

西条ガキの生長点培養及び生長点由来カルスの選抜について

誌名	広島農業短期大学研究報告 = Bulletin of the Hiroshima Agricultural College
ISSN	04408772
著者	新美, 善行 山本, 信寿
巻/号	8巻2号
掲載ページ	p. 341-345
発行年月	1987年12月

西条ガキの生長点培養及び生長点由来 カルスの選抜について

新美善行・山本信寿*

In Vitro Culture of Apical Meristem and the Selection of Callus Derived
from Apical Meristem of 'Saijo' Japanese Persimmon

Yoshiyuki NIMI and Nobuhisa YAMAMOTO

緒 言

果樹の繁殖は遺伝的な理由により、良系の母樹からさし穂を取り、さし木を行ったり、実生台に穂木を接ぐ、接木による栄養繁殖が主として行われている。接木に使用する台木はほとんど実生苗にたよっているが、一度に大量の台木を生産できず、また遺伝的な形質にばらつきがでることもあり、時として台木としての条件がそろわなくなる場合もある。しかし、果樹の種類によってはカキのようにさし木繁殖が困難な樹種もあり、これらの樹種の台木繁殖はもっぱら実生苗にたよっている。

一方、他の園芸植物同様果樹においてもウイルス病の害が問題になっており、ウイルス病のベクターが存在しない樹種ではウイルスフリー株の養成が望まれ、一部の樹種では作成されている。生長点培養によるウイルスフリー株の育成および植物体の増殖についてはリンゴ、ブドウなどで行われている (Abbott and Whiteley, 1976; 秋浜, 1985; Barlass and Skene, 1978; 石原, 1983; 黒井・澤田, 1985)。生長点培養、カルス培養を用い、ウイルスフリー化および大量増殖ができれば、実生苗による台木の欠点を補うことができると共に、台木に限らず穂木についても同様の事が考えられる。しかし、カキについては研究例が少なく (福井ら, 1986; 村山ら, 1986; 高山, 1986)、生長点培養、カルス経由の大量増殖、育苗の技術は確立されていない。そこで西条ガキの生長点培養、生長点由来カルスの誘導・選抜・増殖について種々のホルモン濃度、培地条件について検討した。

材料及び方法

植物材料は広島農業短期大学付属農場果樹園栽植の西条ガキの冬芽及び春芽を用いた。6~8 mm に萌芽した芽を選び、2%の次亜塩素酸ナトリウム水溶液 (アンチホルミン) で10分間浸漬処理を行い、その後滅菌水で3回洗浄した。次に無菌室内でオリンパス三眼鏡筒式実体顕微鏡 X-Tr を用い、滅菌濾紙の上でメスと注射針を使用し、0.3 mm 程度の生長点を切り出し、種々の寒天培地に植付けた。

実験 1. 生長点培養について

Murashige & Skoog (MS) 培地を用い、オーキシンは Naphthaleneacetic acid (NAA), サイトカイニンは Benzyladenine (BA) を組み合わせ、30 ml 用管ビンに 10 ml の培地を分注し、25の区画を設定した。ホルモンの濃度は NAA, BA 共に 0, 10^{-2} , 10^{-1} , 1, 5 mg/l とした。

4月19日から21日にかけて採取した西条ガキの生長点を殺菌した後、種々の寒天培地に植付けた。寒天培地は 3000~5000 lx の明条件下に置き、30日、100日後に観察を行い、ホルモン濃度とカルス、シュートの生長との関係について調べた。

一方、休眠芽を 3°C の冷蔵庫に貯蔵し、シュートの増殖を調べるために使用した。サイトカイニンとして BA, 2iP (N^6 -(Δ^2 -Isopentenyl) adenine) を用い、各々 0, 10^{-1} , 1, 2, 5, 10 mg/l の濃度区を設定し、30日ごとに継代培養を行った。基本培地は MS で NO_3 の濃度を 1/2 にしたものを使用した (1/2 MS)。

実験 2. カルス誘導について

腋芽を使用し、実験 1 と同様に生長点を切り出した。

* 青年海外協力隊員 (ネパール駐在)

生長点はカルス化しやすいように葉原基1枚を持つように切り出した。MS 基本培地に NAA 2×10^{-2} mg/l, BA 2×10 mg/l を加えた条件でカルス誘導を行った。

実験 3. カルスの選抜について

生長点由来の黒色カルスから緑色カルスの選抜を行った。誘導カルスを 3mm 角に切り出し、光条件およびホルモン条件の違いによって白色および緑色カルスを得た。

実験 4. カルスの増殖について

オーキシンおよび培地の種類の違いがカルスの増殖に与える影響について比較した。オーキシンは NAA と 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) の 2 種、培地は MS 培地と Gamborg B5 培地を用いた。サイトカイニンは BA を用いた。オーキシン濃度は 0, 2×10^{-1} , 1 mg/l とし、サイトカイニン濃度は 0, 2×10^{-2} , 2×10^{-1} , 2 mg/l を用いた。30日後にカルスの重量およびカルスの色などの特徴を調べた。

一方、NAA と BA の組合せによるカルスの増殖の検定も行った。MS 培地を用い、ホルモン濃度は NAA, BA 共に 0, 10^{-2} , 10^{-1} , 1, 2, 5 mg/l とし、30日後にカルスの重量を測定した。

結 果

実験 1. 生長点培養について

植付け30日、100日後の状態は第1表に示した。植付け30日後にカルス化が見られたのは NAA 濃度が 1 mg/l 以上の場合に多く、BA 濃度とは余り関係がなかった。一方、シュートの状態が見られたのは NAA を含まず、かつ BA 濃度が 10^{-1} mg/l 以上の場合であった。シュートとカルスの共存は NAA 濃度が 10^{-2} mg/l から 10^{-1} mg/l でかつ BA 濃度が 10^{-2} mg/l から 5 mg/l の場合に見られた。また、ホルモンフリー、NAA・BA 濃度が低濃度の場合には枯死するものが多かった。100日後の状態は30日後の結果とは多少異なり、シュートの枯死が目立った。シュートの状態で生存していたのは NAA 10^{-2} mg/l, BA 10^{-1} mg/l の区と NAA 10^{-2} mg/l, BA 1 mg/l の区だけであり、他の区では枯死した(第1表、第1図)。一方、カルスは NAA, BA 濃度の組合せによって発育が異なり、かつカルスの色も黒色、白色、淡緑色など種々のカルスが得られた(第2図、第1表)。

シュートの増殖は BA, 2iP 共に 5 mg/l の濃度で良好であったが、2iP に比べ BA の方の増殖が優れていた(第2表)。また、BA に比較し、2iP の方がカルス化しやすかった。

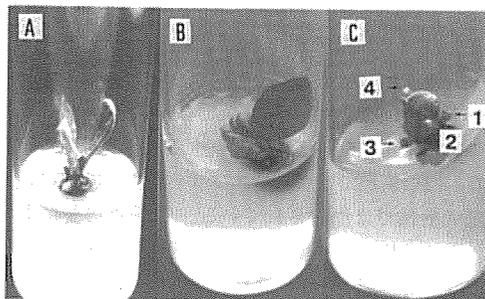
第1表 西条ガキの生長点培養に及ぼすホルモン濃度の影響

[A] 30日後		BA (mg/l)				
		0	10^{-2}	10^{-1}	1	5
NAA (mg/l)	0	×	×	S	S	S
	10^{-2}	×	S+C	S+C	S+C	S
	10^{-1}	C	C	S+C	S+C	S
	1	C	C	C	C	C
	5	S+C	C	C	C	S+C

C-カルス, S-シュート, S+C-シュートとカルス混在, ×-枯死

[B] 100日後		BA (mg/l)				
		0	10^{-2}	10^{-1}	1	5
NAA (mg/l)	0	×	×	×	×	S/C
	10^{-2}	×	×	S	S	×
	10^{-1}	×	×	×	×	S/C
	1	BC	GC	BC	GC	BC+WC
	5	GC	WC	WC+GC	GC+BC	GC+BC

GC-緑色カルス, BC-黒色カルス, WC-白色カルス, S/C-シュートの下にカルス形成, ×-枯死



第1図 西条ガキの生長点培養
A:シュートの発育状態
B:葉の展開
C:腋芽の発達(4本)

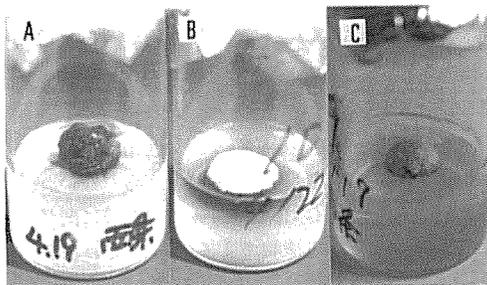
た(第2表)。また、BA に比較し、2iP の方がカルス化しやすかった。

実験 2. カルス誘導について

葉原基1枚を持つ生長点を切り出し、BA 2×10^{-1} mg/l, NAA 2×10^{-2} mg/l を含む MS 培地でカルス誘導を行った。誘導カルスは黒色カルスが得られた。このカルスを継代培養し、実験 3, 4 のカルス材料とした。

実験 3. カルスの選抜について

黒色カルスを 5 mm 角に切り取り, BA 2×10^{-1} mg/l, NAA 2×10^{-2} mg/l を含んだ MS 培地に植付け,



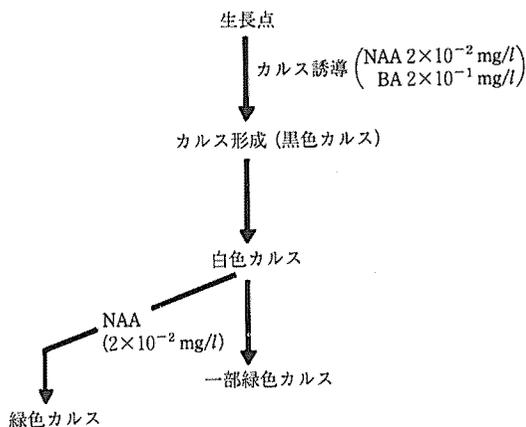
第 2 図 西条ガキの生長点培養 (カルス形成)
 A : 黒色カルス
 B : 白色カルス
 C : 緑色カルス

第 2 表 サイトカイニンの種類と濃度がシュート形成に与える影響

サイトカイニン	濃度 (mg/l)	シュート数 (本)
BA	0	0
	0.1	0
	1	0.3
	2	0.5
	5	3.2
	10	2.5
2iP	0	0
	0.1	0
	1	0.2
	2	0.3
	5	1.5
	10	1.2

10個の平均

暗黒条件 (25°C) のもとで30日間培養し, 白色カルスを得た。白色カルスから一部緑色カルスが出現したが, NAA 2×10^{-2} mg/l を含む MS 培地に移植し, 明条件 (3000~5000 lx) のもとで培養を行い, 緑色カルスを得た (第 3 図)。



第 3 図 黒色カルスから緑色カルスの選抜

第 3 表 オーキシンの種類と濃度がカルスの増殖に与える影響

	[Gamborg B5 培地]	BA (mg/l)			
		0	2×10^{-2}	2×10^{-1}	2
NAA (mg/l)	0	30(B)	40(W)	55(G)	30(B)
	2×10^{-1}	170(W)	415(B)	290(B)	185(B)
2,4-D (mg/l)	0	27(B)	33(B)	13(B)	25(B)
	2×10^{-1}	63(B)	81(B)	33(B)	37(B)
	1	27(B)	30(B)	39(B)	20(B)

W-白色カルス, G-緑色カルス, B-黒色カルス
 カルス重量 mg

第 4 表 ホルモン濃度がカルスの増殖に与える影響

[MS 培地]		BA (mg/l)					
		0	10^{-2}	10^{-1}	1	2	5
NAA (mg/l)	0	70	50	73	110	40	120(G)
	10^{-2}	53	70	87	270	27	63
	10^{-1}	123(G)	73	87	103	80	63
	1	—	103	203	377(W)	293	87(W)
	2	27(W)	87	210	227	190(W)	270(G+B)
	5	—	127	170	293(W+B)	197(B)	30(B)

G-緑色カルス, W-白色カルス, B-黒色カルス
 カルス重量 mg

実験4. カルスの増殖について

Gamborg B5 培地を用い、カルスの増殖に与えるオーキシンの種類の検討を行った。カルスの増殖は NAA 濃度が 2×10^{-1} mg/l 以上 1 mg/l、かつ BA 濃度が 2×10^{-2} mg/l 以上の時に増殖が良好であった。特に NAA 2×10^{-1} mg/l、BA 2×10^{-2} mg/l と NAA 1 mg/l、BA 2×10^{-2} mg/l の区で増殖が良好であった。一方、2,4-D の場合にはカルスの増殖は不良であった(第3表)。

オーキシンとして NAA を用い、MS 培地と Gamborg B5 培地でのカルスの増殖を比較すると Gamborg B5 培地でのカルス増殖が顕著であった(第3,4表)。また、MS 培地に比較し Gamborg B5 培地の方が緑色カルスが多く得られた。

考 察

カキの場合にはさし木による発根が困難であるので、さし木による栄養繁殖は行われていない。また、リンゴ・ブドウなどの果樹では生長点培養によるウイルスフリー株の養成および増殖が行われているが、カキの場合には生長点培養が困難であり、平核無(村山ら, 1986; 高山, 1986)、西村早生など(福井ら, 1986)で行われているにすぎない。

西条ガキの生長点を切り出し、培地に植付け30日、100日後の状態を調べた(第1表)。100日後までシュートの状態を保持していたのは NAA 10^{-2} mg/l、BA 10^{-1} mg/l の区と NAA 10^{-2} mg/l、BA 1 mg/l の区だけで、他の区では生長点から種々のカルスが誘導されるか、シュートの状態で枯死した。また、誘導されたカルスの老化が見られ、枯死するカルスも見られた。これらのことから早期の増殖・発根培地への移植が必要であると考えられた。

基本培地は MS で NO_3 の濃度を1/2にした 1/2 MS 培地を用い、シュートの増殖を調査した(第2表)。シュートの増殖は BA、2iP 共に 5 mg/l の濃度で良好であるが、BA の方が増殖程度が優れていた。これらの結果はすでに報告されている平核無や西村早生などの結果と類似しているが、西条ガキの場合には少なくとも30日以内に継代培養をくり返さないと生長が停滞する傾向が見られた。また、BA に比べ 2iP の場合にはカルス化する傾向も認められ、増殖の為にはサイトカニンとしては BA が適していると考えられた。

一方、生長点由来の誘導カルスは種々の色、形状を示したが、緑色カルスがイチゴなどの植物では分化能力が高いことが知られているので、カキの場合にも緑

色カルスの選抜を行った。カキの場合にはカルスが特に黒変しやすく、明条件で特に著しい。そこで、暗黒条件で白色カルスを誘導し、次に NAA 2×10^{-2} mg/l を含む培地で白色カルスを培養し、緑色カルスを得た。しかし、緑色カルスからの再分化には至っていない。

横山(1973)は胚由来のカルスから不定根形成および不定芽の形成を行っているが、新梢のカルスからは再分化は観察されていない。また、胚由来カルスからの不定根も黒色で機能的な根とは考えられない。

一方、オーキシンの種類がカルスの増殖に関与することが、イネなどの植物でよく知られているが(前田, 1983)、カキでは NAA でカルスの増殖が良好で、2,4-D で極端に不良であることが認められた(第3表)。

また、培地の種類もカルスの増殖に影響を及ぼすが、MS 培地より Gamborg B5 培地の方が増殖には適していた(第4表)。MS 培地は硝酸態の窒素成分が非常に多く、果樹類で使用する場合には1/2に希釈したり、さらにうすめて使用することが多い。また、MS 培地と Gamborg B5 培地ではホルモン条件は同一でもカルスの状態が異なっていたりするので、今後は Gamborg B5 培地を主体に生長点からの植物体育成および緑色カルスからの芽・根の再分化について検討しなければならない。

摘 要

西条ガキの生長点培養を行い、生長点由来の黒色カルスから緑色カルスの選抜、カルスの増殖について調べた。

シュートの生長が植付け100日後まで持続していたのは NAA 10^{-2} mg/l、BA 10^{-1} mg/l と NAA 10^{-2} mg/l、BA 1 mg/l の区だけであった。生長点からのカルス誘導は NAA の濃度に依存しており、BA の濃度とは余り関係がなかった。良好なカルス誘導は NAA 濃度が 1~5 mg/l の時であった。

シュートの増殖が最も良好であったのは BA あるいは 2iP 5 mg/l の時であった。しかし、シュートの増殖においては BA の方が 2iP よりも優れていた。長い期間の培養(60日)では 2iP はカルスの誘導をもたらす傾向があった。

生長点由来の黒色カルスは暗黒条件のもとでは白色カルスを増殖させた。また、 2×10^{-2} mg/l NAA を含む MS 培地で緑色カルスを得た。

カルスの増殖はオーキシンの種類および培地の種類によって大きく影響された。オーキシンとして NAA

がカルスの増殖に良好であったが、2,4-D は適していなかった。また、培地としては Gamborg B5 培地が MS 培地よりもカルスの増殖においてすぐれていた。

Gamborg B5 培地を用いた場合、カルスの増殖は 1 mg/l NAA, 1 mg/l BA の条件下で最良であった。また、1~5 mg/l NAA, 1~2 mg/l BA の条件であれば比較的カルスの増殖は良好であった。

謝 辞

本研究は「広島県における西条ガキの商品価値向上のための栽培管理および脱渋法・加工法に関する研究」の一部であり、広島県より特別研究費の助成を受けた。また、栽培管理、材料採取の面で協力を得た土肥義信主任技術員に厚くお礼申し上げる。

引用文献

1. Abbott, A. J. and E. Whiteley (1976) Culture of Malus tissue *in vitro*. I. Multiplication of apple plants from isolated shoot apices. *Scientia Hort.* 4: 183-189
2. 秋浜友也 (1985) 果樹の組織培養と応用技術. バイオテクノロジーと農業技術 養賢堂 p. 126-131
3. Barlass, M. and K. G. M. Skene (1978) *In vitro* propagation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) from fragmented shoot apices. *Vitis* 17: 335-340
4. 福井博一・杉山峰雄・中村三夫 (1986) 組織培養によるカキの育種に関する研究 (第1報) 茎頂培養による培養系の確立. 昭和61年度園芸学会秋季大会 p. 158-159
5. Gamborg, O. L., Miller, R. A. and K. Ojima (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50: 151-158
6. 石原愛也 (1983) リンゴの成長点培養 植物組織培養の技術. 朝倉書店 p. 151-153
7. 黒井伊作・俣田吉男 (1985) ブドウ '巨峰' の腋芽茎頂培養におけるナフトレン酢酸及びベンジルアデニンの好適濃度について. 園学雑 54: 1-8
8. 前田英三 (1983) カルスからの植物体再生法 (イネ) 植物組織培養の技術. 朝倉書店 p. 31-32
9. Murashige, T. and F. Skoog (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum* 15: 473-497
10. 村山秀樹・田尾龍太郎・田中辰美・杉浦 明 (1986) カキの *in vitro* 繁殖に関する研究 (第2報). 昭和61年度園芸学会秋季大会 p. 160-161
11. 横山泰三郎 (1973) カキノキのカルスにおける器官形成と植物生長調節物質の作用. 植物の化学調節 8: 97-100
12. 高山 覚 (1986) 図解バイオテクノロジー 野菜・花・果樹への実際利用. 農業図書 p. 148-150

Summary

Excised apical meristems of 'Saijo' Japanese Persimmon were cultured *in vitro*, and the selection of green callus from black callus derived from apical meristems and the proliferation of callus were also examined.

The shoot growth continued for 100 days on the media supplemented with 10^{-2} mg/l Naphthalene acetic acid (NAA) plus 10^{-1} mg/l Benzyladenine (BA) and 10^{-2} mg/l NAA plus 1 mg/l BA. The callus induction from apical meristems depended on the concentration of NAA, but not on the concentration of BA. The better media for callus induction were the supplementation with 1-5 mg/l NAA.

The best multipleshoot formation was on the media (1/2 MS) supplemented with 5 mg/l BA or Isopentenyl adenine (2iP). But BA was superior to 2iP for shoot proliferation. The 2iP tended to induce callus from apical meristem for a long time incubation (60 days).

The black callus derived from apical meristems turned into white callus in the dark. The MS medium supplemented with 2×10^{-2} mg/l NAA also resulted in inducing the green callus from black callus.

The proliferation of callus was greatly affected by the kind of auxins and the media. The effective auxin for callus proliferation was NAA, but 2,4-Dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) was not fitted for callus proliferation. The Gamborg B5 medium was also superior to MS medium for callus proliferation.

The best callus proliferation was on the medium (Gamborg B5) supplemented with 1 mg/l NAA plus 1 mg/l BA. Supplementation with 1-5 mg/l NAA and 1-2 mg/l BA also resulted in the relatively good proliferation of callus.