

## ニンニクの芽の組織培養における栄養分、 生長調節物質及び温度の影響

高 樹 英 明

(山形大学農学部蔬菜園芸学研究室)  
(平成元年9月1日受理)

### Effect of Nutrient, Growth Regulator and Temperature for *in Vitro* Growth and Organogenesis of Excised Buds from Garlic Cloves

Hideaki TAKAGI

Laboratory of Vegetable Crop Science, Faculty of Agriculture,  
Yamagata University, Tsuruoka 997, Japan

(Received September 1, 1989)

#### Summary

The factors promoting *in vitro* growth and bulb formation were investigated of excised buds from the cloves of garlic cv. 'Yamagata'.

Media containing  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{NH}_4^+$  in equal amounts or two parts of  $\text{NO}_3^-$  with one part of  $\text{NH}_4^+$  were much more favorable for shoot, root and bulb growth than media containing only  $\text{NO}_3^-$ . High nitrogen supplies stimulated shoot, root and bulb growth, but inhibited bulb initiation.

Sucrose was favorable for shoot, root and bulb growth and bulb initiation. Fructose inhibited shoot and root growth. Glucose of high concentration inhibited bulb initiation and growth. Higher sucrose supplies (2→4→6→8%) more stimulated bulb initiation and growth, but more inhibited shoot growth.

Explants formed no bulb unless cloves or explants had been exposed to low temperatures for a given period.

NAA (1 mg/l) supplies stimulated shoot and root growth, and bulb initiation and growth. However, NAA of 2 mg/l or more inhibited bulb formation when a low-temperature treatment to cloves was incomplete. BA, GA, ethephon and adenine stimulated little or inhibited growth and development of explants.

#### 緒 言

ニンニクの茎頂培養に関する研究は、ウイルスフリー株育成を目的として少なからず行われており<sup>1-3,5,6,9,12)</sup>、ニンニクの茎頂培養の方法は技術的には一応確立されたといえる。しかしこれらの報告では著者ら<sup>12)</sup>のものを除き、培地に Linsmaier & Skoog, Murashige & Skoog, White などの数種の既発表培地を使用して培養の成功を

述べているが、各種培地上でのエキスプラントの生育比較、さらには培地の無機成分及びホルモン以外の有機成分の種類と濃度のエキスプラントの生育に及ぼす影響に関してはあまり検討されていない。そのため、ニンニクの茎頂の生長・発育を促進する最適培地についてはまだ不明な点が多い。また、ニンニクのエキスプラントが *in vitro* で球形成するためには、植物体が低温処理されていることが必要であることを著者らは1975年に示した

本論文の要旨の一部は1975年の園芸学会秋季大会で発表した。

が<sup>12)</sup>、その後寺分ら(1986)<sup>15)</sup>と長久保ら(1987)<sup>9)</sup>も同様なことを報告している。しかし、ニンニクの低温処理と *in vitro* での球形成に関する詳細な検討は著者らを含めてまだ報告されていない。そこで本研究では、ニンニクの茎頂ないし芽の *in vitro* 培養に最適な培地組成と成分濃度、並びに *in vitro* 培養での球形成と低温処理との関係を明らかにすることを目的として以下の実験を行った。すなわち、ニンニクの休眠覚醒球(側球)から切り出した芽の組織片(茎頂の他に幼葉と葉原基とを合わせて4~6枚もつ組織片)を供試して、ニンニクの芽の *in vitro* 培養での栄養生長と球の形成・肥大に及ぼす窒素の濃度と形態、糖の濃度と種類、生長調節物質並びに低温の影響について実験検討した。

## 材料及び方法

### 実験 1. 窒素栄養

#### a. 窒素濃度と窒素形態

芽を切り出すのに用いた球は、1972年5月に収穫したガラス室栽培の‘山形’の側球で、収穫後9月20日まで軒下で貯蔵して休眠打破を完了させ、その後11月4日まで5℃で45日間処理したものである。供試球は9月20日

Table 1. Concentrations of inorganic macronutrients in the media of the experiment 1-a.

Nutrient	Medium (mM)		
	NN <sup>a</sup>	3N <sup>b</sup>	NH <sup>c</sup>
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	5.48	16.44	1.24
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	—	—	4.24
H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	0.92	0.92	0.92
K <sup>+</sup>	2.16	2.16	2.16
Ca <sup>2+</sup>	2.12	4.86	2.12
Mg <sup>2+</sup>	0.51	0.51	0.51
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	0.51	0.51	2.63
Na <sup>+</sup>	—	5.48	—
Cl <sup>-</sup>	—	—	4.24

The quantities of SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> contained in micronutrients salts are not included.

<sup>a</sup>Nitsch & Nitsch (1967).

<sup>b</sup>A medium containing three times nitrate nitrogen as much as the NN medium.

<sup>c</sup>A medium containing one part of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> with three parts of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> — the total nitrogen content being equal to the NN medium.

現在で1個重が約1.5gのもの(1.5g球と略す)を選んだ。11月10日に base plate(盤茎)を少し付けた芽を切り出し、最外の幼葉2枚を切除して24×200mm試験管の寒天培地上(20ml)に置床した(1区当たり15本)。

培地の窒素濃度と窒素形態は Nitsch & Nitsch<sup>10)</sup>のものを標準とし(NN培地)、多N培地はNをNN培地の3倍含むものとし(3N培地—全量NO<sub>3</sub>-N)、またNH<sub>4</sub>-Nを含む培地はNO<sub>3</sub>-N:NH<sub>4</sub>-N比が1:3.4の割合のものとした(NH培地—全N濃度はNN培地と同じ)(第1表)。無機多量要素以外の成分と濃度は3培地とも以下の点を除いて Nitsch & Nitsch<sup>10)</sup>のものに準じた:KI 1mg/l, アデニン(硫酸塩を使用)8mg/l及びα-ナフタレン酢酸(NAA)(K塩を使用)1mg/l。これらを添加後にpHを5.5に調整し、その後にショ糖80g/l、粉末寒天7g/lを加えた。

培養は五面(透明)プラスチック張りの20℃恒温器を用い、光条件は恒温器を北窓の近くに設置することにして、窓からの自然散光を主としたが、光不足を補うため植物栽培用蛍光管「ホルムクス」40ワット(松下電器産業製)を試験管の真上28cmの位置から1日16時間照射した(蛍光管を18cm間隔で並列にセット)。培養59日後の'73年1月8日に生育調査を行った。

なお、他の実験でも特に記さない限り、材料及び方法は本実験と同様に行った。ただし、供試球を生産した栽培方法は他の実験では普通露地栽培である。

#### b. 窒素濃度と窒素形態が異なる4種類の培地での生育

1973年7月収穫の‘山形’の5~7g球を11月14日から99日間5℃で処理し、'74年2月21日に芽を切り出した。芽の幼葉4枚を切除して、試験管内に置床した。植え込んだ芽エキスプラントの幼葉及び葉原基の数は計約4枚であった。

比較検討した培地は実験1-aのNN培地、Murashige & Skoogの培地<sup>8)</sup>(MS培地)、Knudson solution C培地<sup>4)</sup>(KN培地)及びTulecke(1964)の培地<sup>16)</sup>(TU培地)である。第2表にそれらの培地の無機多量要素組成と濃度を示した。同表に示した要素以外はNN培地と同じ組成と濃度とした(NAA 1mg/l, アデニン 8mg/l, ショ糖 8%, 寒天 0.7%)。

培養温度は13℃とし、光は北窓からの自然散光のみとした。培養131日後の'74年7月2日に生育調査を行った。

#### c. 窒素濃度と球形成

1980年7月収穫後軒下で貯蔵した‘山形’の2~3g球

Table 2. Concentrations of inorganic macronutrients in the media of the experiment 1-b.

Nutrient	Medium (mM)			
	MS <sup>z</sup>	TU <sup>y</sup>	KN <sup>x</sup>	NN <sup>w</sup>
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	39.42	24.34	8.47	5.48
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	20.63	—	7.57	—
H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	1.25	2.17	1.84	0.92
K <sup>+</sup>	20.04	12.86	1.84	2.16
Ca <sup>2+</sup>	2.99	1.19	4.23	2.12
Mg <sup>2+</sup>	1.50	3.08	1.01	0.51
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	1.50	4.49	4.80	0.51
Na <sup>+</sup>	—	26.17	—	—
Cl <sup>-</sup>	5.99	12.06	—	—

The quantities of SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> contained in micronutrients salts are not included.

<sup>z</sup>Murashige & Skoog (1962).

<sup>y</sup>Tulecke (1964).

<sup>x</sup>Knudson solution C (1946).

<sup>w</sup>Nitsch & Nitsch (1967).

の芽を11月21日に切り出し、幼葉2枚を切除して試験管内に置床した。供試球は芽の切り出し日までに10℃以下の自然低温に約1カ月間遭遇していたので—10月中、下旬及び11月上、中旬の旬平均気温はそれぞれ15.2、10.2、9.8、8.0℃であった—、若干低温誘導されていたと考えられる。培地のN濃度を4、8、16mMの3段階にした。培地は多量要素成分をNH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>、Ca(H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>・H<sub>2</sub>O、K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>Oで与え、各培地ともNO<sub>3</sub><sup>-</sup>:NH<sub>4</sub><sup>+</sup>の割合を1:1とした。N以外の成分は3培地とも同濃度とし、H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>とK<sup>+</sup>とSO<sub>4</sub><sup>2-</sup>を各4mM、Ca<sup>2+</sup>とMg<sup>2+</sup>を各2mMの濃度にした。なお、N濃度が8、16mMの培地の多量要素濃度は、ニンニクの養液栽培における球重を最大にする培養液の濃度とほぼ同じである<sup>10)</sup>。多量要素以外の成分の組成と濃度は(アデニンを含む)NN培地と同じにしたが、ショ糖は3%、寒天は0.9%の濃度とした。

培養温度は20℃とし、光条件は北窓からの自然散光としたが、朝夕に白熱灯で補光し、13~14時間日長にした。培養57日後の'81年1月19日に生育調査を行った。

## 実験 2. 糖 栄 養

1974年7月収穫の'山形'の4.5~6.5g球を、冬の外気温にさらした後の'75年3月18日に芽を切り出し、幼

葉4枚を切除して試験管内に置床した一芽エキスプラントの構成葉数は約5枚。培地は実験1-bのKN培地からアデニンを除いたものとした。この培地を以後、修正Knudson培地(修正KN培地)と称することにする。なお、Knudson solution C培地の原処方にはアデニンは含まれていない。修正KN培地は原処方の培地と比較して多量要素濃度は同じであるが、微量元素と有機要素の組成と濃度が異なっている。修正KN培地のこれらの成分濃度はNN培地に大体準じた。寒天濃度は本実験では0.8%とした。糖の種類と濃度に関しては、ショ糖2、4、6、8、10、12、14%の区、ブドウ糖2.1、4.2、6.3%の区及び果糖2.1、4.2、6.3%の区を設けた。培養条件は実験1-aと同様に行い(20℃、16時間日長)、培養92日後の'75年6月18日に生育調査を行った。なお、恒温器を無暖房の北向きの室に設置し、室温がほぼ20℃以上になった時期以降は恒温器の覆いの一部を取り外し、室温条件で培養を続けた。

## 実験 3. 供試球の低温処理並びに培地へのオーキシン添加と球形形成

1974年7月収穫以降20℃以上の温度で貯蔵した'山形'の3.0~4.5g球を、11月20日から'75年2月16日までの77日間5、10、15あるいは20℃で温度処理後芽を切り出し、幼葉3枚を切除して試験管内に置床した一芽エキスプラントの構成葉数:5、10℃処理球は5.0枚;15℃処理球は5.3枚;20℃処理球は6.0枚。培地は修正KN培地(寒天0.7%、ショ糖8%)を用いた。NAA濃度は第3図に示した。培養条件は実験2と同様に行い、培養98日後の'75年5月25日に生育調査を行った。

## 実験 4. 球に対する低温処理と芽エキスプラントに対する低温処理

実験3と同様の球を供試した。球に対する低温処理は'74年11月20日から'75年2月1日までの73日間5、10及び20℃で行い、'75年2月1日に芽を切り出して植え込んだ一芽エキスプラントの構成葉数:5、10℃処理球は4.8枚;20℃処理球は4.2枚。培地は修正KN培地を用い(NAA 1mg/l、ショ糖8%、寒天0.7%)培養条件は実験3と同様にした。芽エキスプラントに対する低温処理は、20℃以上の温度で貯蔵していた球の芽を'74年11月20日に切り出して植え込み一芽エキスプラントの構成葉数は4.3枚—、'75年2月1日まで5、10℃で培養することで行った。低温処理中のショ糖濃度を2、4、8、12%の

4段階とした(修正KN培地使用). 2月1日にすべての糖濃度区をショ糖8%の修正KN培地に継代し, 20℃, 16時間日長で培養を続けた. なお, '74年11月20日から20℃, 16時間日長で培養する区を設けて(ショ糖8%の修正KN培地使用), 低温処理しない対照区とした. 5, 10℃培養中の光条件は, 前半の約30日間を暗黒条件とし, その後5℃区ではホモルクス8時間照明(/日), 10℃区では陽光ランプ8時間照明(/日)とした.

球低温処理区, エキスプラント低温処理区とも20℃培養105日目の'75年5月17日に生育調査を行った.

### 実験 5. 生長調節物質と生育・球形形成

#### a. NAA と BA

材料, 方法とも実験1-aと同様である. 基本培地(アデニンを含む)をNN培地とし, NAA 1 mg/lあるいはベルジルアデニン(BA) 2 mg/lの生育・球形形成に及ぼす影響について検討した.

#### b. NAA, BA, GA とエセフォン

材料, 方法とも以下の点を除いて実験1-bと同様で

ある: 4.0~4.5 g球を供試し, 101日間5℃処理球を'74年2月23日に置床し, 培養129日後に調査したこと. 基本培地(アデニンを含む)をNN培地とし, NAA 0.5~4 mg/l, BA 1 mg/l, ジベレリン( $GA_3$ ) 4 mg/l及びエセフォン 4 mg/lについて検討した. GAとエセフォンはろ過滅菌したものをオートクレーブ後の培地に加えた.

#### c. NAA, BA とアデニン

材料, 方法とも実験4の球10℃処理区と同じである. 実験4では培地にアデニンを添加しなかったが, 本実験ではアデニンを添加した区を設けてアデニンの生育に及ぼす影響を検討した.

## 結 果

### 窒素形態と生育・球形形成(実験1-a, 1-b, 1-c)

Nの全量を $NO_3^-$ で与えた場合には芽エキスプラントのほとんどは正常に生長し, (植物が低温前処理されている場合には)幼植物の100%が球(一りん片球)を形成したが, 全Nの77%を $NH_4^+$ で与えた場合には正常に生長したエキスプラントはなかった(第1図, 第3表). しか

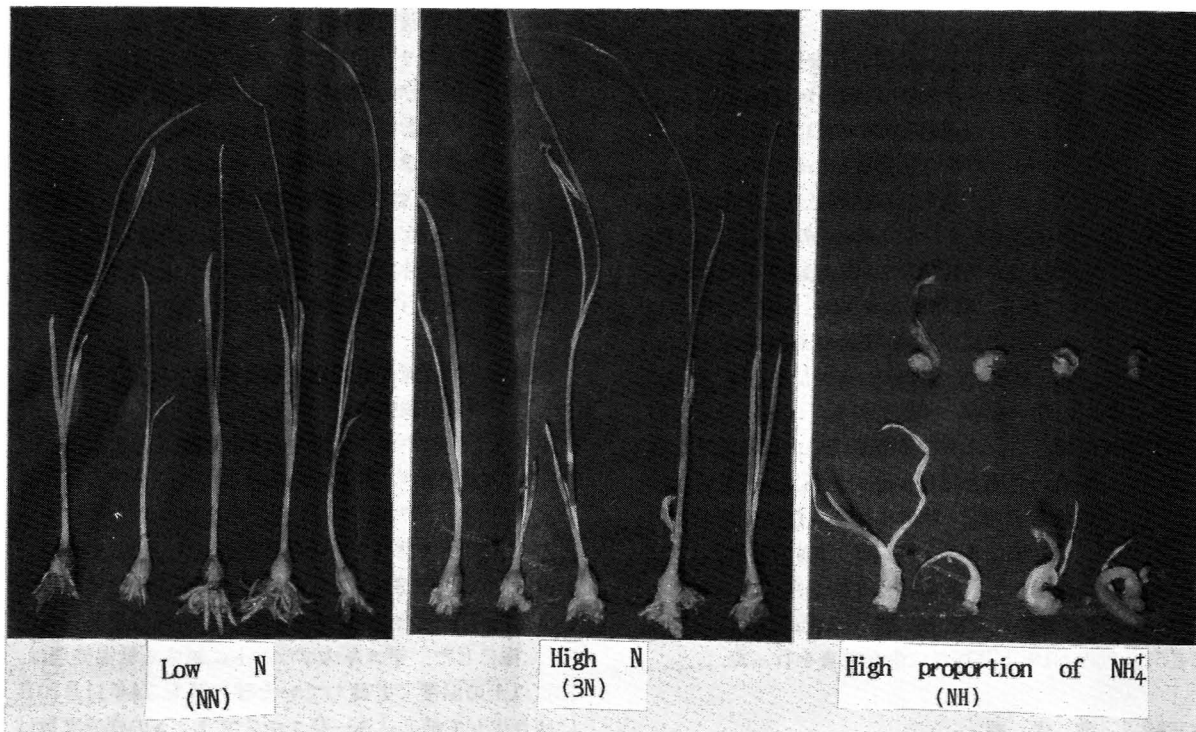


Fig. 1. Effect of nitrogen concentration and high proportion of ammonium-N on growth of excised buds (experiment 1-a).

し、Nの全量が $\text{NO}_3^-$ である培地(TU, NN培地)より、全Nの34%(MS培地)あるいは47%(KN培地)が $\text{NH}_4^+$ で与えられている培地のほうが、シュートと根の生長及び球の肥大が著しく良好で、生長状態も正常であった(第

4表). 全Nに占める $\text{NH}_4^+$ の割合が50%の実験1-cの場合も生長は正常であった(第5表). ただし実験1-cでは芽を切り出す球の低温誘導が不十分であったため、球形成しない個体が多く生じた.

Table 3. Effect of nitrogen concentration and high proportion of ammonium-N on growth and bulb formation of excised buds from the cloves stored at 5 °C for 45 days (experiment 1-a).

Medium	Shoot length (cm)	No. of emerged leaves	Dry wt (mg/plant)	Plants forming bulbs (%) <sup>a</sup>
Low N (NN)	11.7±1.4(11) <sup>a</sup>	3.4±0.2(11)	102	100
High N (3N)	11.9±1.5(12)	3.8±0.3(12)	110	92
High $\text{NH}_4^+$ (NH)	4.0±0.9( 8)	1.1±0.4( 8)	43	0

<sup>a</sup>Mean±SE (N) replicates.

<sup>b</sup>Every plant either formed a single-cloved bulb or remained vegetative.

Table 4. Effect of the high nitrogen media and the media containing ammonium-N on growth and bulb formation of excised buds from the cloves stored at 5 °C for 99 days (experiment 1-b).

Medium	Shoot length (cm)	No. of emerged leaves	Fresh wt of shoot (mg/plant)	Fresh wt of root (mg/plant)	Bulb diam (mm)	Node order <sup>a</sup> forming bulb <sup>b</sup>
MS	19.6±1.2 <sup>a</sup>	5.1±0.3	1263±126	439±132	9.9±0.6	6.1±0.3
TU	17.4±1.3	4.5±0.3	561± 34	68± 28	7.3±0.2	5.6±0.3
KN	20.4±0.8	3.9±0.1	882± 60	230±108	9.5±0.2	4.9±0.1
NN	12.2±1.5	3.8±0.2	538± 53	103± 68	7.8±0.3	4.8±0.2

<sup>a</sup>The node order forming the first foliage leaf→1; the second one→2; etc.

<sup>b</sup>Every plant formed a single-cloved bulb.

<sup>c</sup>Mean±SE of seven to nine replicates.

Table 5. Effect of nitrogen concentration on growth and bulb formation of excised buds from the cloves without low-temperature treatment<sup>a</sup> (experiment 1-c).

N conc. (mM)	Shoot length (cm)	No. of emerged leaves	Total fresh wt of shoot and bulb (10 mg/plant)	Plants forming bulbs (%)
4	11.8±1.2 <sup>a</sup>	4.5±0.2	31±2	42
8	13.0±1.2	4.4±0.3	31±2	20
16	22.0±1.7	4.4±0.2	42±3	0

<sup>a</sup>The cloves were exposed to natural temperatures during the autumn (last four ten-day means of daily mean temperatures: 15.2, 10.2, 9.8, 8.0 °C)

<sup>b</sup>Mean±SE of 13 to 15 replicates.

### 窒素濃度と生育(実験 1-a, 1-b, 1-c)

エキスプラントのシュートの生長は、 $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  比が類似の培地間ではN濃度が高いほど促進される傾向があった(第3, 4, 5表)。

### 窒素濃度と球形成(実験 1-a, 1-b, 1-c)

低温誘導処理が不十分であった球からの芽エキスプラントは球形成率が全般に低かったが(実験 1-c), N濃度が高いほど球形成率は低くなった(第5表)。N濃度が高くなると球形成率の低下する傾向は、球に対する低温処理がやや不足であった実験 1-aでも見られたが(第3表), 球に十分な低温処理を行った実験 1-bではかなりの高N培地でも球形成率は100%になった(第4表)。しかし、高N培地であるMS, TU培地の幼植物の球形成節位は低N培地のものより高くなり、高Nが球形成を抑制する傾向は実験 1-bでも認められた。

### 窒素濃度と球肥大(実験 1-b)

MS培地では球形成節位は上昇したが、球の肥大は著しく促進された(第4表)。また、MS培地では根やシュートの生長も4種の培地のなかで最も良好であった。一方、高Nではあるが $\text{NH}_4^+$ を含まないTU培地では球の肥大が最も不良であった。また、TU培地でのシュートの生長は低Nで $\text{NH}_4^+$ を含まないNN培地と比較してあまり促進されず、根の生長は最も不良であった。KN培地は比較的低Nの培地で、球形成節位はNN培地と同じで最も低く、またシュートや根の生長及び球の肥大はNN培地より著しく良好で、シュート及び根の生長はMS培地に次いで良く、球の肥大はMS培地と同等であった。

### 糖の種類(実験 2)

シュートと根の生長に関しては、2～6%の濃度ではショ糖とブドウ糖の両区間で差なかったが、果糖区ではこれらより劣った(第2図)。球形成節位、球の肥大(すなわち球径、球重)に関しては、2, 4%の濃度では3種の糖の間で差は認められなかったが、6%の濃度では果糖はショ糖より若干劣り、ブドウ糖はかなり劣った。また8%の濃度で比較した別の実験では(未発表)、ショ糖区はシュートの生長があまり抑制されず、100%球形成したが、ブドウ糖及び果糖の両区はシュートの生長が抑制されて、異常な生育を示し、また球形成しない個体がそれぞれ13個体中3個体及び10個体中3個体生じた。

### 糖濃度(実験 2)

ショ糖濃度が2%から14%まで高くなるほど葉の伸長(草丈)が不良になり出葉数の減少する傾向が認められた。しかし、根重はショ糖濃度が8%までは高くなるほ

ど増加する傾向があり、また球形成(球形成節位—低いほど促進、球形成率—高いほど促進)及び球肥大(球径、球重)もショ糖濃度が8%までは高くなるほど促進された(あるいは増大した)。根重はショ糖濃度10%以上では濃度が高くなるほど減少したが、球の形成・肥大は濃度8～14%の間で明白な増減はなかった。しかし、別の実験(未発表)ではショ糖濃度が16%になると12%濃度に比べて球形成が明白に抑制された。

### 低温処理と球形成(実験 3, 4)

収穫後20℃以上の温度で貯蔵された球から芽を切り出し、20℃, 16時間日長条件で培養した場合にはシュートは正常に生長し根の発達も比較的良好であったが、培養開始98日後(実験 3)さらに178日後(実験 4)でも球形成は認められなかった(第3, 4図)。

培養後の球形成は、芽を切り出す球を5, 10℃の温度で処理した場合には10℃処理, NAA 2mg/l区を除いて100%の球形成率を示したが(2カ月半低温処理の場合)、15℃処理では球形成率がNAA濃度にかかわらず約50%以下であった(第3図)。

低温処理は培養開始後の芽エキスプラントに行っても有効で(第4図)、培養開始直後から5℃で2カ月半処理すると100%の球形成率を示した。しかし、10℃処理では球形成しない個体が生じ、特に低温処理時の培地のショ糖濃度が低い区(2%)では球形成率が40%にとどまった。5℃処理でもショ糖濃度が2%の区では球肥大が4%以上の区より若干劣った。

低温処理を芽を切り出す前の球で行った区は、切り出し後の芽エキスプラントに低温処理した区に比較して、10℃処理区では培養幼植物の球形成節位が低くなり、球形成率が高くなった。球の肥大も球低温処理区が5, 10℃区ともエキスプラント低温処理区よりも若干良好であった。

### オーキシンと球の形成・肥大(実験 3, 5-a, 5-b, 5-c)

1mg/lのNAAを添加すると球形成率の上昇(第6表)、あるいは、球形成節位の低下する傾向が認められた(第5図)。すなわち、球形成促進の効果が認められた。しかし、NAA濃度が2mg/lになると、低温処理が弱い場合には球形成抑制の効果が認められた(第3図, 10, 15℃区)。しかし、低温処理が強い場合には少なくともNAAが4mg/lまでは球形成を抑制しなかった(第5図)。

球形成が起こる条件下で1mg/lのNAAを添加すると球の肥大が著しく促進された(第3, 5図, 第7表)。NAA濃度が0.5mg/lでは球の肥大が1mg/lの場合より

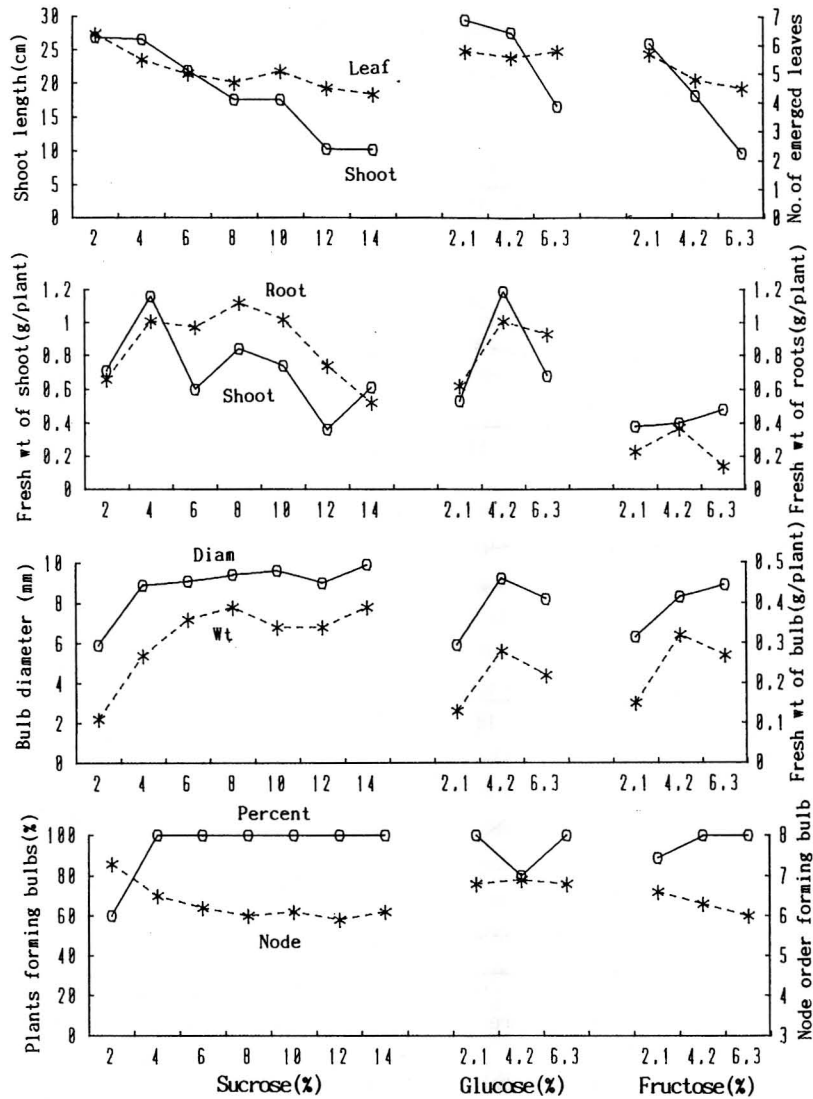


Fig. 2. Effect of kind and concentration of saccharides on growth and bulb formation of excised buds from the cloves stored at outdoor temperatures during the winter (experiment 2). Replication approximately 12.



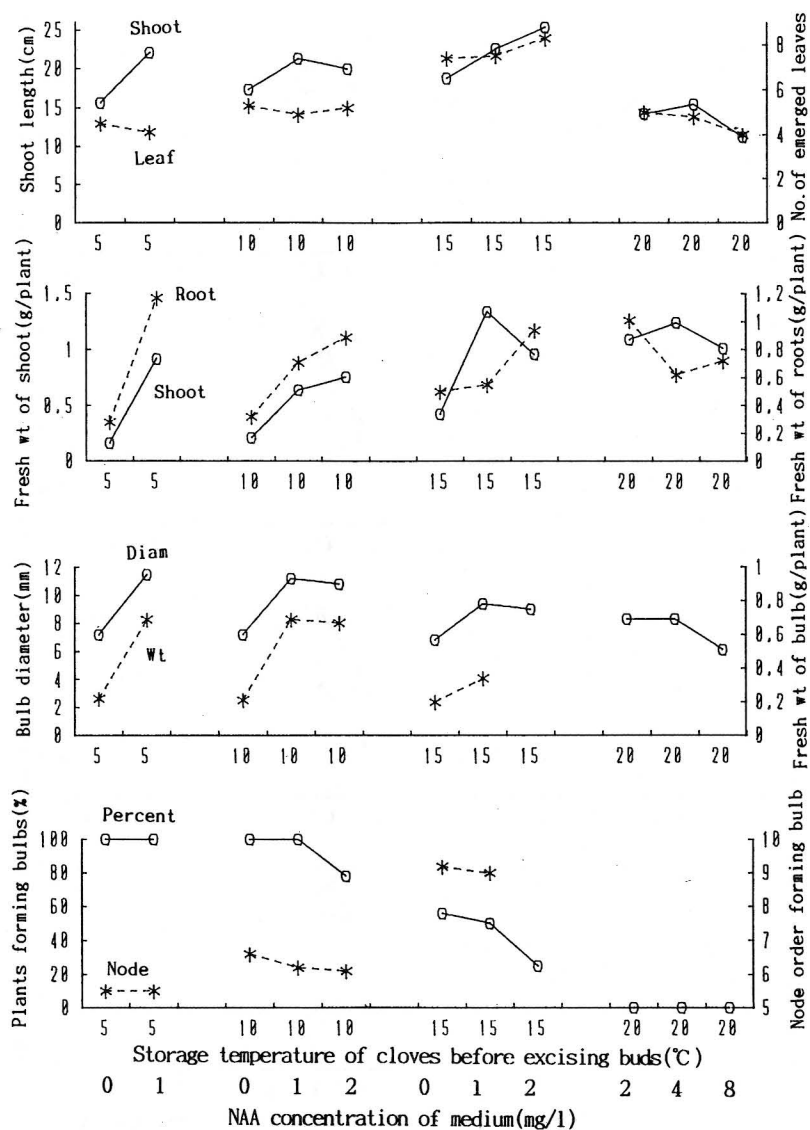


Fig. 3. Effect of low-temperature treatments to cloves before excising buds and auxin supplemented in media on growth and bulb formation of excised buds (experiment 3). Replication approximately 10.



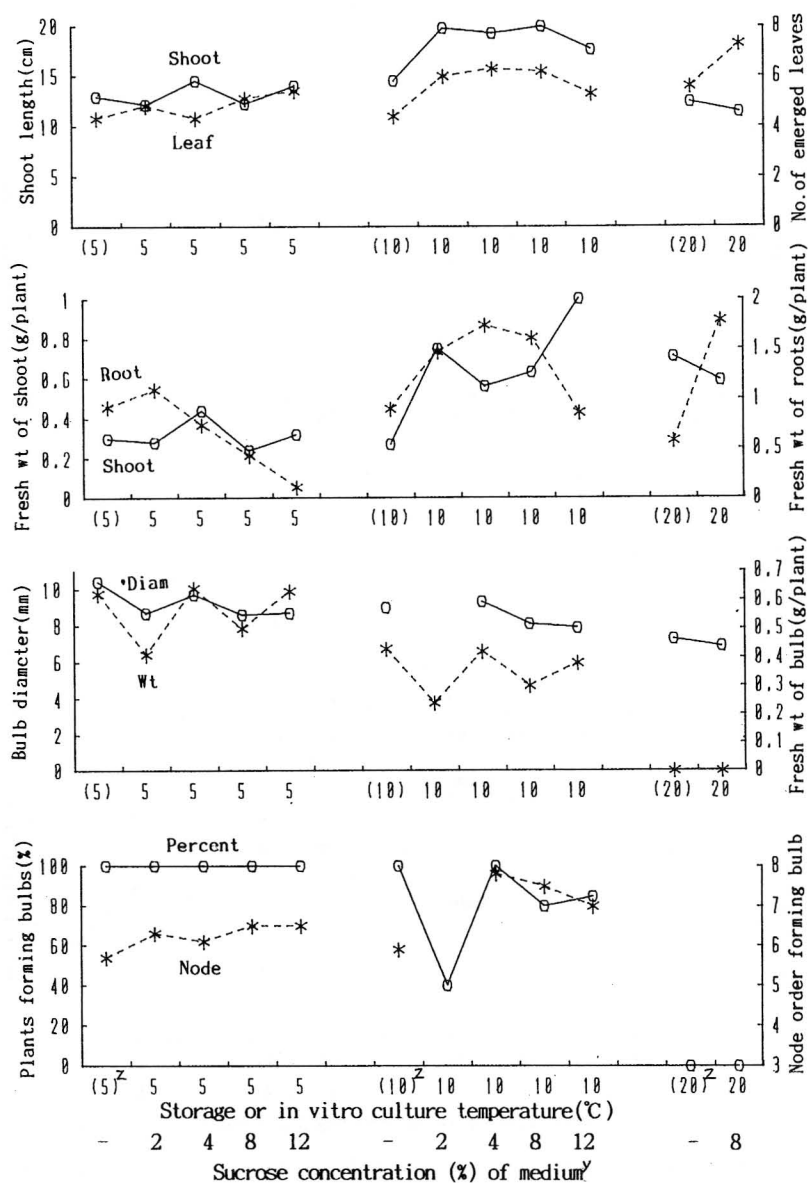


Fig. 4. Effect of low-temperature treatments to explants or cloves and sucrose concentration in media during the cold treatments on growth and bulb formation of excised buds (experiment 4). Replication 12.

<sup>z</sup> The cloves before excising buds were chilled at given temperatures.

<sup>y</sup> After the chilling culture, all the explants were subcultured at 20°C by transferring to fresh medium containing 8 % sucrose.

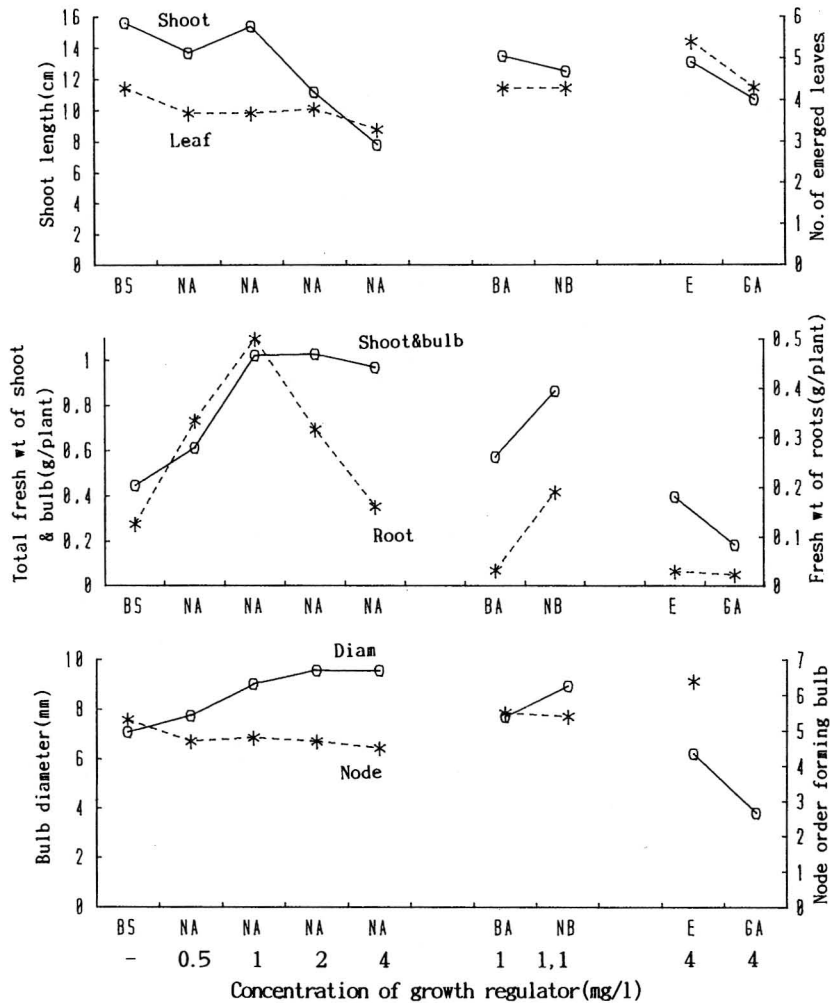


Fig. 5. Effect of growth regulators on growth and bulb formation of excised buds from the cloves stored at 5°C for 101 days (experiment 5-b). Replication 9 to 11.

BS: basic medium. NA: NAA. BA: benzyladenine. NB: NAA with BA. E: ethephon. GA: gibberellin. Cultured at 13°C for 129 days. All the plantlets on GA-medium formed no bulb by the end of the culture. All ones on the other media formed bulbs.

Table 6. Effect of NAA (1 mg/l) and BA (benzyladenine) (2 mg/l) on growth and bulb formation of excised buds from the cloves stored at 5 °C for 45 days (experiment 5-a).

Growth regulator	Shoot length (cm)	No. of emerged leaves	Dry wt (mg/plant)	Plants forming bulbs (%)
Adenine <sup>a</sup>	17.8±0.6 <sup>y</sup>	4.0±0.4	35	0
NAA, adenine	13.8±1.1	3.5±0.3	102	100
BA, adenine	7.3±0.8	3.1±0.4	51	36
NAA, BA, adenine	7.0±1.2	3.3±0.2	80	63

<sup>a</sup>8 mg/l as sulfate.<sup>y</sup>Mean±SE of 8 to 11 replicates.

劣った(第5図)。しかし、NAA濃度を2 mg/l以上にしても球の肥大がより促進されることはなかった(第3, 5図)。

#### オーキシシンと幼植物の生育(実験3, 5-a, 5-b, 5-c)

NAAを1 mg/l添加すると(球を除く)茎葉重と根重が著しく増大したが(第3, 5図, 第7表), 葉の伸長は促進される場合(第3図, 第7表)と促進されない場合(第5図, 第6表)とがあった。出葉数はNAA添加による影響があまりなかった。

根は、オーキシシンフリーの場合には細長く生長したが、NAA濃度が高くなるにしたがって、伸長生長が抑制され太く短く生長する傾向があった(第6図)。根重は、NAA濃度1 mg/lの場合に最大になり、それより濃度が

低くまた高くなるにしたがってより減少した(第5図)。

#### BA, エセフォン, GA 及びアデニンと球形成・生育(実験5-a, 5-b, 5-c)

BA(1 mg/l)を単用した場合には、球肥大がわずかに促進される傾向が認められたが(第7表, 第5図), 同実験では球形成節位には影響がみられず、球形成に対してのBA(1 mg/l)の効果は明白でなかった。しかし、BAを2 mg/lで単用した実験5-a(第6表)では球形成が若干促進された。BAとNAAを混用しても球の形成・肥大に関しては、NAA単用以上の効果は認められなかった(第6表, 第5図)。

BAは根の発生を抑制し、根重を著しく少なくした(第5図, 第7表)。BAは葉の伸長を抑制したが、出葉数

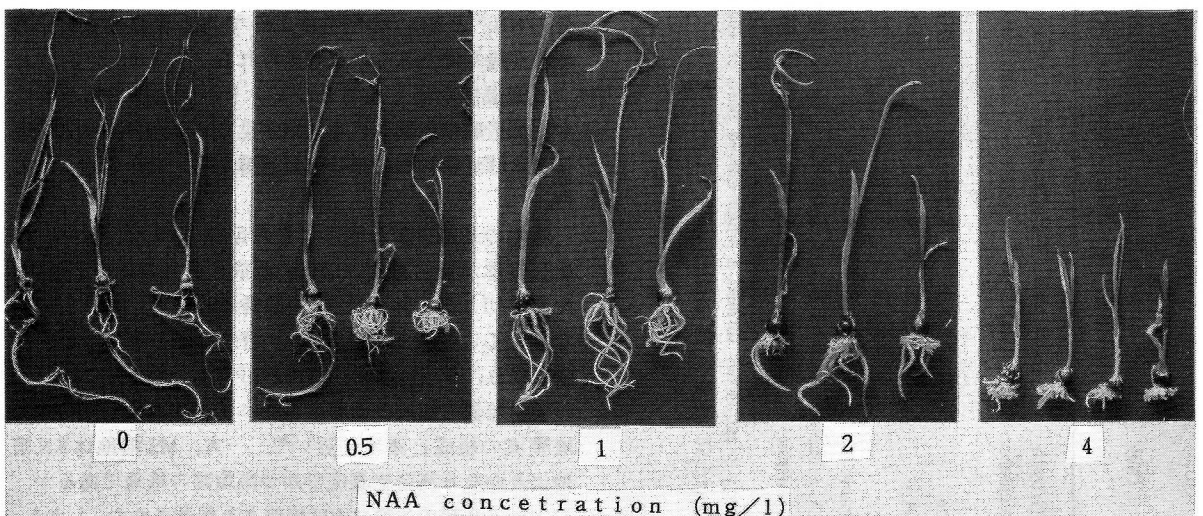


Fig. 6. Effect of NAA concentration on growth of shoots and roots of excised buds (experiment 5-b).

Table 7. Effect of NAA (1 mg/l), BA (1 mg/l) and adenine (8 mg/l as sulfate) on growth and bulb formation of excised buds from the cloves stored at 10°C for 73 day (experiment 5-c).

Growth regulator	Shoot length (cm)	No. of emerged leaves	Fresh wt of shoot (10 mg/plant)	Fresh wt of root (10 mg/plant)	Bulb diam (mm)	Fresh wt of bulb (10 mg/plant)	Node order forming bulb	Plants forming bulb <sup>*</sup> (%)
None	17.4±0.9 <sup>y</sup>	5.3±0.3	20±2	32±5	7.2±0.8	21±2	6.6±0.2	100
NAA	21.3±1.5	4.9±0.6	64±10	71±12	11.2±1.2	69±5	6.2±0.2	100
BA	15.8±0.9	5.5±0.2	22±2	7±3	8.6±0.2	33±3	6.5±0.2	100
Adenine	15.9±1.5	4.9±0.6	14±2	13±2	7.0±0.3	20±3	6.7±0.3	100
NAA, adenine	18.6±1.5	5.0±0.3	44±8	53±13	11.1±0.3	72±5	6.2±0.3	100
BA, adenine	13.7±0.8	5.4±0.3	26±4	2±1	8.5±0.3	35±3	6.8±0.3	91

<sup>\*</sup>Every plant either formed a single-cloved bulb or remained vegetative.<sup>y</sup>Mean±SE of 8 to 11 replicates.

にはほとんど影響を及ぼさなかった(第6, 7表, 第5図)。

エセフォン(4 mg/l)は球が強い低温処理を受けていた場合でも球形成節位を上昇させ(球形成を抑制し), また球肥大を抑制した(第5図)。エセフォンは葉の伸長を抑制したが, 出葉数を増加させた。また, エセフォンは根の発生と伸長を抑制した。

GA(4 mg/l)は出葉数を除いて栄養生長を全般的に抑制し, GA区の幼植物は草丈が小さく, 根が少なく細長かった。またGAは球形成を著しく抑制した(第5図)。

アデニン(8 mg/l)の添加は葉の伸長を抑制し, 根重を減少させたが, 球の形成・肥大にはほとんど影響を及ぼさなかった(第7表)。

## 考 察

### 窒素栄養

ニンニクの水耕栽培においては培養液N成分の $\text{NH}_4^+$ と $\text{NO}_3^-$ の割合が1:1の場合に生育・球肥大が最も優れたが<sup>14)</sup>, 芽組織片の*in vitro*培養においても $\text{NH}_4^+$ が全Nの1/3(MS培地)から1/2(KN培地)含まれている培地での生育・球肥大が, 全Nが $\text{NO}_3^-$ の培地でのそれより著しく優れた。これらの培地でのN以外の多量要素濃度は互いにかなり異なるが, ニンニクの養液栽培ではN以外の多量要素濃度の生育・球肥大に及ぼす影響はNに比較すると極めて小さく<sup>14)</sup>, テストした培地での生育・球肥大の差も主としてN成分の形態と濃度によるものと考えられる。従って, ニンニクの茎頂培養でも培地のN成分の $\text{NH}_4^+$ と $\text{NO}_3^-$ の割合が1:1である場合に生育・球肥大が最も優れるものと考えられる。

窒素濃度が高くなるとシュートの生長は促進されたが, 球形成は抑制される傾向が見られ, この高窒素濃度による球形成抑制効果は低温誘導が弱い場合に強く生じた。

培地の最適窒素濃度は培養の目的(例えばシュートの生長促進が目的あるいは球の形成・肥大の促進が目的)や芽を切り出す球の前歴(低温誘導の程度)によって異なってくると考えられる。KN培地は球の形成・肥大が最も優れ, シュートの生長も良好であったが, この培地の多量要素の組成と濃度はニンニクの養液栽培での最適培養液の組成と濃度に近い<sup>14)</sup>。一方, MS培地はKN培地よりかなり高窒素濃度でかつ高塩類の培地であるが, シュートや根の生育はKN培地より促進された。しかし, 球の形成・成熟はKN培地より遅くなった。MS培地は

シュートの栄養生長促進を目的とする場合には適した培地であろう。

TU 培地は窒素濃度が高いにもかかわらず、シュートの生長が低 N の NN 培地よりあまり促進されず、球の形成・肥大も NN 培地より不良であった。TU 培地と他の培地との成分組成上の主な差異は前者が NaCl をかなり多量に含むことである。ニンニクの養液栽培では培養液中に Cl が多量に含まれていると球重が小さくなる<sup>10)</sup>。TU 培地で生育があまり促進されず、また球の形成肥大が不良であったのは、Cl が多量に含まれていたことによるのであろう。

### 糖 栄 養

ショ糖、ブドウ糖、果糖のうちではショ糖がエキスプラントの生長、球の形成・肥大の点から見て比較的優れていた。糖濃度が高くなると球の形成部位が低くなり、球形成促進効果が見られたが、寺分ら<sup>15)</sup>は‘沓州早生’の芽の培養でショ糖濃度が 8 % 以上になると低温無経過でかつ短日の条件下でも球形成が見られたとしている。‘沓州早生’のインタクトな植物は低温無経過の短日条件下でも遅延はするが球形成を起こしている<sup>13)</sup>。従って、寺分らの実験の場合も、もともと球形成能力のある植物の球形成を高濃度の糖が単に促進した例——球形成誘起ではない——と考えることができるであろう。本実験では芽を切り出した球は既に十分な低温誘導を受けている。それでもショ糖 2 % では調査時点までに球形成しない個体が少なからずあった。球を速やかに形成させるためにはショ糖では 4 % 以上の濃度が必要と考えられ、6 ~ 8 % で球形成促進効果が最大に達した。それ以上の糖濃度では球の形成肥大は抑制されないものの、シュートや根の発達が抑制され、エキスプラントは正常に生育しなくなった。十分な低温誘導を与えた球を材料としての茎頂培養におけるショ糖濃度は、シュートや根の発達とともに球の形成も重視する場合には 4 % 程度が、球の形成・肥大をより重視する場合には 6 ~ 8 % の濃度が適当であろう。

### 低温処理と球形成

芽組織片あるいは茎頂の *in vitro* での球形成と低温との関係はインタクトな植物のそれとほぼ同じであると推定される。低温前処理した球から芽あるいは茎頂を切り出す場合は、低温処理の要求度はインタクトな植物での球形成の場合とあまり差はないと考えられる。しかし、植え込んでから低温処理する場合には低温処理中の培地のショ糖濃度が低いと低温効果が劣り、また低温処理を

インタクトな植物の場合に比較してより強く行わないと十分な効果が得られなかった。

### 生長調節物質

ニンニクの茎頂培養ではホルモンフリーの培地<sup>7)</sup>や NAA 0.01 mg/l のかなり低濃度のオーキシシンを含んだ培地<sup>5)</sup>が使用されており、サイトカイニンを混用した NAA 0.1 mg/l 以上の培地では正常なシュートが発達しにくく、茎頂の肥大組織化<sup>1,9)</sup>やカルス化<sup>3,5,11)</sup>、不定芽形成<sup>2)</sup>などが誘起されやすくなるとされる。本実験では上記の報告のような典型的な茎頂培養ではなく、数枚以上の幼葉ないし葉原基を持った芽の培養であったため、NAA 1 ~ 4 mg/l を添加してもほとんどすべてのエキスプラントが正常なシュートを発達させ、シュートの発達はホルモンフリーより NAA 1 mg/l 程度の培地で最も優れ、また根重も 1 mg/l の場合に最大になった。

NAA 1 mg/l の添加は球形成を促進したが、2 mg/l 以上では球形成に抑制的に作用した。このわずかな濃度差で効果が逆になった理由は不明であるが、高濃度の NAA (10 mg/l) が球形成を抑制することは寺分ら<sup>15)</sup>も報告している。

形成された球の肥大は NAA の添加によって著しく促進され、2 mg/l でその効果が最大になり、4 mg/l でも肥大効果は劣らなかった。BA, GA とエセフオンのうち明白な生長促進効果が見られたのはエセフオンの出葉数の増加のみであった。BA は NAA と混用した場合、茎頂培養では不定芽形成<sup>2)</sup>、カルス化<sup>5,11)</sup>や茎頂の肥大組織化<sup>1,9)</sup>などの形態形成効果を示すが、本実験のような芽の培養では、NAA 単用以上の生育促進効果は見られなかった。

茎頂培養では培地にアデニンを添加することを勧める研究者も少なくないが<sup>30)</sup>、本実験ではアデニン添加によるプラスの効果はほとんど認められなかった。

### 摘 要

ニンニク品種‘山形’を供試して、側球から切り出した芽エキスプラントの *in vitro* での生育と球の形成・肥大を促進する栄養、生長調節物質及び温度要因を検討した。

1. 全 N が  $\text{NO}_3^-$  の培地よりも全 N の 1/3 から 1/2 が  $\text{NH}_4^+$  で与えられている培地のほうが栄養生長(シュートと根)、球肥大とも著しく優れた。

2. N 濃度が高いほどシュートの栄養生長は促進されたが、球形成は抑制された。しかし、形成された球は N

濃度が高いほど肥大が促進された。

3. ショ糖、ブドウ糖及び果糖の比較では、ショ糖が栄養生長と球の形成・肥大の点で比較的優れていた。果糖は栄養生長を抑制し、ブドウ糖は高濃度で球形成を抑制した。

4. ショ糖濃度が高くなるに従って(2→8%), 球の形成肥大はより促進されたが、シュートの生長はより抑制された。

5. 芽を切り出す前の球か、あるいは植え込み後の芽エキスプラントが低温に一定期間さらされないと、エキスプラントはその後に球を形成しなかった。

6. NAA 1mg/lの添加はシュートと根の生長及び球の形成・肥大を促進した。しかし、低温誘導が不十分な場合には2mg/l以上のNAAは球形成を抑制した。

7. BA, GA, エセフォンあるいはアデニンを添加しても生育・球形成を促進する明白な効果は認められなかった。

#### 引用文献

- 1) 綾部昌則・佐藤禎浩・岩田 光・谷口研至・田中隆莊. 1987. ニンニクの苗条原基法. 育雑. 37(別冊1): 132-133.
- 2) BHOJWANO, S. S. 1980. In vitro propagation of garlic by shoot proliferation. Scientia Hort. 13: 47-52.
- 3) 原田 隆・八鍬利郎・菅沼義一・松沢 茂. 1974. 園芸植物のウイルスフリー株育成に関する研究(第2報)ニンニクの茎頂培養における培地組成と移植の影響. 園学要旨. 昭49春: 166-167.
- 4) KNUDSON, L. 1946. A new nutrient solution for the germination of orchid seeds. Amer. Orchid Soc. Bull. 15: 214-217.
- 5) 松原幸子・陳 典. 1986. ニンニクのウイルスフリー株の育成・増殖・栽培(第1報)材料採種時期および順化. 園学要旨. 昭61春: 168-169.
- 6) 森 寛一・浜屋悦次・下村 徹・池上 春. 1969. 組織培養法によるウイルス罹病植物の無毒化. 農事試験報. 13: 45-110.
- 7) 森 憲昭. 1988. ニンニクの大量増殖法. 農及園. 63: 169-174.
- 8) MURASHIGE, T. and SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497.
- 9) 長久保有之・長沢秋都・村中俊哉・大川秀郎. 1987. ニンニクの in vitro 小球根形成. 第10回植物組織培養シンポジウム講演要旨集: 95.
- 10) NITSCH, C. and NITSCH, J. P. 1967. The induction of flowering in vitro in stem segments of *Plumbago indica* L. I. The production of vegetative buds. Planta, 72: 355-370.
- 11) 大沢勝次・我孫子和雄・栗山尚志・西 貞夫・湯浅三男・森 憲昭. 1976. カルス組織の利用によるニンニクのウイルスフリー株育成. 園学要旨. 昭51秋: 98-99.
- 12) 高樹英明・青葉 高. 1975. ニンニクの球形成に関する研究(第9報)頂芽の試験管内培養. 園学要旨. 昭50秋: 154-155.
- 13) 高樹英明. 1979. ニンニクの球形成と休眠に関する研究. 山形大学紀要(農学). 8(2)別冊: 507-599.
- 14) 高樹英明. 1987. ニンニクの栄養生理と施肥に関する研究(第1報)養液栽培に適した培養液組成・濃度. 山形大学紀要(農学). 10: 381-396.
- 15) 寺分元一・古川康德・稲垣 昇・前川 進. 1986. ニンニクの器官培養によるりん茎形成. 園学要旨. 昭61秋: 214-215.
- 16) TULECKE, W. 1964. A haploid tissue culture from the female gametophyte of *Ginkgo biloba* L. Nature. 203: 94-95.