

ニワウメ(*Prunus japonica* Thunb.)の茎頂培養について

誌名	園藝學會雜誌
ISSN	00137626
著者	石田, 雅士 松山, 剛士 北島, 宣
巻/号	58巻1号
掲載ページ	p. 49-54
発行年月	1989年6月

ニワウメ (*Prunus japonica* THUNB.) の 茎頂培養について

石田雅士・松山剛士*・北島 宣・傍島善次
京都府立大学農学部 606 京都市左京区

In Vitro Propagation of *Prunus Japonica* THUNB., a Dwarfing Rootstock for Peach Tree

Masashi ISHIDA, Hideshi MATSUYAMA, Akira KITAJIMA
and Yoshitsugu SOBAJIMA
Faculty of Agriculture, Kyoto Prefectural University, Kyoto 606

Summary

Medium composition for successful shoot tip culture to multiply the suckers induced from a promising dwarfing rootstock (*Prunus japonica* THUNB.) on which certain peach cultivars had been grafted, was investigated with respect to cytokinin and auxin levels under continuous light at 25°C.

Shoot tip cultures of *P. japonica* were established to proliferate shoots on 1/2 or 1/3 strength modified Murashige and Skoog (MS) medium. Sub-cultures treated with BA 0.5 mg/l produced elongated shoots suitable for rooting.

Sorbitol was effective as a carbon source for shoot multiplication during culture.

Elongated shoots were incubated on media with and without auxin for 30 days. Rooting was better when shoots dipped in IBA solution (50 ppm) were then incubated on a medium without hormones. NO₃/NH₄ mole ratio based on total N in the MS medium was studied.

The best combination for shoot growth was 1/3 strength MS when both forms were present in the same ratio.

緒 言

近年、果樹においても組織培養の技術が利用され、すでにバラ科植物では、リンゴやスモモの茎頂培養による培養苗の大量繁殖が報告されている(15, 16, 17, 18, 20)。とくに、ウィルスフリー苗の作出あるいは、わい化台木の育成については、この技術の利用に関する基礎研究の段階を終え、それぞれの増殖技術が確立されつつある。モモのわい化栽培については、ここ数年来ユスラウメやニワウメの実生台木苗を用いて試作が行われており、一部には実用化の可能性も指摘されている(11, 20, 21)。台木利用によるモモのわい化に関しては、古くは Tukey (22) がユスラウメやサンドチェリーの実生を用いて検討を行い、また 1960 年代にはカナダの Fisher (4) が整

枝、せん定条件を加味しながら、ユスラウメ台木で試験を行ったが、接木親和性や結果過多による樹体生長の変異が大きいため実用化には至らなかった。他方、わが国ではモモ果実は梅雨後に成熟期を迎えるため、糖含量がしばしば不安定である。その傾向は早生及び中生品種で強い。その原因の一つとして、土壌水分の過多をあげることができる。したがって、品質向上の手段として、浅根性の台木の利用などが考えられる。

従来、わが国ではモモの台木として、共台を用いてきているが、外国ではスモモの実生台木なども利用されている。当研究室においても、わい性台木として有望なサクラ属の系統選抜に着手しており、現在有力なものとして、ユスラウメ (*P. tomentosa* THUNB.)、ニワウメ (*P. japonica* THUNB.)、サンドチェリー (*P. bessyiei* L.H. BAILEY) 及びアメリカ野生スモモ (*P. americana* MARSH.) などを取りあげて、各種の調査を行っている。これらわい性台木の生態的特性をみると、ユスラウメは

1988年2月15日 受理

本報告の一部は文部省科学研究費補助金によって行われた。

* 現在 京都府庁

耐乾性が強く (12, 20), わい化試験に最も多く利用されている。他方, ニワウメは耐水性が強く, 水はけの悪い土地や水田跡地などで栽培する場合に適していると思われる (12, 20, 23)。わい性台木としての活用をはかるにあたっては, これらの生態的特性を十分に生かし, それぞれの土地において有利な台木を選択することは, 実際栽培においても極めて重要なことである。

一般に, モモ栽培品種の苗木養成に, わい性台木を利用する場合には, 穂木品種との間に若干の不親和現象を伴うことが多いため, 樹体生長量や花芽着生などに変異が大きく現れる。それらの点を考慮すれば, わい性台木として優良と思われる系統を栄養繁殖によって増殖させ, 均一な優良台木を大量に増殖できれば, 非常に有意義であると考えられる。その手段として組織培養を利用し, 安定してわい性台木の苗が増殖できれば, 苗木供給の面からも非常に有利であろう。本報告は京都府立大学農学部附属農場で実施しているモモのわい性台木を用いたわい化試験の中から, わい化効果や着果が良好と思われる台木を選び, その台木から人為的に誘発させたひこばえの茎頂を用いて, サイトカインの適正濃度, 外植体の大きさや窒素源の形態と濃度, あるいは糖源としてのソルビトールの影響など各種培養条件の検討を行った。

材料及び方法

1. 外植体の初期生育及びシュート発生数に及ぼすサイトカインの影響

供試材料には本学附属農場で行っているニワウメ台木を用いたモモわい化栽培試験区のニワウメ台木から, わい化程度が良好と思われる台木を選び, それから誘発させたひこばえを5月初旬に採取して用いた。腋芽を付けた新梢を0.3% 次亜塩素酸ナトリウムで40分間殺菌, 滅菌水で十分に洗浄後, クリーンベンチ内で腋芽だけを切り出して基本培地に置床した。

基本培地は Murashige と Skoog (1962) の無機塩類にニコチン酸 0.5 mg/l, ピリドキシン塩酸 0.5 mg/l, チアミン塩酸 0.1 mg/l, ミオイノシトール 100 mg/l, グリシン 2 mg/l を加え, シュークローズ 3%, 寒天 0.8% とした。培地は pH 5.7~5.8 に調整したのち, 1.5 kg/cm² で15分間オートクレーブにかけ殺菌した。培養条件は温度 25°C, 照度約 3,000 lx 連続照明とした。植物ホルモンは, サイトカインとして BA (6-Benzyladenine) 及び 2iP (6- γ - γ' -dimethylallylamino purine) を用い, その濃度をそれぞれ 0, 1.0, 2.0 及び 5.0 mg/l とし, オーキシンとしては NAA (α -Naphthalene acetic acid) を用い, その濃度を 0.01 mg/l とした。置床後のニワウメ外植体の生育については, 外植体を FAA で固

定後脱水して, 臨界点乾燥後金蒸着したものを走査電子顕微鏡で観察した。

発芽, 増殖したニワウメ培養個体は, 置床後30日目に BA 1.0 mg/l, NAA 0.01 mg/l を含む MS 培地に移植した。その後, 増殖したシュート塊を増殖用培地に植え付けた。増殖用培地は MS 基本培地に NAA 0.01 mg/l を一定として, BA 濃度を 0, 0.5, 1.0 及び 2.0 mg/l にそれぞれ変えた区を設けた。培養30日後3mm以上に伸長したシュートの本数と長さを測定した。

2. 外植体の大きさがその生存率とシュート発生数に及ぼす影響

材料にはニワウメの台木から誘発させたひこばえの茎頂及び腋芽を用いた。殺菌後クリーンベンチ内の実体解剖顕微鏡下で, 茎頂から1mm, 茎頂から3mm (葉原基を含む), 茎頂から5mmの長さの腋芽及び5mm程度の茎の付いた腋芽の4種を, MS 基本培地に BA 1 mg/l, NAA 0.01 mg/l を添加した培地に植え付けた。培養後60日の生存率, シュートの本数及び新鮮重を調査した。

3. ソルビトール及び窒素形態の相違が外植体の生育に及ぼす影響

培地中の糖の種類の違いがニワウメの外植体の生育に及ぼす影響を調べるために, MS 基本培地の糖の組成のみをソルビトールに変え, その3%培地を作成した。ソルビトール培地に茎頂を植え付け, 培養後60日目の本数及び新鮮重をシュークローズ培地でのそれらと比較検討した。他方, 窒素形態の相違が外植体の生育に及ぼす影響を調べるため, MS 基本培地の窒素源である NH₄NO₃, KNO₃ の代わりに, (NH₄)₂SO₄, NH₄Cl, NaNO₃, K₂SO₄ 及び KCl を用いて, アンモニア態窒素と硝酸態窒素を同比率で含むもの, 硝酸態窒素のみ及びアンモニア態窒素のみ含むものを作り, MS 基本窒素濃度を1として, 1/3, 1/2, 1, 2及び3倍に濃度を変えた区を設けた。他の要素は MS 基本組成と同様で, 植物ホルモンとして BA 2 mg/l, NAA 0.01 mg/l を各培地に添加した。別に, MS 基本組成濃度を1/3~3倍までに変え, いずれの培地にも BA 2.0 mg/l, NAA 0.01 mg/l を添加した区を設けた。培養40日目に, それぞれの窒素濃度や窒素の形態が外植体の生長に及ぼす影響を調査した。

4. シュートの発根に及ぼすオーキシンの影響

供試材料には増殖培地で1cm以上に伸長したシュートを用いた。発根培地は MS 基本培地組成を1/2及び1/4濃度とし, シュークローズ (1.5%) と寒天 (0.8%) を加えた。これに NAA 0.1 mg/l 添加区と無添加区を設け, 別にオーキシンフリー培地に IBA 50 ppm (50%

アルコール溶液) にシュートの基部を 10 秒間浸漬して培養する区を設け、発根の状況を 30 日目に比較した。

結 果

1. 外植体の初期生育及びシュート発生数に及ぼすサイトカイニンの影響

サイトカイニンが外植体の芽数増加に及ぼす影響を第 1 図に示した。すなわち、置床後 30 日目の芽数の増加は BA 1 mg/l, 2iP 2 mg/l 区で著しく、これらの濃度より高い場合は生育が抑制され、シュートの長さも不均一となった。また、サイトカイニンの種類により適正濃度が異なった。一方、置床後の初期生育の状態を第 2 図に示した。すなわち、置床後 5 日目になると、新しい腋芽が発達し、7 日、9 日目と経過するにしたがって、新

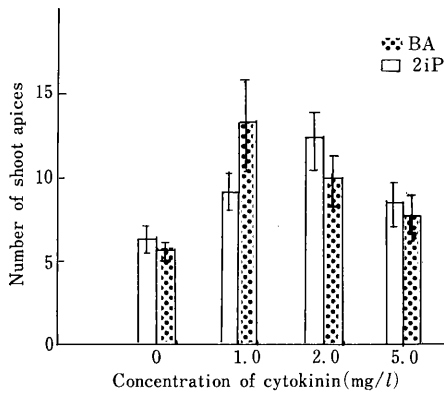


Fig. 1. Effect of BA and 2iP concentration on shoot proliferation of *P. japonica* after 30 days on MS medium containing different concentrations of cytokinin.

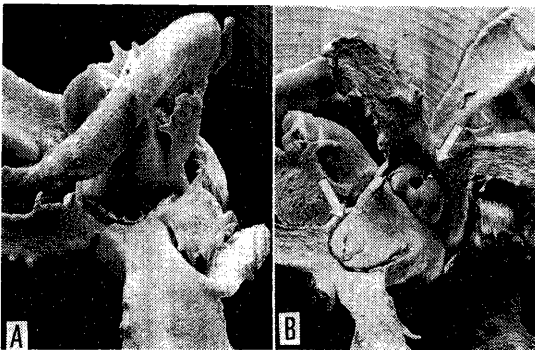


Fig. 2. Scanning electron micrographs of the emergence of shoot apices from the tip of an explant at 5 days (A) and 9 days (B) after exposure to cytokinin.

たな腋芽が形成された。

4 本のシュート塊を BA 濃度のみ異なる培地に植え付けて、40 日後の増殖結果を第 3 図に示した。本数の増加からみると、BA 0.5 mg/l の区が 3 mm 以上のシュート数、平均シュート長ともに優れ、その生育も良好であった。

2. 外植体の大きさがその生存率とシュート発生数に及ぼす影響

外植体の大きさの相違が培養 60 日後の生存率、シュートの発生本数並びに新鮮重に及ぼす影響を第 4 図に示した。すなわち、生育は茎頂から 5 mm の長さの腋芽が生存率、シュートの発生本数及び新鮮重のいずれにおいても最も優れていた。茎頂 3 mm、茎頂 1 mm と外植体の大きさが小さくなるにつれて生存率も低下し、シュ-

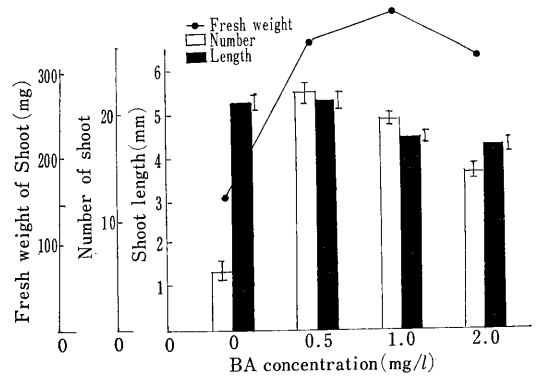


Fig. 3. Effect of BA concentration on the shoot growth and elongation after subculture.

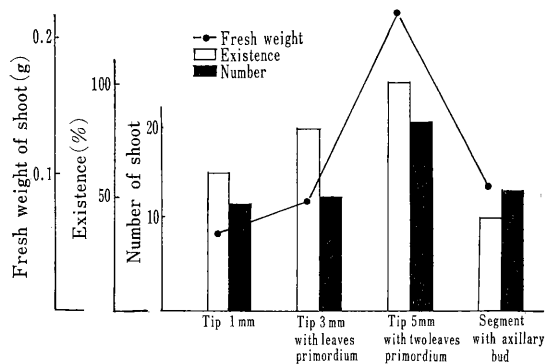


Fig. 4. Effect of explant size on shoot proliferation during 60 days after culture.

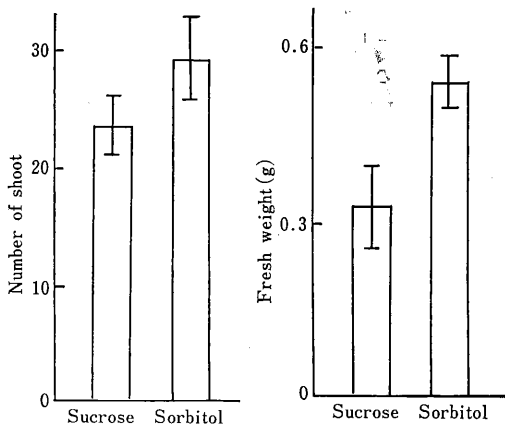


Fig. 5. Effect of sorbitol on shoot proliferation during 60 days after culture on modified MS medium.

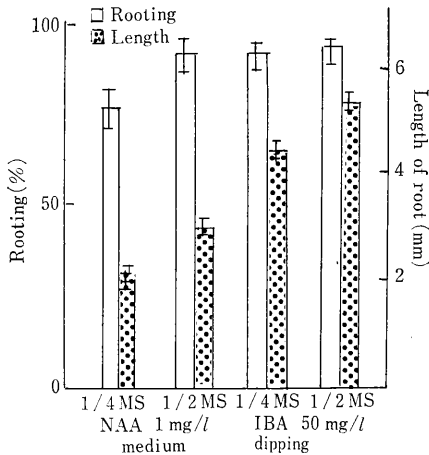


Fig. 6. Rooting of shoots after IBA dipping treatment on modified MS medium free of hormones.

トの発生本数, 新鮮重の増加も鈍くなった。

3. ソルビート及び窒素形態の相違が外植体の生育に及ぼす影響

ソルビトールが腋芽の生育に及ぼす影響を第5図に示した。すなわち, ソルビトールの培地では培養期間が長くなるほどシュクロース培地に比較して, シュートの発生本数が多くなり新鮮重も5%水準で有意に重くなった。

窒素源の形態と濃度が増殖に及ぼす影響を第1表及び第2表に示した。すなわち, アンモニア態窒素のみを含む区では, 培養2週間目から枯死する個体が多くなり, 生存個体も単に膨潤するだけで, 芽はほとんど分化しな

Table 1. Effect of N form (NO₃ or NH₄) on shoot proliferation on modified MS medium.

N form	N conc.	Average number of shoot	Number of callus	Survival (%)
NH ₄ +NO ₃	1/3	39a	0	100.0
	1/2	34a	1	97.7
	1	39a	0	100.0
	2	24b	0	97.7
	3	15cd	3	79.1
NO ₃	1/3	18c	1	95.3
	1/2	17c	1	90.5
	1	15cd	0	93.0
	2	12cd	1	76.7
	3	11d	4	66.7
NH ₄	1/3	11d	0	44.2
	1/2	10d	2	48.2
	1	10d	1	30.0
	2	10d	0	21.4
	3	10d	0	10.8
N free	0	10d	0	9.1

Table 2. Effect of concentration of MS medium on shoot proliferation.

Medium	N conc.	Average number of shoot	Number of callus	Survival (%)
MS	1/3	45a	0	100.0
	1/2	40a	0	93.3
	1	31b	0	90.0
	2	23b	0	76.7
	3	11c	0	60.0
	0	11c	0	33.3

かった。硝酸態窒素のみを含む区では, アンモニア態窒素のみを含む区より生存率は高く, 芽の分化も認められたが, アンモニア態+硝酸態窒素区では, ほぼ100%の生存率を示し, 平均芽数も3個以上であり, 増殖率も極めて良好であった。高濃度になるにしたがって, 両窒素形態区の増殖率や生存率は低下した。MS基本培地の窒素源の濃度を変えた場合は, 1/3, 1/2倍区が1倍区より有意に平均芽数が高く, 増殖率も良好であった。

4. シュートの発根に及ぼすオーキシンの影響

増殖培地で1cm以上に伸長したシュートを用いて, IBA浸漬処理などが発根に及ぼす影響を第6図に示した。すなわち, IBA 50 ppm浸漬処理区は, MS濃度に関係なく, いずれも30日目で90%以上発根したが, 発根長は1/2 MS培地のほうが優れていた。また, NAA添加処理の場合は, 1/2 MS培地で75%の発根がみら

れ、1/4 MS では95%以上の発根がみられた。

考 察

水谷ら(12)は、ニワウメに大久保を芽接したところ、良好な活着率を示し、その後の生育も順調であったと報告しているが、山崎ら(24)の調査では、ニワウメはしばしばネクロシスが現れ、CLSV (Apple cholrotic leaf spot virus) との関係による変異性があることを示唆している。京谷ら(10)も核果類におけるウィルスの感染について報告している。

著者らも現在、ニワウメ台木を使用して、わい化試験を行っているが、実生個体によってわい化の程度が異なり、また、一部には不親和性を示す個体のあることも認めている。これらは、接穂が台木に及ぼす影響、あるいは台木が各種の接穂に及ぼす影響など相互関係から考える必要があると思われる。実際にニワウメ(種子繁殖)の実生では、生育の個体間差異が大きく、また、アルビノの発現頻度も比較的高い。それ故、わい化効果の比較的安定した親和性の良いクローンの増殖が必要であると考へて、茎頂培養を試みた。実験結果に示したとおり、置床後のニワウメの外植体の生育に及ぼすサイトカイニンの濃度の影響については、BA 1.0 mg/l, 2iP 2 mg/l の添加がシュートの発生に適しており、これより濃度が高くなると、生育が非常に抑制されて外植体の増殖も悪くなる。また、BA と 2iP を比較すると、BA のほうが低濃度で増殖の程度が高く、2iP は BA に比べて同濃度であれば、サイトカイニンとしての作用性が弱いと思われた。これらのことは、他の植物体の茎頂培養の結果(19)ともよく一致した。ニワウメの場合、培養中の過湿に大変強く、シュートの伸長も良好であったことから、他の果樹台木の茎頂培養に比べて、組織培養が比較的容易な素材であると考えられる。なお、外植体の大きさを比較した実験から、5 mm の大きさ茎頂を植え付けたものの生育が最も良く、外植体の大きさが小さくなるにしたがって生存率は低下したが、茎頂のみを外植体として置床した場合でも、60%の生存率が得られた。このことから、ニワウメではウィルスによるネクロシス問題(13)の指摘もあるが、ニワウメのウィルスフリー苗を容易に供給できる可能性があると考えられる(7)。さらに、茎付の腋芽を植え付けた場合、生存率が40%と低かったことは、外植体の置床時における傷害や齡の相違が培養環境への適応性を弱めたことによると考えられる。

次に、培地中の糖源としては、一般にシュエクロースが多く用いられているが、バラ属植物の場合、光合成物質の転流形態の主なものとしてソルビトール(6)である。ニ

ワウメ外植体を継代培養した場合、ソルビトール培地での生育が良好であったことから、培養の場合にもソルビトールを用いるのが効果的であるように考えられた。この結果は、Chongら(1,2,3)のリンゴでの結果ともよく一致しており興味ある点であった。ただし、リンゴの場合、発根用の培地にソルビトールを用いた場合、ソルビトールは発根率には、ほとんど効果を示さなかったと報告しており、糖源としてのソルビトールは必要欠くべからざるものではないように思われる。

植物組織を培養する場合、主にMS培地が用いられているが、果樹の場合には窒素源の濃度を薄めることによって良好な結果が得られる例が多い(14)。とくに、Kester(9)はアーモンドの茎頂培養で、窒素濃度が低い培地で、その生育が促進されたと報告している。本実験の結果から、ニワウメはアンモニア態よりも硝酸態、硝酸態よりもアンモニア態+硝酸態を好む傾向が認められた。

窒素源の絶対量についてみると、MS培地の2倍、3倍濃度区は、植え付け1週間までは、他の区に比べて外植体の肥大が促されたが、その後には生育が悪くなり、3倍濃度区では枯死する個体も多かった。これらは葉が褐変して窒素の高濃度障害によるものと思われた。また、1/3及び1/2濃度区では、窒素源のバランスが良く、芽の分化を盛んにしたと考えられる。

以上のことから、ニワウメの生育に適したMS培地は、基本無機成分中の NH_4NO_3 及び KNO_3 の濃度を、それぞれ $\frac{1}{2}$ 程度に薄めたものが優れていると思われる。

発根条件に関しては、IBAをシュートの基部のみに浸漬して、オーキシンプリーの培地に植え付ける方法が最も効果的であると思われる。実際に、モモのさし木での発根も上述の処理が有効であることが認められており(5)、それと一致することは興味ある点である。さらに、発根率を高めるためには、他のオーキシンの使用やフロログリシンなどの発根補助剤(8)の添加なども考えられるが、ニワウメは比較的発根が容易であるので、培地に合成オーキシンを添加すると、根の伸長抑制などに悪い影響も考えられる。したがって、現在のところ、オーキシンプリーのMS濃度の無機培地で、発根を誘起せしめる方法が最も優れたものと思われる。

摘 要

わい化効果や着果が良好と思われるニワウメ台木から誘発させたひこばえを用いて、茎頂の培養培地組成を検討した。

1. サイトカイニンが置床後の外植体の芽数増加に及ぼす影響を調べた結果、芽数の増加はBA 1 ml/l, 2iP

2mg/l で著しく、これより濃度が高い場合には生育が抑制された。

2. シュート増殖培地では、BA 0.5mg/l の区がシュート数、平均シュート長ともに優れ、その生育も良好であった。

3. 茎頂 3 mm, 茎頂のみと外植体の大きさが小さくなるにしたがって、その生存率が低下した。

4. 糖源としてソルビトールを用いると、シュートの本数が明らかに多くなった。

5. 窒素源として硝酸態とアンモニア態窒素の両者が存在した場合、外植体の生育は良好であった。窒素の濃度に関しては、MS 基本組成の 1/3, 1/2 倍濃度で、芽の分化も多く、生育も盛んであった。

6. 発根は、シュート基部を IBA 50 ppm 浸漬処理した場合、発根培地にオーキシンフリー培地を用いるのが良好であった。

引用文献

- COFFIN, R., C.D. TAPER, and C. CHANG. 1976. Sorbitol and Sucrose as carbon source for callus culture of some species of the Rosaceae. *Can. J. Bot.* 54: 547—551.
- CHONG, C. and E.C. PUA. 1985. Carbon nutrition of Ottawa 3 apple rootstock during stages of in vitro propagation. *J. Hort. Sci.* 60: 285—290.
- Eng-CHONG, PUA and C. CHONG. 1985. Regulation of in vitro shoot and root regeneration in 'Macspur' apple by sorbitol CD-glucitol and related sources. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 110: 705—709.
- FISHER, D.V. 1971. Why not a small peach trees? *Amer. Fruit Grower* 91: 14—15, 18—21.
- 弦間 洋・山本 洋・石田雅士・傍島善次. 1979. モモのさし木繁殖に関する基礎的研究Ⅲ. 京府大学報農. 31: 21—28.
- 石田雅士・稲葉昭次・傍島善次. 1985. モモにおける同化物質の枝梢及び果実への転流と蓄積について. 京府大学報農. 37: 163—171.
- 石田雅士・中村好伸・傍島善次. 1984. モモわい性台木の茎頂培養による大量増殖の可能性について. 園学要旨. 昭59秋: 122—123.
- JORAN, M., L. ITTURRIA, and W. FEUCHT. 1980. Inhibition of root formation in *Prunus avium* hypocotyl by chlorogenic acid in vitro. *Garten. Wissen.* 45: 15—17.
- KESTER, D.E., L. TABACHNIK, and Negue-roles, T. 1977. Use of micro-propagation and tissue culture to investigate genetic disorders in almond cultivars. *Acta Hort.* 78: 95—101.
- 京谷英寿・吉田雅夫・山口正己. 1983. 核果類における *Prunus necrotic ringspot virus* 感染について. 果樹試報 A10: 17—26.
- LORETE, F., G. BARGIONIC, and P.L. PISHANI. 1983. Performance of peach and nectarine in a high density system in Italy. *HortScience* 18: 143—146.
- 水谷房雄・山田昌彦・谷口俊哉・小泉京子・杉浦明・苫名 孝・門屋一臣. 1985. ニワウメ及びユスラウメ台がモモ '大久保' の矮化に及ぼす効果. 園学雑. 54: 327—335.
- 村瀬昭治・鈴木勝征・山崎利彦. 1986. モモのわい性台木に関する研究. 果樹試報. A13: 31—49.
- MURASHIGE, T. 1974. Plant propagation through tissue cultures. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 25: 135—166.
- NEGUEROLES, J. and O.P. JONES. 1979. Production in vitro of rootstock/scion combinations of *Prunus* cultivars. *J. Hort. Sci.* 54: 279—281.
- 尾形亮輔. 1986. リンゴと核果類のわい性台木. 園学雑. 55: 104—107.
- REEVES, D.W., G.A. COWVLLON, and B.D. HORTON. 1985. Effect of GA₃ on elongation and rooting of 'St. Julien A' rootstock in vitro. *Scientia Hort.* 26: 253—259.
- 島村和夫・三善正道・平川利率・岡本五郎. 1987. 主幹形モモ樹の生産と果実生産. 園学雑. 55: 422—428.
- SINGLRA, S. and C. EDWIN. 1985. Mineral nutrient status of crabapple and pear shoot cultured in vitro on varying concentration of three commercial agars. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 110: 407—411.
- 鈴木勝征・村瀬昭治・山崎利彦. 1986. モモ及びオウトウのわい性台木の探索. 果樹試報. A13: 21—29.
- 苫名 孝・杉浦 明・古川良茂・片岡郁雄. 1985. モモのわい性台木選抜・育成に関する研究. 科研補成報. 1—55.
- TUKEY, H.B. 1964. Dwarfed fruit trees. p. 174—181. Cornell Univ. Press, New York.
- WEBSTER, A.D., V. HEATHER Qehl, T., E. JAKSON and O.P. JONES. 1985. The orchard establishment, growth and precocity of four micropropagated apple scion cultivars. *J. Hort. Sci.* 60: 169—180.
- 山崎利彦・平林利郎・村瀬昭治・柳瀬春夫. 1984. モモのわい性台木にあらわれる necrosis について. 園学要旨. 昭60春: 148—149.