学位論文題名

組織培養を利用したネギ属植物の
栄養繁殖に関する基礎的研究

学位論文内容の要旨

本研究は、*in vitro*培養におけるネギ属植物の特性を明らかにし、大量増殖ならびに新たな品種・系統の作出に利用できる培養系を確立するため、7種のネギ属植物を用い、*in vitro*培養における形態形成、植物体再生ならびに再生幼植物の馴化について検討を行ったもので、内容の概要は以下の通りである。

1. embryogenic callusの誘導と維持・増殖

ニンニク成植物の鱗茎底盤組織からの embryogenic callus形成には p-CPA 10 μ M、カイネチン 1 μ M および 2,4-D 10 μ M を添加した A Z 培地が適しており、70% 以上の高い形成率が得られた。embryogenic callusの形成には、2,4-D が重要な役割を果たしており、p-CPA は補助的に働いていることが実証された。また、基本培地の影響が認められ、用いた7種類の基本培地の中では S H、A Z および B₅ 培地が適していた。さらに、培養部位によってカルス形成の状態が異なり、底盤組織が最も適していた。

ネギおよびタマネギの芽生えおよび芽生え基部切片を培養することにより embryogenic callus が効率よく誘導され、2,4-D の添加が不可欠であった。ネギの芽生えからの誘導には 2,4-D 10 μ M 単独添加、タマネギの芽生え基部切片からの誘導には p-CPA 1 μ M、2,4-D 1 μ M およびカイネチン 1~10 μ M を添加した A Z 培地が適していた。

タマネギおよびニンニクの embryogenic callus の継代培養による維持・増殖には、2,4-D 1 μ M の添加が効果的であった。

2. embryogenic callusからの胚様体の形成

ニンニクでは、embryogenic callusの内部に周囲のカルスとは独立している分裂組織が観察され、これらの一部は双極性の構造を呈していた。ネギでは、芽生え基部由来のembryogenic callusの内部に胚様体の発生および球状胚が認められた。タマネギでは、球状胚、棒状胚が形成され、種子胚の形成過程と類似しており、完全な植物体まで発育した。リーキでは、芽生え基部由来のカルス内に胚様体が観察され、完全な植物体に至るまで発育した。ニンニク、ネギ、タマネギおよびリーキの4種においては胚様体が形成されることを確認した。

ネギおよびニンニクのembryogenic callusを液体培地に移植して振盪培養することにより、遊離した状態の胚様体が形成された。形成された胚様体をさらに液体培地に移植して継代培養すると、子葉と根が識別できる段階まで発育した。ニンニクの胚様体形成には、生長調節物質無添加またはNAA 1 μ M単独添加が有効であった。

3. 胚様体からの植物体再生

ニンニクの胚様体からの植物体再生には、1 μ M程度のNAAと5~10 μ MのBAの添加が適しており、75%以上の再生率が得られた。ネギ、タマネギの胚様体からの植物体再生には、NAAとBAを組み合わせて添加するよりもゼアチン単用のほうが有効であった。また、ニンニクおよびネギの単離された胚様体からも植物体を再生させることができた。

4. カルスからの多芽体および不定芽の形成

ニラ、リーキ、ラッキョウおよびギョウジャニンニクではカルスから不定芽および多芽体を形成させることができた。ニラではBA 25 μ Mを添加したMS培地で68.8%の多芽体形成率が得られ、リーキではBA 5 μ Mを添加したMS培地で不定芽および多芽体の形成

率が93.4%と高かった。ラッキョウではBA 30 μ Mを添加したSH培地が不定芽および多芽体の形成に有効であった。また、ギョウジャニンニクでは、不定芽形成に対する基本培地の影響が認められ、MS培地よりもBDS培地のほうが適していた。

5. 外植体からの多芽体および不定芽の形成

ギョウジャニンニク成植物の茎頂から多芽体が形成され、NAA 1 μ MとBA 10~100 μ Mを添加したMS培地で62.5%の形成率が得られた。形成した多芽体を分割して移植することにより、繰り返して多芽体を誘導することが可能であった。この場合、MS培地よりもBDS培地が適しており、BA 30 μ Mの添加が効果的であった。

リーキ成植物の花床部組織から多芽体が形成され、NAA 1 μ MとBA 30 μ Mを添加したBDS培地が有効であった。

ラッキョウ成植物の鱗茎底盤組織からの多芽体形成にはNAA 1 μ MとBA 10 μ Mの添加が有効であった。また、形成された茎葉の基部が肥大して小さな鱗茎を形成した。

ギョウジャニンニクの多芽体の形成過程は、置床した茎頂組織がまず肥大し、数ミリ程度の大きさに生長した後、不定芽を分化することが明らかとなった。組織学的観察では、不定芽は組織片内部の細胞から形成されることが確認された。

6. 多芽体および不定芽からの植物体形成

ネギ、ギョウジャニンニクおよびリーキのカルス由来の不定芽から植物体を効率的に形成させることができた。ネギではIBA 0.5 μ M、ゼアチン1 μ Mおよびゲルライト0.4%を添加したSH培地が適していた。ギョウジャニンニクではNAA 1 μ Mとカイネチン1 μ Mの添加、リーキでは生長調節物質無添加のMS培地でそれぞれ100%および76.5%の植物体形成率が得られた。

ネギ、ニラ、リーキおよびラッキョウの多芽体を分割して移植すると、植物体が効率よく形成され、いずれも85%以上の形成率が得られた。ネギおよびニラでは2,4-D無添加、リーキおよびラッキョウではNAA無添加のMS培地が適していた。

7. *in vitro*培養における品種間差ならびに種間差

ニンニク、ネギおよびタマネギでは、embryogenic callus形成および植物体再生における品種間差が認められた。ニンニクで用いた8品種・系統の中で‘在来FB’および‘ホワイト’の2品種ではembryogenic callus形成能および個体再生能がいずれも高かった。一方、カルス形成および器官再分化には種により大きな差が認められ、種の培養特性が明らかとなった。

8. 再生した幼植物の馴化

ニラ、リーキ、ギョウジャニンニクの再生幼植物を馴化する際には、床土中のパーミキュライトと土の混合比を、ニラでは1:5、リーキでは3:1、ギョウジャニンニクでは1:1にすることにより活着率が71.4~100%と高く、生育状況も良好であった。再生した植物は、ニンニクでは全て2倍体であり、ネギではほとんど2倍体であったが、5%程度の4倍体も認められた。

以上のように、本研究は、ネギ属植物の各種組織の*in vitro*培養における培養特性を明らかにするとともに、培養条件について検討し、大量増殖ならびに新たな品種・系統の作出に利用できる培養系を確立するための基礎を提起したもので、これらを発展させることにより、さらに有効な方法が開発できるものと考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 原 田 隆
副 査 教 授 筒 井 澄
副 査 教 授 喜久田 嘉 郎

学 位 論 文 題 名

組織培養を利用したネギ属植物の栄養繁殖に関する基礎的研究

本論文は、7章および序論、摘要、引用文献205編からなり、図61、表70を含む273頁の和文論文で、別に参考論文2編が添えられている。

ネギ属植物約450種の中で野菜として利用されている種は、ニンニク (*Allium sativum* L.)、ネギ (*A. fistulosum* L.)、タマネギ (*A. cepa* L.)、ニラ (*A. tuberosum* ROTT.)、ラッキョウ (*A. chinense* G. DON)、リーキ (*A. porrum* L.)、ギョウジャニンニク (*A. victorialis* L. ssp. *platyphyllum* Hult.) などであるが、これらの中には、正常に開花、結実して完全な種子を形成するもの、花器が不完全でほとんど結実しないもの、さらに、全く抽だいしないものなどがある。ニンニク、ラッキョウなどは種子を形成しないため、実際の栽培においては鱗茎または珠芽による栄養繁殖が行われているが、増殖率の低いことが問題となっており、組織培養法による効率的な増殖法の確立が望まれている。また、このような栄養繁殖性のもものでは、優良個体の選抜・増殖を行い栽培面で利用すると効果が大きいと考えられる。一方、ネギ、タマネギなど種子繁殖が可能な種では、近年、雄性不稔系統を利用したF₁品種が育成され効果をあげているが、この場合、雄性不稔系統の維持・増殖が重要となり、組織培養法の利用が有効であると考えられる。

本研究は、7種のネギ属野菜の各種組織を培養し、embryogenic callus、胚様体、不定芽、多芽体、茎葉、根の形成および植物体再生などについて、培養組織の種類、基本培地、生長調節物質添加などとの関連から検討したものである。

1. embryogenic callusの誘導と維持・増殖

embryogenic callusを誘導し胚様体を経て植物体を再生させる方法が大量増殖に有効であることから、これについて検討した。

ニンニクでは、珠芽または鱗茎の底盤組織からのembryogenic callusの形成には、A Z培地を基本とし、生長調節物質として p-CPA 10 μ M、カイネチン1 μ Mおよび2,4-D 10 μ Mを含み、ショ糖2%、ゲルライト0.2%を添加した培地が最も適当で、特に2,4-Dの添加が重要であることが明らかになった。また、用いた8品種の中で‘在来FB’および‘ホワイト’が特に高い形成率を示した。ネギの芽生えおよびタマネギの芽生え基部切片を培養するとembryogenic callusを効率よく形成し、形成率はそれぞれ90.5%、81.3%であった。

2. embryogenic callusからの胚様体の形成

形成されたembryogenic callusを生長調節物質無添加またはNAA 1 μ Mを添加した液体培地に移植して振盪培養を行うと胚様体を形成した。ニンニクでは、150mgのembryogenic callusから29個の胚様体が形成された。また形態的な観察によると、ニンニク、ネギ、タマネギおよびリーキではembryogenic callusの内部に球状胚、棒状胚などが種子胚と似た過程を経て形成されることを確認した。

3. 胚様体からの植物体再生

胚様体を移植して培養すると茎葉、根を形成し2か月後に植物体が再生した。ニンニクでは、NAA 1 μ MとBA 5~10 μ Mの添加が適切であり、75%以上の再生率を示した。ネギ、タマネギでは、ゼ

アチンの単独添加が有効であった。

4. 外植体からの多芽体および不定芽の形成

外植体から直接多芽体および不定芽を形成させ、これを分割して移植し植物体を再生させる培養系は栄養繁殖法としての効果が大きい。リーキ（花床部組織）、ラッキョウ（鱗茎底盤組織）、ギョウジャニンニク（茎頂）では、NAA $1\mu\text{M}$ と高濃度のBA（ $10\sim 100\mu\text{M}$ ）を含む培地で培養すると多芽体または不定芽を形成した。多芽体は分割して移植することにより、さらに多くの多芽体を形成することがわかった。

5. 多芽体および不定芽からの植物体再生

ネギ、ニラ、リーキおよびラッキョウの多芽体を分割して移植すると85~100%の高率で植物体を再生し、この場合、MS培地を用い生長調節物質無添加とするのが適切であった。一方、ネギ、ギョウジャニンニクでは、不定芽から植物体を再生させることができた。

6. 再生した幼植物の馴化

再生した幼植物はバーミキュライトと土を混合した床土に鉢上げして馴化することができた。この場合、混合比を、3:1（リーキ）、1:1（ギョウジャニンニク）、1:5（ニラ）のよう変えると良好な生育を示した。再生した植物は、ニンニクでは全て2倍体であり、ネギではほとんど2倍体であったが、5%程度の4倍体も認められた。

以上のように本研究の成果は、ネギ属野菜の栄養繁殖ならびに大量増殖に利用することにより栽培の効率化に大きく寄与するものと考えられる。

よって審査員一同は、最終試験の結果と合わせて、本論文の提出者 薛 惠民は博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格があるものと認定した。