

# ニンニクの底盤と花床部由来カルスにおける不定胚の形成と 植物体再生

誌名	園藝學會雜誌
ISSN	00137626
巻/号	603
掲載ページ	p. 627-634
発行年月	1991年12月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター  
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council  
Secretariat



## ニンニクの底盤と花床部由来カルスにおける 不定胚の形成と植物体再生

薛 惠民<sup>1</sup>・荒木 肇<sup>1\*</sup>・石 嶺<sup>2</sup>・八鍬利郎<sup>1</sup>

<sup>1</sup>北海道大学農学部 060 札幌市北区北9条西9丁目

<sup>2</sup>内蒙古農牧学院 中華人民共和国呼和浩特市

Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration in Basal Plate and Receptacle  
Derived-Callus Cultures of Garlic (*Allium sativum* L.)

Hui-min Xue<sup>1</sup>, Hajime Araki<sup>1</sup>, Ling Shi<sup>2</sup> and Toshiro Yakuwa<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo 060

<sup>2</sup> Agricultural College of Inner Mongolia, Hohhot, China

### Summary

Induction of embryogenic callus was achieved from the basal plate with a shoot apex of the bulb and the aerial bulblet, and from a receptacle tissue in garlic (*Allium sativum* L.). Embryogenic callus was obtained from the basal plate on AZ medium supplemented with 1 to 10  $\mu$ M 2,4-D, 10  $\mu$ M *p*-CPA and 1  $\mu$ M kinetin. The transformation was promoted more so by 2,4-D than by *p*-CPA as the supplementary auxin. Embryogenic callus was induced from a garlic receptacle on BDS medium supplemented with 1 to 10  $\mu$ M NAA. BA was found to be inhibitory to induction of embryogenic callus. Somatic embryogenesis by calli obtained on the above media was confirmed by histological examinations. Large number of pro- and globular-stage embryos, some having irregular shapes, were observed. Some regenerated plants obtained from embryogenic calli on a medium supplemented with 1  $\mu$ M NAA and 5 to 10  $\mu$ M BA were successfully transferred to soil and grown to maturity.

### 緒 言

ニンニク (*Allium sativum* L.) は重要なネギ属野菜の一つとして広く利用され、その需要は近年急速に伸びている。しかし、ニンニクの繁殖は地下部に形成される小りん茎(側球)と花茎頂部に着生する珠芽によって行われるため、増殖率は極めて低く生産コストが高い点が栽培上の問題となっている。それ故、組織培養を利用した効率的な大量増殖技術の開発が期待されている。In vitro 培養によるニンニクの増殖手法としてはこれまで茎頂培養(5, 6, 13, 19, 23, 24)、カルス培養(10, 17, 18, 21, 22)および苗条原基法(4, 14)などが報告されてい

る。

Steward・Reinert(3)がニンジン(3)の体細胞胚を観察して以来、不定胚に関する研究は活発となり、多くの植物種でその誘導に成功した。しかし、*Allium* 属植物の不定胚に関する報告は極めて少ない。ニンニクについては Abo EI-Nil が 1977 年に初めてその誘導を認めた(2)。すなわち、ニンニクの生長点およびりん片内の若い普通葉由来のカルス表面から不定胚を誘導し、不定胚からの植物体の再生に成功した。その後、小田ら(18)は培養カルスにおいてニンニクの体細胞胚と思われる構造を認めたが、それらからの個体再分化はラッパ状の芽など奇形になるものが多く、完全な植物体に至ったものは少なかったと報告した。

以上のように、ニンニクにおいて不定胚形成の可能性が明らかになったものの、embryogenic callus の誘導や不定胚からの個体再生にはまだ多くの問題点が残っ

1991年2月28日 受理。本報告の一部は、昭和63年度園芸学会秋季大会および平成元年度園芸学会春季大会で発表した。本研究は文部省科学研究費補助金(課題番号61440010)によって行われた。

\*現在：新潟大学農学部附属農場。

ている。本研究では不定胚経由の植物体再分化の条件を確立することを目的として供試部位、植物生長調節物質の検討および培養組織内における胚発生の組織学的観察を行った。

## 材料および方法

### 1. Embryogenic callus と不定胚の誘導

北海道大学農学部附属農場の蔬菜園で栽培したニンニク品種‘ホワイト’、‘壱州早生’および‘北海道在来’のうち富良野市より分譲を受けた系統(以下‘FB’系と略記)を材料とし、次の四つの小実験を行った。

**実験1. 珠芽の底盤を用いた場合の外植体の大きさおよびカイネチンと2,4-Dの影響**：1987年収穫後約1か月間室内で乾燥した品種‘ホワイト’の珠芽を供試した。珠芽の表皮を除き、70%エチルアルコールに15秒間浸漬した後、次亜塩素酸ナトリウム溶液(有効塩素1%, Tween 20を2滴添加)中で15分間表面殺菌を行い、直ちに滅菌水で2~3度洗浄した。次にクリーンベンチで茎頂を含んだ底盤を2~3mmまたは5~6mm角の大きさに調製して外植体とした。

培養基はAZ培地(1)を基本とし、これに*p*-CPA (*para*-chlorophenoxyacetic acid) 10  $\mu$ M, ショ糖 20 g/liter およびジェランガム 2 g/liter を共通に添加し、カイネチン 0, 1  $\mu$ M と 2,4-D 0, 1, 10, 100  $\mu$ M とを組み合わせて8種類の培地を作成した。これらの培地はいずれもpH 5.8に調整し、試験管(口径20mm, 長さ13cm)に15mlずつ分注した。置床後の培養条件は25°C, 4,000 lx, 16時間日長とした。調査は培養4か月後に茎頂部と底盤の形態形成、特に粒状カルスの形成について行った。

**実験2. 側球の底盤を用いた場合のカイネチンと2,4-Dの影響**：収穫後約6か月間5°Cで貯蔵した品種‘ホワイト’の側球を用い、底盤を約3mm角に取り出して培養した。培養基はカイネチン 0, 0.1, 1  $\mu$ M と 2,4-D 0, 0.1, 1, 10  $\mu$ M とを組み合わせた12種類を設けた。他の培養条件は実験1と同様にした。

**実験3. 花床部を用いた場合のBAとNAAの影響**：1988年6月18日に品種‘壱州早生’の葉鞘内の花茎頂部を取り出し、総苞内の珠芽を基部から取り除き、厚さ約2mmの花床部を4等分に分割して培地に置床した。培養基はBDS培地(7)を基本とし、NAA 0, 1, 10  $\mu$ M と BA 0, 1, 10, 40  $\mu$ M とを組み合わせて添加し、ショ糖濃度は0.1Mとした。他の培養条件は実験1と同様にした。

**実験4. 側球の底盤を用いた場合の*p*-CPAと2,4-Dの影響**：収穫後約1か月間室内で貯蔵した品種‘ホワイト’の側球を用い、底盤を約3mm角に取り出して培養した。培養基は2,4-D, 0, 1, 10, 100  $\mu$ M と *p*-CPA 0, 1, 10, 100  $\mu$ M とを組み合わせた16種類を設けた。他の培養条件は実験1と同様にした。

### 2. Embryogenic callus の組織学的観察と不定胚の発育

実験1において珠芽の底盤の培養で得られた embryogenic callus を用い、組織学的観察を行った。すなわち、培養4か月後に生育の旺盛なカルスをFAAで固定し、エタノール・ブタノールにより脱水した後パラフィン切片を作成し、ヘマトキシリンで染色してカルス内および表層における不定胚の発生を観察した。

### 3. Embryogenic callus からの個体再生および馴化

実験3において花床部から誘導された embryogenic callus を培養65日目に植物生長調節物質無添加のBDS培地に移植して2か月間培養した。増殖させたカルスをさらにNAA 0~5  $\mu$ M と BA 0~15  $\mu$ M を添加したMS培地に移植して植物体再生を試みた。また‘FB’の側球の底盤を実験2より得られた条件で3か月間培養して形成された embryogenic callus を用い、NAA 0~10  $\mu$ M と BA 0~50  $\mu$ M とを組み合わせて添加した培地に移植して個体再生を観察した。培養環境は実験1と同様とした。Embryogenic callus から再生された幼植物体は、一晚流水で根部に付着したジェランガム培地を流しとり、オートクレーブで滅菌した土とパーミキュライト(5:1)の培養土に鉢上げした。

## 結 果

### 1. Embryogenic callus と不定胚の誘導

**実験1. 珠芽の底盤を用いた場合の外植体の大きさおよびカイネチンと2,4-Dの影響**：珠芽の底盤からは2~3mm角の外植体において概して広い濃度範囲でカルスの形成が認められた(第1表)。形成されたカルスには塊状(non-embryogenic)と粒状(embryogenic)の2種類が観察された。特に粒状カルスは底盤より誘導されて、乳白色または透明で分裂部位をいたるところに有して盛り上がる形状であり、embryogenic callus と推察された(第1図-1)。このようなカルスは2,4-D 10  $\mu$ M 単独区、またはカイネチンが1  $\mu$ M 添加されると2,4-D 0~10  $\mu$ M 添加区で多くみられた。5~6mm角の外植体からは底盤が肥大する傾向がみられ、embryogenic callus は2,4-D 1  $\mu$ M およ

**Table 1.** Effects of the explant size, kinetin and 2,4-D on embryogenic callus induction and shoot formation from the basal plate with shoot apex of garlic aerial bulblet (cv. Howaito).

Size of explant	Kinetin ( $\mu\text{M}$ )	2,4-D ( $\mu\text{M}$ )	No. of explants	No. of calli induced		No. of shoots developed from shoot apices		
				non-embryogenic	embryogenic			
Small (2~3 mm)	0	0	5	0	2	5		
		1	8	6	1	6		
		10	10	1	6	6		
		100	9	0	0	0		
	1	0	9	0	4	5		
		1	9	1	4	6		
		10	9	0	5	2		
		100	9	0	0	0		
		Large (5~6 mm)	0	0	6	0	0	6
				1	7	0	1	3
10	8			0	1	2		
100	9			0	0	0		
1	0		8	0	2	2		
	1		6	3	2	5		
		10	7	0	4	2		
		100	8	0	0	1		

び  $10 \mu\text{M}$  単独区とカイネチン  $1 \mu\text{M}$ , 2, 4-D  $0 \sim 10 \mu\text{M}$  添加区で観察されたが,  $2 \sim 3 \text{ mm}$  角の外植体の場合と比べ発生頻度は少なかった。茎頂からのシュート形成は 2, 4-D が  $0 \sim 10 \mu\text{M}$  添加された培地で認められた。

**実験 2. 側球の底盤を用いた場合のカイネチンと 2, 4-D の影響:** 側球の底盤からも塊状と粒状の 2 種類のカルスが形成された。カイネチンの濃度にかかわらず, 2, 4-D  $1 \sim 10 \mu\text{M}$  添加区において粒状の embryogenic callus が誘導され, 特に 2, 4-D  $10 \mu\text{M}$  添加区で多く認められた (第 2 表)。2, 4-D を 0,  $0.1 \mu\text{M}$  添加した区ではいずれもカルス形成が認められなかった。

**実験 3. 花床部を用いた場合の BA と NAA の影響:** 花床部からのカルス形成についても底盤の培養と同様に塊状と粒状の 2 種類のカルス形成が認められた (第 3 表)。塊状カルスは花床部から直接形成され, 緑色または緑白色で密な状態であった。粒状カルスは塊状カルスの表面から形成されるものがほとんどであったが, 一部は花床部から直接形成されるものもみられ, 乳白色または透明で盛り上がる形状であった。形成された粒状カルスの形状は底盤から誘導されたカルスと同様であり, embryogenic callus と思われた。Embryogenic callus は NAA が添加された培地でのみ形

**Table 2.** Effects of kinetin and 2,4-D on embryogenic callus induction from the basal plate with shoot apex of garlic bulb (cv. Howaito).

Kinetin ( $\mu\text{M}$ )	2,4-D ( $\mu\text{M}$ )	No. of explants	No. of calli induced	
			non-embryogenic	embryogenic
0	0	8	0	0
	0.1	8	0	0
	1	8	2	2
	10	7	1	5
0.1	0	8	0	0
	0.1	8	0	0
	1	8	0	3
	10	6	0	2
1	0	8	0	0
	0.1	8	0	0
	1	8	2	3
	10	8	0	5

成され, とりわけ  $1 \mu\text{M}$  および  $10 \mu\text{M}$  単独区において形成率が高かった。BA 単独添加区では塊状カルスのみが形成され, NAA  $1 \mu\text{M}$  や  $10 \mu\text{M}$  が同時に添加された場合でも embryogenic callus の形成率は NAA 単独区より低下した。

**Table 3.** Effects of NAA and BA on embryogenic callus induction from the garlic receptacle (cv. Ishu-wase)<sup>z</sup>.

NAA ( $\mu$ M)	BA ( $\mu$ M)	No. of explants	No. of calli induced	
			non- embryogenic	embryo- genic
0	1	8	8	0
	40	4	4	0
1	0	8	5	3
	1	4	4	0
	10	4	3	1
	40	8	7	1
10	0	8	4	4
	1	12	10	2
	10	8	8	0

<sup>z</sup> BDS supplemented with 1.25  $\mu$ M 2,4-D was used for basal medium. Morphogenic response was observed after 2 months of incubation.

**実験4. 側球の底盤を用いた場合の *p*-CPA と 2,4-D の影響** : Embryogenic callus の形成には, 2,4-D の方が大きな効果を示し, 1  $\mu$ M および 10  $\mu$ M 添加された培地で直径が約 3~9 mm のカルス形成が認められた(第4表). 2,4-D 1  $\mu$ M と *p*-CPA が 1~10  $\mu$ M 添加されると embryogenic callus 形成率は上昇したが, 2,4-D が 10  $\mu$ M の場合は *p*-CPA の添加はカルス形成に大きな影響を与えなかった.

## 2. Embryogenic callus の組織学的観察と不定胚の発育

珠芽と側球の底盤および花床部より誘導された embryogenic callus の増殖は旺盛で, 表面全体から小さな突起が多く観察された(第1図-1). また組織学的観察によりカルスの表層や内部から不定胚の発生が認められ, 初期分裂(第1図-2), 球状胚(第1図-3, 4)および根の分化(第1図-5)が認められた. 不定胚を構成する細胞はカルスの細胞より小さく, 細胞質が緻密で明らかに区別され, 胚組織はカルス組織とは独立して発育した.

Embryogenic callus を植物生長調節物質無添加の MS 培地で培養を続けると不定胚が発育し, 葉部と根部を備えた苗条が多数認められた(第1図-6). しかし両者がバランスよく発育している個体は少なく, 葉が数枚重なって発生したり, 根部の発育に対して茎葉部の発育不良なもの等が観察された.

**Table 4.** Effects of 2,4-D and *p*-CPA on the induction of embryogenic callus from the garlic basal plate (cv. Howaito)<sup>z</sup>.

2,4-D ( $\mu$ M)	<i>p</i> -CPA ( $\mu$ M)	No. of explants	Embryogenic calli	
			No. of formed	Size (mm)
0	0	12	0	—
	1	11	0	—
	10	8	1	2.5
1	100	16	1	5.0
	0	12	5	9.0 $\pm$ 1.70 <sup>y</sup>
	1	4	4	6.3 $\pm$ 0.72
	10	12	9	6.1 $\pm$ 0.94
10	100	12	6	3.8 $\pm$ 0.56
	0	16	12	8.5 $\pm$ 1.00
	1	12	6	7.9 $\pm$ 0.77
	10	12	8	6.3 $\pm$ 1.16
100	100	16	4	3.1 $\pm$ 0.63
	0	16	0	—
	1	16	9	—
	10	16	0	—
100	100	16	0	—
	100	16	0	—

<sup>z</sup> AZ supplemented with 1  $\mu$ M kinetin was used for basal medium. Morphogenic response was observed after 80 days of incubation.

<sup>y</sup> Mean  $\pm$  SE (Standard error).

## 3. Embryogenic callus からの個体再生および馴化

花床部由来の embryogenic callus を NAA と BA の添加された培地に移植することによりシュートおよび根の形成が認められ, 特に NAA 1  $\mu$ M または 5  $\mu$ M と BA 5  $\mu$ M とが添加された区では植物体形成率が高く, それぞれ 75% (9/12) と 50% (6/12) であった(第5表, 第2図-1). 一方, NAA と BA の無添加区では細長い葉状組織が伸長したり, 水浸状の根が多数形成されるなど, 異常な形態形成が多く認められた(第2図-2, 3).

側球の底盤由来の embryogenic callus からは NAA または BA を単独添加した場合 0~30% (3/10) と個体再生率は低かったが, NAA 1~10  $\mu$ M と BA 1~50  $\mu$ M を組み合わせると高い再生率が得られた(第6表). 特に NAA 1  $\mu$ M, BA 10  $\mu$ M を添加した区では再生率が最も高く, 移植したカルスの約3倍に相当する 42 個体の幼植物が再生した. 発根数は NAA 無添加区では少なかったが, NAA を添加すると多くなり, 根の形態も正常で, 特に NAA 1  $\mu$ M, BA 10  $\mu$ M 添加区

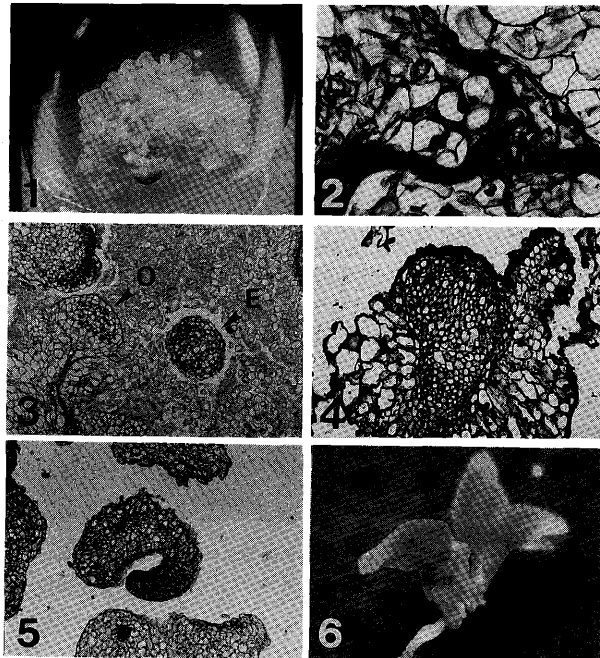


Fig. 1. Somatic embryogenesis in embryogenic callus. 1: External appearance of embryogenic callus. 2: First cell division. 3: Multicellular globular (E). Organogenesis was also observed (O). 4: Early globular embryo protruding from callus. 5: Development of root in an isolated somatic embryo. 6: Plantlet derived from an embryogenic callus.

Table 5. Effects of NAA and BA on the plant regeneration from embryogenic callus induced from the garlic receptacle (cv. Ishu-wase)<sup>2</sup>.

NAA ( $\mu\text{M}$ )	BA ( $\mu\text{M}$ )	No. of calli transferred	No. of regenerated calli			No. of plantlets obtained
			Shoot	Leaf	Root	
0	0	8	0	5	4	0
	5	12	1	7	4	1
	15	12	1	7	3	2
1	0	12	1	9	8	1
	5	12	9	9	9	24
	15	12	0	7	7	0
5	0	12	1	10	10	1
	5	12	6	9	6	10
	15	8	2	5	3	7

<sup>2</sup> MS was used for basal medium.

と NAA 10  $\mu\text{M}$  単独添加区では根の形成が最も旺盛であった。また NAA 10  $\mu\text{M}$  を添加した場合は、BA の濃度が高くなるに従い発根数が減少する傾向が認められた。得られた幼植物体を馴化・移植したところ、それらはほとんど活着し、旺盛な生育を示した(第2図-4)。

## 考 察

本研究において筆者らは、ニンニクの embryogenic callus を誘導し、その内部に不定胚の形成を確認した。Nagasawa ら(15)はニンニクにおいて morphogenic callus を誘導したが、そのための材料として幼苗の底盤

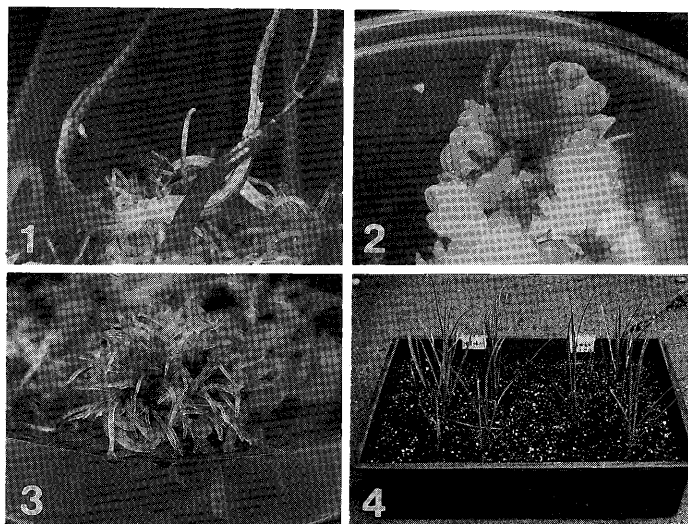


Fig. 2. Plant regeneration from embryogenic callus. 1: Plant regeneration. 2 and 3: Differentiation of irregular leaves (2) and roots (3). 4: Regenerated plants growing in soil.

Table 6. Effects of NAA and BA on the plant regeneration from embryogenic callus induced from the garlic basal plate with shoot apex of bulb (Hokkaido-Zairai FB)<sup>z</sup>.

NAA ( $\mu$ M)	BA ( $\mu$ M)	No. of calli transferred	No. of regenerated calli			No. of plantlets obtained
			Shoot	Leaf	Root	
0	0	12	1	2	2	0
	1	12	3	4	2	2
	10	12	3	6	2	4
	50	10	3	1	0	0
1	0	11	0	11	11	0
	1	13	6	9	12	19
	10	13	10	13	13	42
	50	12	6	9	10	16
10	0	16	0	16	16	0
	1	11	2	10	9	3
	10	10	4	7	2	5
	50	10	6	6	3	9

<sup>z</sup> MS was used for basal medium.

が効果的であったことを報告している。この morphogenic callus は筆者らが観察した embryogenic callus に似ており、誘導培地において黄色を呈し、密で、表面が滑かなこぶの多い状態で増殖したとしている。

現在までに不定胚の定義として次の3点が指摘されている。すなわち、第1に発育の様態が接合子胚の発育と類似していること、第2に双極性の構造を有する

こと、第3に一つの細胞由来であり、起源となった組織とは維管束の連絡を持たないことである(20)。本実験で誘導された embryogenic callus の組織切片により、カルスの内部には周りのカルス組織とは独立して発育する分裂組織が観察され、これらの一部は双極性の構造をとっていた。カルスは誘導培地において再分化することなく旺盛に増殖し、そのカルスをさらに再生培

地に移すとシュートと根を同時に形成するという制御しやすい特性が認められた。これらの観察より誘導された embryogenic callus 内には不定胚形成が起こっていることが考えられた。ニンニクにおける接合子胚の発育に関しては、Etoh (8) が稔性系統の存在を報告しているが、その発育過程については十分に検討されていない。そのため接合子胚の正常な発育過程と不定胚の発育についての詳細な比較を検討することはできなかったが、Abo El-Nil (2) が観察した不定胚形成過程と本実験の観察は極めて類似する点からも、不定胚形成が推察される。

ニンニク底盤の培養におけるオーキシンとしての 2, 4-D と *p*-CPA の作用性については、他の植物 (3, 9) と同様に embryogenic callus 形成には 2, 4-D が重要な役割を果たしており、*p*-CPA はそれを補強する効果のあることが明らかとなった。

珠芽と側球と底盤からの embryogenic callus の誘導には 2, 4-D とカイネチンの至適濃度に差がみられなかったことから、両者には外与された植物生長調節物質に対する反応に差がないと考えられる。一方、花床部の場合、BA 単用では塊状カルスのみが形成され、NAA が同時に添加された場合でも embryogenic callus の形成率は低かった。このことは、花床部からの embryogenic callus の形成には BA が阻害的に働くことを示唆しており、ニンジンおよびナスでも報告されている現象 (9) と同様であった。

Embryogenic callus からの植物体再生について、一般に多くの植物はオーキシンを含む培地で不定胚が誘導され、その後の胚発育には植物生長調節物質を含まない培地に移植することが必要であると報告されている (3, 9, 11, 12)。また数種植物では不定胚の発育にサイトカイニンの効果が認められている (16)。本研究での花床部由来の embryogenic callus からの個体再生には NAA 1  $\mu$ M と BA 5  $\mu$ M 添加培地が適し、底盤由来の embryogenic callus からの個体再生についても NAA 1  $\mu$ M と BA 10  $\mu$ M 添加培地が良好であったことより、ニンニクの embryogenic callus からの個体再生にはオーキシンとサイトカイニンが不可欠であり、1  $\mu$ M 程度の NAA と 5~10  $\mu$ M の BA の添加が適当であると思われる。また、再生した個体はシュートと根が同時に形成されたことよりカルス内の不定胚由来と考えられた。

現在までに、多くの不定胚が形成されたが、それらが奇形化せずに個体再生する割合を高める培養条件について今後さらに検討が必要である。

## 摘 要

ニンニク (*Allium sativum* L.) において珠芽と側球の底盤および花床部から embryogenic callus が誘導され、不定胚の発生が観察された。また、embryogenic callus からは植物体再生の検討を行った結果、高い再生率が得られた。

珠芽および側球の底盤からの embryogenic callus の誘導にはいずれも AZ 培地を基本とし、*p*-CPA 10  $\mu$ M、カイネチン 1  $\mu$ M および 2, 4-D 10  $\mu$ M を添加した培地が適していた。側球の底盤からの embryogenic callus 形成には 2, 4-D が *p*-CPA に比べて影響が大きいが、2, 4-D とともに *p*-CPA を添加することにより形成数や大きさを増大させた。花床部の培養は BDS 培地を用い、NAA と BA の影響を検討したが、embryogenic callus 形成には BA が阻害的に働き、NAA 1~10  $\mu$ M 単独添加が良好であった。

組織学的観察により embryogenic callus 内における不定胚の発生が確認された。また、植物生長調節物質無添加の MS 培地において不定胚が発育したが、不正常的な発育を示すものも認められた。

Embryogenic callus からの植物体再生には植物生長調節物質の効果が認められ、NAA 1  $\mu$ M と BA 5~10  $\mu$ M の組み合わせが優れており、75%以上のカルスがシュートを形成した。

## 引用文献

1. Abo El-Nil, M.M. and F.W. Zettler. 1976. Callus initiation and organ differentiation from shoot tip cultures of *Colocasia esculenta*. Plant Sci. Lett. 6: 401-408.
2. Abo El-Nil, M.M. 1977. Organogenesis and embryogenesis in callus cultures of garlic (*Allium sativum* L.). Plant Sci. Lett. 9: 259-264.
3. Ammirato, P.V. 1983. Embryogenesis. p. 82. In: W. R. Sharp, D. A. Evans, P. V. Ammirato and Y. Yamada (eds). Handbook of plant cell culture. Vol. 1. Macmillan Publishing Company, New York.
4. 綾部昌則・佐藤禎浩・岩田 光・谷口研至・田中隆荘. 1987. ニンニクの苗条原基法. 育学雑. 37(別1): 132-133.
5. Bojwani, S.S. 1980. In vitro propagation of garlic by shoot proliferation. Scientia Hort. 13: 47-52.
6. Bojwani, S.S., D.Cohen and P.R.Fry. 1982. Production of virus-free garlic and field performance of micropropagated plants. Scientia Hort. 18: 39-43.



7. Dunstan, D.I. and K.C. Short. 1977. Improved growth of tissue cultures of Onion, *Allium cepa*. *Physiol. Plant.* 41: 70-72.
8. Etoh, T. 1986. Fertility of the garlic clones collected in Soviet Central Asia. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 55: 312-319.
9. 鎌田 博. 1980. 高等植物における不定胚形成の制御. *植物の化学調節* 15: 62-78.
10. Kehr, A.E. and G.W. Schaeffer. 1976. Tissue culture and differentiation of garlic. *HortScience* 11: 422-423.
11. 清沢茂次・野村和成・高木千明・折館寿朗・下中雅仁. 1988. 植物の不定胚経路再分化の生理. p. 454-461. *Bio Industry*. シーエムシー(CMC). 東京.
12. 甲村浩之・長久 逸・池田好伸. 1988. アスパラガスの体細胞不定胚利用による大量増殖. (第2報). 不定胚形成における培養条件の検討と形態観察. *園学要旨*, 昭63春: 232-233.
13. 栗山尚志・大澤勝次・湯浅三男・森 憲昭. 1976. ニンニクの組織培養における培養部位および培地とカルス形成・茎葉分化に関する試験. *野菜試育種年報*(昭50). 3: 8-12.
14. 森 憲昭. 1988. ニンニクの大量増殖法. *農および園*. 63: 169-174.
15. Nagasawa, A. and J.J. Finer. 1988. Induction of morphogenic callus culture from leaf tissue of garlic. *HortScience* 23: 1068-1070.
16. 西村繁夫・斉藤猛雄・山口真美子. 1990. 不定胚形成の現状と誘導技術. p.9-15. *バイオホルティ* 5. 誠文堂新光社. 東京.
17. Novak, F.J. 1980. Phenotype and cytological status of plants regenerated from callus culture of *Allium sativum* L. *Z. Pflanzenzüchtg.* 84: 250-260.
18. 小田義信・西村繁夫. 1988. ニンニクカルスからの個体再分化. *育種*. 38(別2): 76-77.
19. 大澤勝次・栗山尚志・菅原裕幸. 1981. 組織培養による栄養繁殖性野菜の大量増殖と利用に関する研究: I 植物体の大量誘導に及ぼす培養部位及び培地組成の影響. *野菜試報*(昭56). A9: 1-46.
20. Reinert, J., Y.P.S. Bajaj and B. Zbell. 1977. Aspects of organization-organogenesis, embryogenesis, cytodifferentiation, p.389-427. In: H.E. Street(eds.). *Plant tissue and cell culture*. University of California Press, Berkley.
21. 菅原祐幸・大澤勝次・栗山尚志. 1977. ニンニク組織培養に及ぼす供試材料の休眠の影響に関する研究. *野菜試育種年報*(昭51). 4: 21-26.
22. 菅原祐幸・大澤勝次・我孫子和雄. 1979. 組織培養によるウイルスフリー株育成に関する研究. *野菜試育種年報*(昭53). 6: 29-45.
23. Walkey, D.G.A., M.J.W. Webb, C.J. Boll and A. Miller. 1978. Production of virus-free garlic (*Allium sativum* L.) and shallot (*A. ascalonicum* L.) by meristem-tip culture. *J. Hort. Sci.* 62: 211-220.
24. 趙 順慶・李 鵬飛・範 懷忠・郭 碧霞. 1987. 花葉病毒大蒜的茎端組織脱毒培養. *華南農業大學學報* 8(4): 1-8.