件下に置いた。植物体は、生長が認められた時点で容器の蓋をとり、環境に順化させた。その後、一部の植物体を、培養土を入れたビニールポットに移し替え、温室内で生育させた。植物体は生育に応じて圃場に移植し栽培した。

結果および考察

実験I. 成植物茎頂組織の *in vitro* 培養による器官形成および幼植物再生

1. カルス形成および不定芽形成に及ぼすオーキシンおよびサイトカイニンの影響

培養8週間後の結果は第1表に示したとおりである。

(1) オーキシン単独添加の場合

ギョウジャニンニク茎頂組織をオーキシンのみを含む培地で培養するとまず底盤部が肥大し始め、カルスが形成されたが、カルスの生長は遅かった。Table 1 に示したように、培養8週間後では、大きなものでも直径 3~8 mm であった。また、カルス形成率は、0.1 mg/l~10 mg/l の範囲では、IAA を除いて、オーキシンの低い濃度において高くなる傾向が見られた。

オーキシンによって増殖したカルスのうち、2,4-D 0.1 mg/l, IBA 1.0 mg/l および IAA 1.0 mg/l を含む培地で生じたカルスはその後不定芽を分化した。全組織片数に対する不定芽を形成した組織片の割合 (不定芽形成率) は、オーキシンのみを含む培地では、IBA 1.0 mg/l のとき最も高い値 (37.5%) となった。培養組織当たりの平均不定芽数も、IBA 1.0 mg/l 添加した場合

Table 1. The rates of adventitious shoot, adventitious root and callus formation in tissue culture of shoot apices in *Allium victorialis* L.*

Growth regulator (mg/l)	Shoot		Root	Callus
	(% explants forming shoots)	(number/explants)	(% explants forming roots)	(% explants forming callus/callus growth)**
—	0	0	25	0 / —
NAA	0.1	0	22	100 / +
	1	0	13	63 / ++
	10	0	0	0 / —
2,4-D	0.01	0	60	10 / +
	0.1	20	30	90 / +
	1	0	0	78 / ++
	10	0	0	0 / —
IBA	0.1	0	90	100 / +
	1	38	63	75 / —
	10	0	0	10 / +
IAA	0.1	0	50	67 / +
	1	14	50	86 / ++
	10	0	0	75 / ++
BAP	0.1	44	78	89 / +++
	1	71	29	86 / +++
	10	100	0	100 / +++
Kinetin	0.1	14	100	57 / +
	1	38	50	50 / +
	10	60	60	100 / +++
Zeatin	0.1	50	90	100 / +++
	1	90	60	100 / +++
	10	60	0	90 / +++
2-iP	0.1	29	71	100 / ++
	1	100	50	100 / ++
	10	43	29	86 / +++
CPPU	0.1	10	70	70 / +
	1	75	0	100 / +
	10	40	0	90 / ++

* Data were scored eight weeks after the commencement of cultures.

** Callus growth : —, no growth ; +, <3 mm ; ++, >3 mm ; +++, >8 mm

に最高値となった。NAAのみを含む培地では不定芽分化は認められなかった。高濃度 (10 mg/l) のNAAでは、カルスは緩やかに生長し、定芽の伸長生長が抑制された。生長調節物質無添加培地では、組織片からの定芽の伸長が見られたが、カルスおよび不定芽の形成は認められなかった。

(2) サイトカイニン単独添加の場合

サイトカイニンのみを含む培地では、定芽の生長が抑制され、カルスの旺盛な生長が見られた。

カルスは、培養3週間頃に底盤部から増殖し始め、培養8週間後には直径8 mm以上の大きさにまで生長した (Table 1)。カルス形成率は、カイネチン 0.1 mg/l または 1.0 mg/l、および CPPU 0.1 mg/l を除いて、80%以上であった。サイトカイニンを含む培地では、培養4～6週間頃からカルス表面に微小な白い突起状のものが形成され、それらは先端部から緑色になりやがて不定芽に分化した (Fig. 1B)。これらのカルスの組織学的観察から、表面に不定芽が形成されているのが確認さ

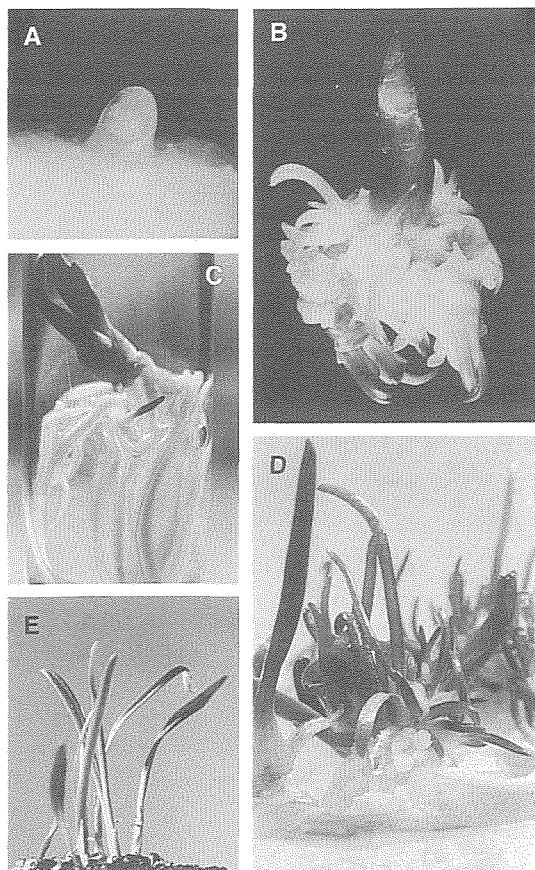


Fig. 1. Shoot formation and plant regeneration in tissue culture of *Allium victorialis* L. ssp. *platyphyllum* Hult

A. A shoot apex and leaf primordia excised from the bulbs of *Allium victorialis*.

B. Shoot formation from an explant cultured in the Murashige and Skoog's medium containing 2 mg/l benzylaminopurine (BAP).

C. Root formation of an adventitious shoot regenerated from shoot apical tissue.

D. Multiple shoot formation by subculture of young shoots with original callus tissue in a fresh medium containing BAP.

E. Regenerated shoots growing in a green house.

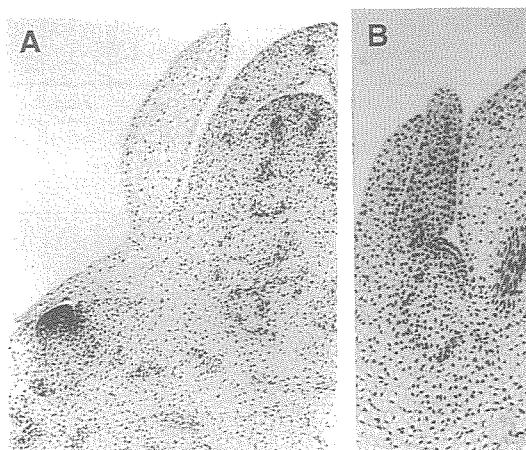


Fig. 2. Histological sections of *Allium victorialis* callus tissue differentiating shoot primordia (A) and adventitious shoots (B)

れた (Fig. 2-A および B)。本実験で用いたすべてのサイトカイニンに不定芽形成効果が認められ、不定芽形成率は、BAP および 2-iP を 10 mg/l および 1.0 mg/l で用いた場合に 100% であった。組織片当たりの平均不定芽数は、CPPU を除いて、サイトカイニン濃度が高くなるに従って増加した。一方、サイトカイニンの種類によっては、高濃度で添加した場合に、不定芽の生長阻害あるいは枯死が見られた。

(3) オーキシンおよびサイトカイニン組合せ添加の場合

BAP を 10 mg/l または 1.0 mg/l の濃度で用いた場合には、NAA による不定芽形成の促進はみられなかった。BAP が 0.1 mg/l のときには、NAA によって不定芽形成率がわずかに上昇したが、BAP 10 mg/l のみを含む培地より低い不定芽形成率であった (Fig. 3)。一方、金澤²⁾ はギョウジャニンニクの茎頂培養において、BAP 1 mg/l に NAA 0.1 mg/l を添加した培地を用いると、不定芽形成率は 80% 以上であること、平均不定芽数は NAA 濃度に依存して増加することを報告しており、本研究の結果と部分的に類似している。しかし、本研究では、比較的高濃度のサイトカイニンを用いることによって、オーキシン無添加の場

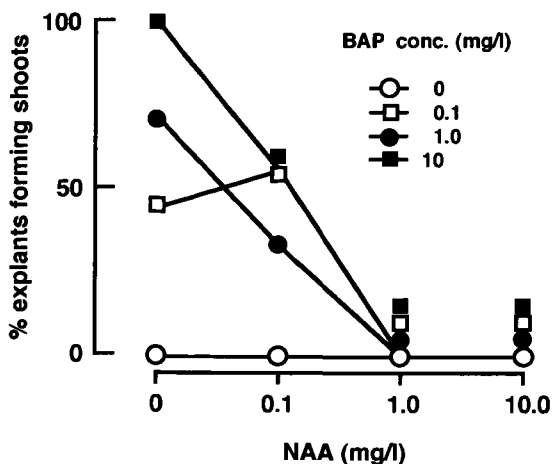


Fig. 3. Effect of 1-naphthaleneacetic acid combined with benzylaminopurine on the rate of adventitious shoot formation in a culture of *Allium victorialis* shoot apical tissues

合でもほぼ100%の不定芽形成率が得られることを見出した。これらの結果は、サイトカイニン単独添加によって十分な不定芽形成が誘起されない場合、あるいは低濃度のサイトカイニンをを用いた場合には、オーキシンが不定芽形成に対して促進的に作用することを示唆している。

2. 不定根形成に及ぼすオーキシンおよびサイトカイニンの影響

2, 4-Dは0.1 mg/l以下の濃度、IBAおよびIAAは1.0 mg/l以下の濃度で不定根形成を促進し、これより高濃度のオーキシンの添加は不定根の形成を阻害した(Table 1)。組織片当たりの平均根数は、用いた全てのオーキシンについて見ると、2, 4-Dを用いたときの組織片当たり9.3本が最も高い値となった(データ未掲載)。NAAはギョウジャニンニク茎頂組織からの不定根形成に有効ではなかった。

一般にサイトカイニンは不定根の形成を抑制することが知られているが、ギョウジャニンニクの不定根形成ではサイトカイニンが有効であった。発根促進はサイトカイニンを単独で与えた場合にも認められた。全組織片数に対する不定根を形成した組織片の割合(不定根形成率)は、いずれの

サイトカイニンの場合でも0.1 mg/lの濃度において最も高い値となった(Table 1)。サイトカイニンを用いることによって、オーキシンのみを含む培地を用いた場合よりも高い不定根形成率が得られた。

サイトカイニンの種類による不定根形成率の違いについて見ると、カイネチンが最も高く、ゼアチン、BAP、2-iP、CPPUの順に低下した。一方、組織片当たりの根数は0.01 mg/lのCPPUを与えたときに最高となり、組織片当たり平均6.8本の根が形成された(データ未掲載)。カイネチンおよびBAPも有効であった。

茎頂組織片は培養にともなって肥大し、肥大した組織は不定根を形成した。このような不定根の多くは培養開始後1か月以内に形成された。一方、不定芽が形成された後では、不定根の多くが分化した不定芽の基部から生じた。これらの事実は、サイトカイニンによる不定根形成の促進が、不定芽分化の促進による、間接的な作用であることを示唆している。一方、不定根形成および不定芽形成の促進に対するサイトカイニンの至適濃度に差が見られたことから、それらの促進作用は相互に独立したものであると推測されるので、この点については更に検討する必要がある。

実験II. 不定芽形成系の維持と植物体再生効率の向上

不定芽分化の誘導が可能な組織を継代培養によって長期間維持することができれば、有用な系として利用することができる。1. 不定芽生長点部組織の*in vitro*培養、2. 不定芽およびカルスをもつ分割培養体の*in vitro*培養のうちのいずれの方法でも、2.0 mg/lのBAPを含むMS培地を用いて、新たな不定芽を誘導することができた(Table 2とFig. 1D)。特に後者の方法では、不定芽とカルス組織は旺盛に生長し、移植後2か月の間に組織当たり平均14の不定芽を生じた。前者の方法では、初期生育と不定芽数の点で劣り、1か月以上も生長しない組織が見られ、組織当たりの平均不定芽数は4であった。

以上のように、培養によって生じたカルスおよ

Table 2. The rate of shoot formation from whole adventitious shoots and the excised apical tissues of adventitious shoots in culture of *Allium victorialis* L.*

Origin	Shoot (number/explant)
whole shoot	14.0 ± 1.7
shoot apex	4.0 ± 2.6

* Data were scored eight weeks after the commencement of cultures.

び不定芽をもつ培養体を発育初期に分割して培養する方法によって、多数の不定芽を増殖できることが明らかとなり、*in vitro* で不定芽を維持しながら、個体増殖が可能であることが明らかになった。

次に、3. 幼植物の再生と順化についてみると以下の通りである。形成された不定芽は旺盛に生長したが徒長することなく、多くは基部に小さな鱗茎を形成した。不定芽の基部が肥大する頃には、個々の不定芽は容易にカルスから分離できるようになった。これを生長調節物質を含まない培地に移植すると、新たな不定根を生じ、幼植物として生育した(Fig. 1C)。これらのギョウジャニンニク幼植物のほとんどは、ポットに移植した後も特別な加湿設備を必要とせずに生育を続け(Fig. 1E)、さらに、圃場に定植して栽培すると旺盛に生長した。

摘 要

組織培養法によるギョウジャニンニク (*Allium victorialis* L. ssp. *platyphyllum* Hult.) の栄養繁殖について検討した。野外での生育中の成植物から茎頂組織を取り出し、6-benzylaminopurine (BAP) 1.0 mg/l あるいは N-isopentenylaminopurine (2-iP) 1.0 mg/l を含む修正MS培地で培養することによって、不定芽が効率良く誘導された。組織学的観察の結果、カルス表面に不定芽が形成されているのが確認された。一方、1-naphthaleneacetic acid (NAA), 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), indole-3-butyric acid (IBA) および indole-3-acetic acid (IAA) は、0.1, 1.0 および 10 mg/l の単独添加では、BAP あるいは 2-iP 以上の効

果を示すことはなかった。さらにNAAは、BAP (1.0 mg/l および 10 mg/l) による不定芽形成の促進を抑制した。これらのことから、ギョウジャニンニク茎頂組織からの不定芽誘導に、オーキシン添加は不必要であることが明らかとなった。組織培養法による不定芽増殖系を維持するために、発育初期の不定芽をカルス組織ごと分割し、BAP 2.0 mg/l を含む培地に継代培養したところ、移植後もカルスは生長し、やがて多数の新たな不定芽を形成した。不定芽は生長し、根を形成して幼植物になるとともに基部に小鱗茎を形成した。これらの幼植物は圃場で栽培できることが確認された。

引用文献

- 1) 金澤俊成：ギョウジャニンニクの栽培に関する基礎的研究。北海道大学修士論文：1988。
- 2) 金澤俊成：ギョウジャニンニクの形態・発育特性及び栽培化に関する基礎的研究。北海道大学博士論文：1992。
- 3) Murashige, T. and Skoog, F.: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **15**: 473-497. 1962.
- 4) Walkey, D.G.A., Webb, M.J.W., Boll, C.J. and Miller, A.: Production of virus-free garlic (*Allium sativum* L.) and shallot (*A. ascalonicum* L.) by meristem-tip culture. *J. Hort. Sci.* **62**: 211-220. 1978.
- 5) Bhojwani, S.S.: *In vitro* propagation of garlic by shoot proliferation. *Sci. Hortic.* **13**: 47-52. 1980.
- 6) Jensen, W.A.: *Botanical Histochemistry*: pp. 78-83. 1962, W.H. Freeman and Company, CA.
- 7) 大越雄一：茎頂培養による分けつネギの大量増殖法。農業および園芸：**63**, 163-168. 1988.
- 8) Fujieda, K., Ando, Y. and Fujieda, Y.: Propagation of Welsh onion through shoot tip culture. *J. Fac. Agr. Kyushu Univ.* **22**: 89-98. 1977.

Micropropagation of *Allium victorialis* L. ssp. *platyphyllum* Hult

Tomonori ISHIKAWA, Kiyoshi MASUDA and Takashi HARADA
(Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo 060, Japan)

Haruto TAMURA

(Experiment Farms, Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo 060, Japan)

Toshinari KANAZAWA

(Faculty of Education, Iwate University, Morioka 020, Japan)

(Received January 17, 1997)

Summary

A procedure to propagate *Allium victorialis* L. ssp. *platyphyllum* Hult vegetatively through tissue culture was established. Adventitious shoots were effectively induced from the shoot apical tissues of the growing plants using a modified Murashige and Skoog medium containing 10 mg/l 6-benzylaminopurine (BAP) or 1 mg/l isopentenylaminopurine (2-iP). An exogenous supply of 1-naphthaleneacetic acid (NAA), 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), indole-3-butyric acid (IBA) and indole-3-acetic acid (IAA) at 0.1, 1.0 and 10.0 mg/l was less effective for adventitious shoot formation than 1 mg/l BAP or 2-iP. In the presence of 10 mg/l and 1 mg/l of BAP, NAA reduced the tissues forming the adventitious shoots. Thus we conclude that the supply of auxin is not required for adventitious shoot formation. The histological study showed that adventitious shoots formed from the peripheral region of the callus. The divided callus tissue with a single young adventitious shoot grew and differentiated many additional shoots when subcultured in a fresh medium containing 2 mg/l BAP. The adventitious shoots grew vigorously and formed thick roots with swollen basal parts. They grew into mature plants when transferred to the soil in a greenhouse and subsequently planted in a field.