HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	リンゴ果実の発育に伴う果肉組織のカルス形成能力の変化について
Author(s)	太田, 象一郎; 田村, 勉
Citation	北海道大学農学部邦文紀要, 14(2), 166-173
Issue Date	1984-10-18
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/12013
Type	bulletin (article)
File Information	14(2)_p166-173.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

リンゴ果実の発育に伴う果肉組織のカルス形成能力の変化について

太田象一郎
(岐阜大学農学部園芸学教室)
田村　勉
(北海道大学農学部果樹蔬菜園芸学教室)
(昭和58年12月21日受理)

Changes in Callus Formation from Apple Flesh Tissue during Fruit Development

Shouichiro OHTA
(Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Gifu University, Gifu, Japan)
Tsutomu TAMURA
(Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo, Japan)

緒　言

果肉組織の培養はモモ[7]，アボカド[6]，カンキツ[2,9]など多くの種類で試みられている。リンゴ果肉組織の培養に関してLETHAM[3]，奥瀬[4]によって検討された結果によると，果肉組織からのカルスの形成，生長には培地にオーキシンとサイトカイニンとが含まれていることが必要であるとされている。

果肉組織からのカルスの誘導は培地条件の他，培養に用いる組織の生理的な条件にも左右される。すなわち，組織が細胞分裂能力をもつ若いものほどカルスの形成，生長は容易であると考えられるが，リンゴ果実では細胞分裂期にある幼果の他，成熟期に達した果肉でも維管束を中心にカルス形成が認められたと報告されている[3]。

筆者らは以上の研究結果を踏まえ，発育初期から成熟期に到るまでの果肉組織を一定の培養条件下で培養し，果実の発育にともなうカルス形成能力の変化を明らかにすることによって，品種や栽培環境の相違による果実の生長，成熟の生理機構の差異を把握しようとして本研究を行なった。実験は1977年および1978年に熟期の異なる数種のリンゴ品種を供試し，品種の相違，およびビニルハウス内におけるリンゴ樹の加温処理による環境条件の変化がカルスの形成，生長にどのように影響するかを調査した。またサイトカイニンの存在と，果肉組織のカルス形成能力との関係を知ろうとして，サイトカイニンを含まない，すなわちオーキシンのみを含む培地でのカルス形成能力をあわせて検討した。

材料および方法

使用品種と産地：供試材料として，1977年には熟期の早い品種として‘旭’を，また最も遅い品種として‘国光’を，そしてその中間の品種として‘紅玉’を選んだ。1978年はこの3品種に晩熟種としてふじを加えた。これらはいずれも北大余市果樹園産であった。供試果実は開花後30日目から各品種の収穫期までの期間7～10日おきに採取した。なお，果実を採取したリンゴ樹の樹齢は‘旭’，‘紅玉’および‘国光’が30年生，‘ふじ’は10年生であった。

ビニルハウス内での加温処理：1978年には加温の影響をみるため，北大農学部附属果樹園の11年生の‘旭’を用いて，ビニルハウスで樹体を覆い，オイルヒーターを用いて次のような加温処理を行なった。すなわち試験区は，試験区I，夜間加温—23±1°C (18:00—06:00)，試験区II，昼・夜加温—外気温＋4±1°C (06:00—18:

00)・23±1°C (18:00—06:00), 対照区（自然条件）の3区であった。加温処理は開花後7日目から30日間行ない，温度環境が果肉からのカルス形成に及ぼす影響を調べた。

生長調節物質としてオーキシンのみを含む培地でのカルスの形成・生長： 1978年にはオーキシンの単用培地を作り，'早生旭'，'スターキングデリシャス'（以下，スターキングと略す），'ふじ'の開花後40日の幼果の果肉組織を培養した。

材料の殺菌と培地，培養条件： 採取した果実は奥瀬の方法に習い，市販のアンチホルミン液を希釈した殺菌液に30分間浸漬して殺菌した[4]。次にコルクボーラーとカミソリを使って生重量25 mg前後の組織片を無菌的に切りだし，あらかじめ培養基25 mℓを分注した100 mℓ容三角フラスコに4個ずつ置床した。この三角フラスコ5個を1試験区として25°C暗所で培養を行ない，6週間後にカルス形成率とカルスの生重量を測定した。カルス形成率はごくわずかでも組織片の外部に白色の細胞塊が認められた個体を，カルス形成個体として置床した果肉組織片20個に対する比率として求めた。またカルス生重量は，カルスを形成した個体につき生重量を測定し，個体当たりの平均値として示した。

培地としては White の処方に若干の修正を加えた組成のもの[4]を基本培地とし，生長調節物質2・4-D 3×10^{-6} M，カイネチン 3×10^{-7} Mを添加した。作製した培地はpHを5.5に調整し，粉末寒天を7 g/ℓの濃度で加えて加熱溶解した後，前述の三角フラスコに分注し，120°C，1.2 kg/cm^{2}で10分滅菌した。また，オーキシンが単独でカルスの形成にどう影響するか見る場合には，上記の培地組成からカイネチンを除き，2・4-D 10^{-5}, 10^{-6}および10^{-7} Mの3濃度の培地を用いた。

結　　果

1. 品種の相違と果肉からのカルス形成

果実の発育にともなう果肉組織のカルス形成能力の経時的変化をカルスの形成率および生重量について調査した。

1977年は開花後50日目までの果肉組織の培養において，供試した'旭'，'紅玉'，'国光'の3品種ともカルス形成率は80%以上を示し，以後成熟に向かうにつれ低下した。'旭'ではカルス形成率の低下が始まる時期は開花後30日で，3品種中最も早く，その後開花70日目から90日目の間に急激な低下を示した。'紅玉'では開花後70日目までカルス形成率は100%であったが，80日目に急激な低下を示し，90日目の調査では90%近くまで回復したが以後110日目までの間にすみやかに低下した。'国光'では，開花後90日目でカルス形成率は低下のきざしを示したが，その後も80%以上のカルス形成率を示す期間が50日間続き，140日目から急激に低下した (Fig. 1)。

形成されたカルスの生重量は，生育初期の材料ほど大

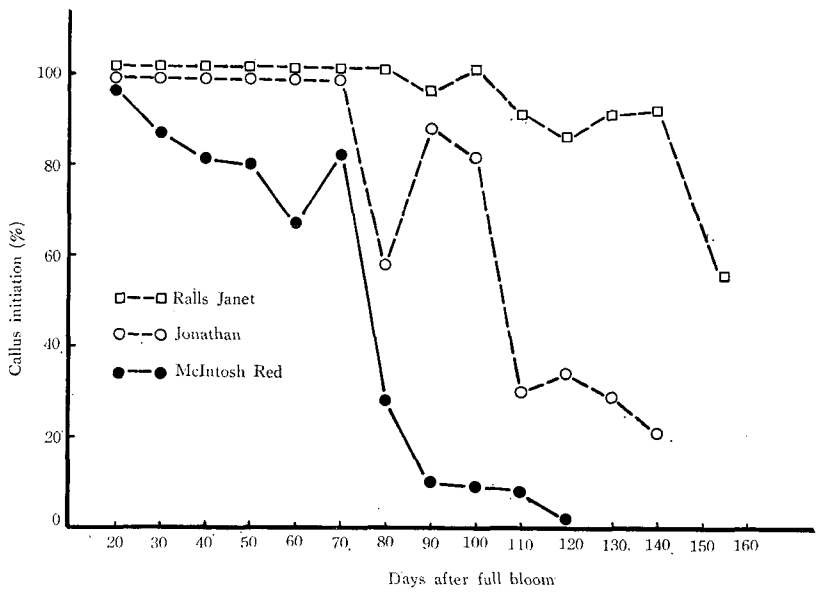

Fig. 1. Effect of fruit age on callus initiation from fruit tissue (1977).

きかった。'旭' ではカルス形成率が低下するのにともないカルス生重量も低下した。'紅玉' では開花後20日目の果肉組織からのカルス生重量はきわめて大きかったが，50日目までにすみやかに減少し，以後50 mg 前後で推移した。'国光' では開花後20日目から30日目の間でカルス生重量の低下が認められたが，以後140日目まで50 mg 前後であった (Fig. 2)。

1978年は前年の3品種と 'ふじ' を用いて実験を行なった。果実の発育にともなうカルス形成率の変化は，前年の実験と同様の結果を得た。すなわち，熟期の早い

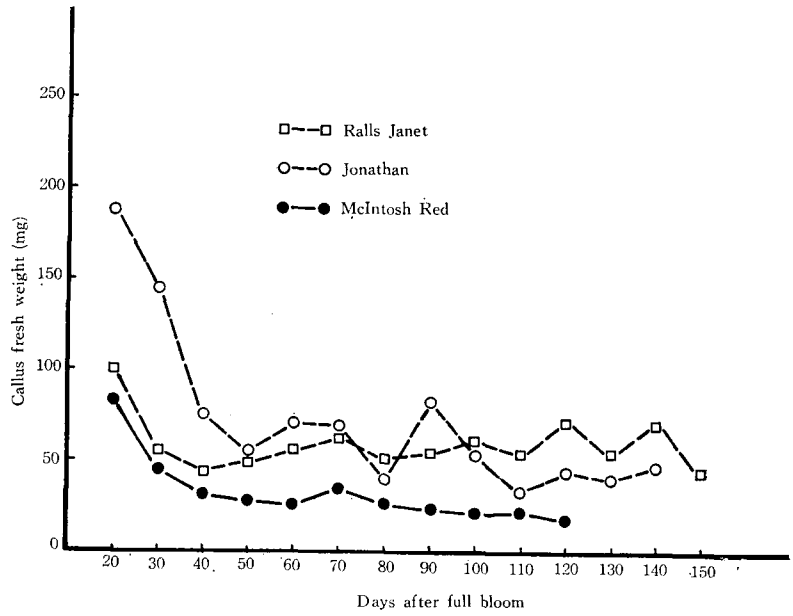

Fig. 2. Effect of fruit age on the fresh weight of callus derived from fruit tissue (1977).

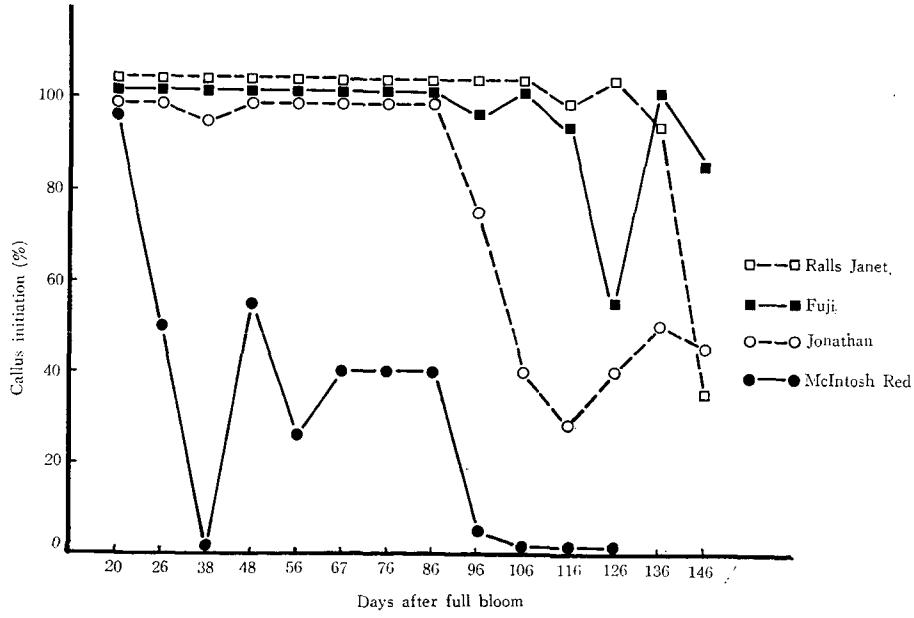

Fig. 3. Effect of fruit age on callus initiation from fruit tissue (1978).

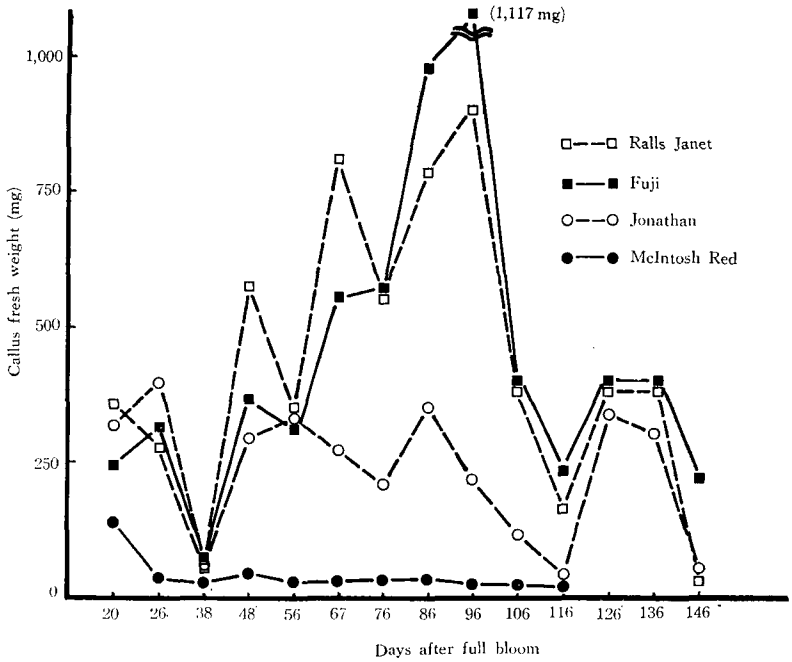

Fig. 4. Effect of fruit age on the fresh weight of callus derived from fruit tissue (1978).

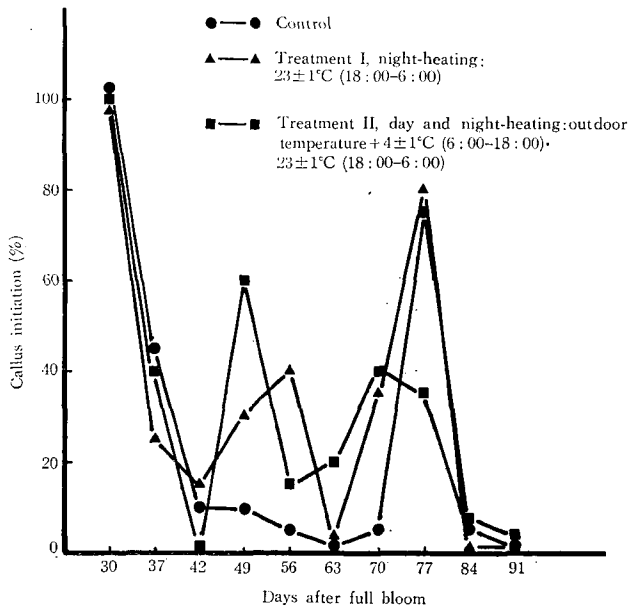

Fig. 5. Effect of heat treatment on callus initiation from fruit tissue (1978, 'McIntosh Red').

'旭' ではカルス形成率の低下が始まる時期は4品種中最もはやく，以下 '紅玉', '国光' と熟期の遅い品種ほどカルス形成率の低下が始まる時期が遅くなった。'ふじ' では '国光' よりやや早く，開花後 96日目からわずかにカルス形成率の低下が認められたが，136日目，146日目では80% 以上のカルス形成率を示し，これらの時期では '国光' よりカルス形成率が高かった (Fig. 3)。

カルス生重量については '旭' では前年とほぼ同じ結果であった。その他の品種では開花後38日目から96日目までの間，カルス生重量は増減を示しながら上昇した。特に '国光' と 'ふじ' の両品種は開花後96日目で最大の生重量を示し，この時点以後低下した。'紅玉' ではこれら2品種ほどカルス生重量は大きくなかったが，前年の実験よりカルスは旺盛な生長を示した (Fig. 4)。

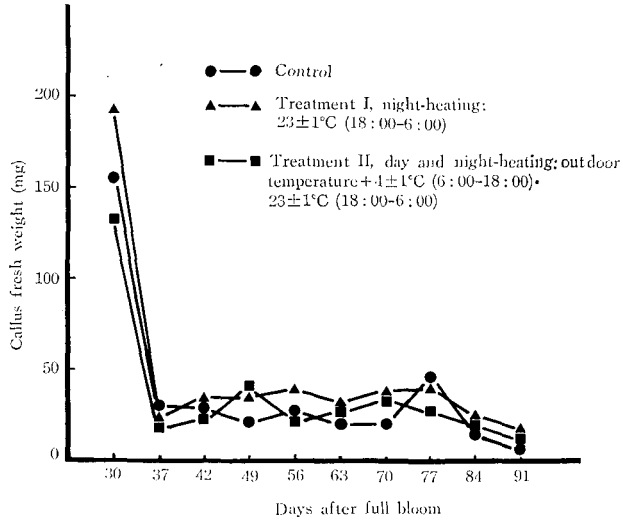

Fig. 6. Effect of heat treatment on the fresh weight of callus derived from fruit tissue (1978, 'McIntosh Red').

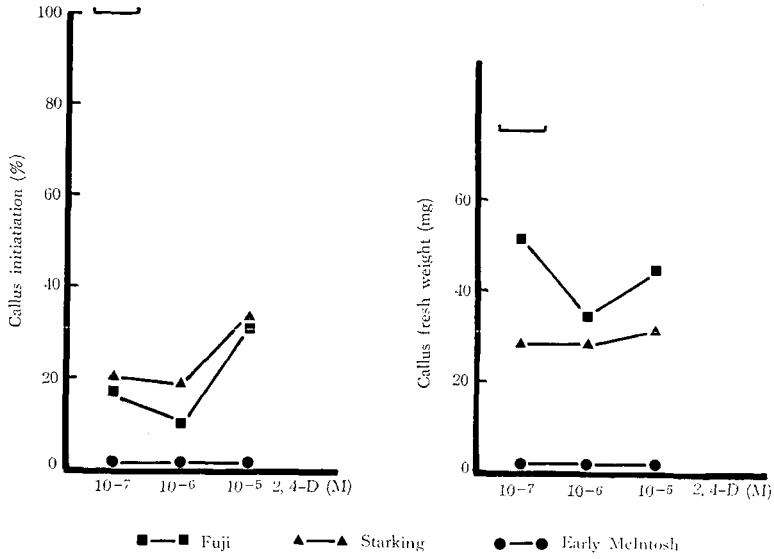

Fig. 7. Callus formation on the medium without cytokinin. Horizontal line (—) shows the callus initiation and it's fresh weight of 'Fuji' explants incubated on the medium containing 2・4-D and kinetin.

2. カルス形成に及ぼす加温処理の影響

ビニルハウス内で加温栽培された‘旭’の果実を用いて，温度環境の相違が果肉のカルス形成に与える影響について調査した。果実の発育にともなうカルス形成率の変化をみると，対照区では42日目まで形成率は急速に低下し，その後63日目までは徐々に低下して77日目に著しいカルス形成率の回復を示した後再び低下した。夜間5°C加温した試験区Iでは開花後77日目の他，56日目にもカルス形成率が高かった。また，試験区IIでは開花後49日と70日および77日目にカルス形成率が高かった (Fig. 5)。しかし，カルス生重量については開花後30日目に最も大きく，対照区，試験区I, IIともそれ以後のカルス形成率の上昇に対応するカルス生重量の増加は認められなかった (Fig. 6)。

3. サイトカイニンを除いた培地におけるカルスの形成

開花後40日目に採取した‘早生旭’,‘スターキング’,‘ふじ’の果肉組織を生長調節物質として2･4-Dのみを含む培地で培養した。

その結果，‘ふじ’,‘スターキング’両品種ではカルスの形成が若干見られた。しかし‘早生旭’ではまったくカルスは形成されなかった。また，形成されたカルスの生重量はサイトカイニンを含む培地の結果と比較すると著しく劣っていた。2･4-Dの濃度については高い濃度でカルスの形成，および生重量が大きくなる傾向が見られたが，ここに用いた濃度範囲では明らかな差は認められなかった (Fig. 7)。

考　　察

本研究の結果，開花後の果肉組織のカルス形成能力をカルス形成率および形成されたカルスの生重量でみると，今回供試したリンゴ品種の中で最も熟期の早い‘旭’が最も低く，その他の品種においては熟期の遅いものほど高い傾向が認められた。組織学的観察[1,8]では，リンゴ果実の細胞分裂期は開花後4週間目までに終わり，それ以降の果実の発育は細胞の肥大によるとされている。1978年に実験に供試したふじの果実の発育は容積で見るとS字曲線を示し，開花後35日目頃から175日目頃までの果実の生長はきわめてすみやかであった (Fig. 8)。

この生長曲線と果肉のカルス形成能力を比較すると，カルスの形成率は果肉の細胞分裂期から細胞肥大期の前半で，また培地上のカルスの生長は細胞肥大期の前半に

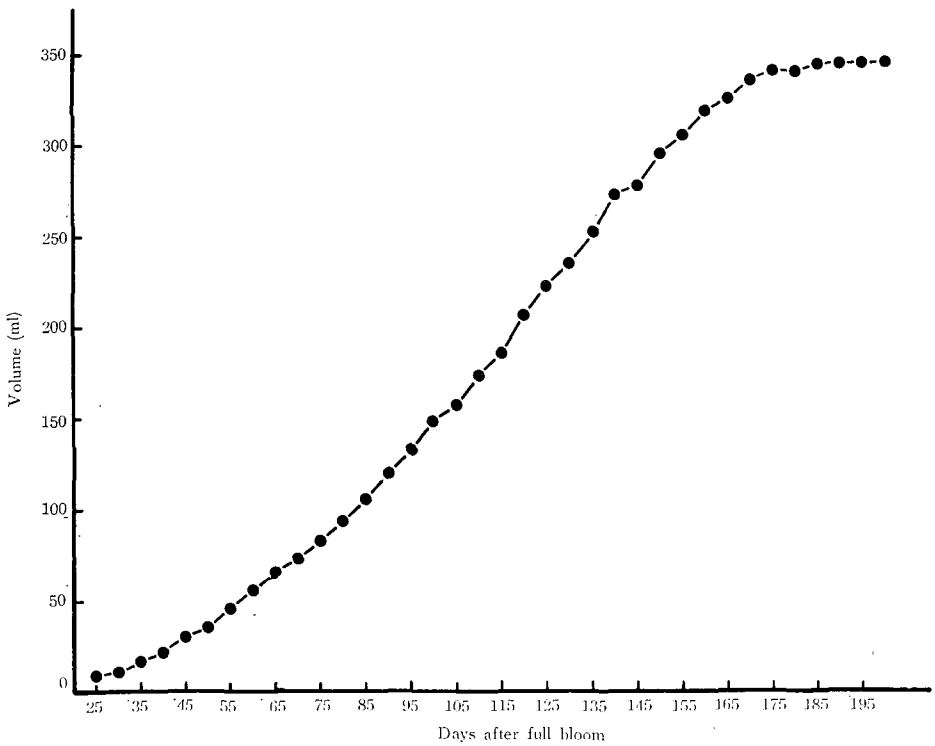

Fig. 8. Growth curve of ‘Fuji’ apple (1978).

おいて著しく，果肉細胞の老化にともなってカルスの形成能力は低下を示した。なお，'ふじ'以外の品種においても大体同様の傾向が見られた。

アボカドのように細胞分裂による発育期間の長い果実[5]では成熟期に達した果肉組織を培養してもカルス細胞が増殖することが報告されている[6]。また，LETHAMは受精後110～130日目に採取したリンゴ'Sturmer Pippin'を培養したところ，維管束組織を含む果肉組織からのカルスの形成，生長はきわめて顕著であったとしている[3]。

これらの報告と本研究の結果とを比較してみると，'紅玉'，'国光'，'ふじ'における結果と一致するが，'旭'において果肉からのカルスの形成，およびその生長が果実生長の早い時期に低下し，かつ全期間を通じて劣る原因については幼果の細胞分裂期間や，果実の内生物質の消長などの立場から今後の研究で明らかにしたい。

1977年と1978年の結果を比較すると，カルスの形成率，生長量には差異があったが，各々の実験の中で用いた品種について比較すると，ここに用いた品種では熟期が早いほどカルスの生長能力が小さいことが示されている。また果肉組織からのカルスの形成率，生長量が実験に供試した果実の生育環境のうち，温度条件によってどのような影響をうけるかについて，'旭'を用いて調査した1978年の実験結果 (Fig. 5, 6) をみると，カルス形成率にはやや影響が見られ，加温区が開花後50～70日の間で高くなる傾向があったが，カルスの生長量には対照区との間に差異は認められなかった。

サイトカイニンを欠き，2･4-Dのみを含む培地でのカルスの形成，生長はきわめて劣っていた (Fig. 7)。このことは，リンゴ果肉組織の培養には培地内のオーキシンとサイトカイニンが重要であるとする従来の報告[3,4]と一致した。

奥瀬は，果肉からのカルス形成は主として果実の内生サイトカイニンレベルに左右されると推定しているが[4]，本研究の結果からもカルスの形成，生長に果肉組織の内生的な生長調節物質のレベルが，大きく影響していると見ることができる。もし，前述のカルス形成における品種間差がこのような物質の消長によるものとすると，幼果から成熟に達するまでのリンゴ果実の発育相の変化が内生生長調節物質の消長によって制御されていることが示唆されるが，この点については，今後さらに検討したい。

摘　　要

開花後20日目より収穫期までの間，7～10日おきに採取したリンゴ果実の果肉組織を培養し，組織のカルス形成能力について調査した。

(1) カルス形成率には明白な品種間差異があった。'旭'のカルス形成率は開花後30日目より低下し始めた。一方，'国光'，'ふじ'では開花後100日目でもカルス形成率は100%であった。

(2) '旭'のカルスは，開花後間もなく採取された果肉組織から誘導されたものを除き，きわめて生長が劣っていた。実験を行なった年次により変動はあったが，'紅玉'，'ふじ'，'国光'のカルスは開花後かなり遅い時期 (50日目以降) のものも旺盛に生長した。

(3) '旭'の樹体に加温処理し，結果した果実を用いて培養を試みたところ，カルス形成率には若干の影響があったが，カルスの生長には何ら効果は認められなかった。

(4) オーキシンとサイトカイニンのカルスの形成，生長に対する効果は明白であった。サイトカイニンを除いた培地で培養した果肉組織ではカルスの形成はきわめて劣った。

引 用 文 献

1. 青木二郎・奥瀬一郎：袋かけの有無とリンゴ'紅玉'の果実の発育，成分変化，銹果並びに貯蔵障害果との関係．弘大農報，**10**：78-86. 1964
2. EINSET, J. W.: Citrus tissue culture. Plant Physiol. **62**: 885-888. 1978
3. LETHAM, D. S.: Cultivation of apple fruit tissue *in vitro*. Nature **182**: 473. 1958
4. 奥瀬一郎：リンゴ果肉組織の培養について．植物の化学調節 **3**: 56-62, 1968
5. SCHROEDER, C. A.: Growth and development of the fuerte avocado fruit. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. **61**: 103-109. 1953
6. SCHROEDER, C. A.: Proliferation of mature fruit pericarp tissue slices *in vitro*. Science. **122**: 601. 1955
7. SOMMER, N. F., M. V. BLADLEY, M. T. CREASY.: Peach mesocarp explant enlargement and callus production *in vitro*. Science. **136**: 264. 1962
8. 田村　勉・福井博一・今河　茂・三野義雄：リンゴ果実及び種子の発育に及ぼす果実発育初期の温度の影響．園学雑，**50**：287-296. 1981
9. UNGER, J. W. and FENG, K. A.: Growth and differentiation of juice vesicles of orange grown *in vitro*. Amer. J. Bot. **65**: 511-515. 1978

Summary

The flesh explants of apple (Malus pumila Mill. var. domestica Schneid.) were excised from samples picked at 7–10 day intervals from 20 days after full bloom until harvest time. The ability of explants to produce callus from fruit tissues during fruit development were investigated.

1. There was a remarkable difference in the callus initiation among the cultivars (McIntosh Red, Jonathan, Ralls Janet, and Fuji). Callus initiation of 'McIntosh' Red started to decline at 30 days after full bloom. On the other hand, callus initiation occurred in all explants of 'Ralls Janet' and 'Fuji' at 100 days after full bloom.

2. Callus growth of 'McIntosh Red' was very poor except in the early stage of fruit development. Although varying by year, callus growth of 'Jonathan', 'Fuji' and 'Ralls Janet' was vigorous from the early to later stage (more than 50 days after full bloom) of fruit development.

3. Heating treatment on the tree of 'McIntosh Red' apple affected on callus initiation of explants, but the effect of this treatment was not observed in the growth.

4. The effect of auxin and cytokinin for the formation and growth of callus was apparent. When explants were cultured on the medium without cytokinin, callus formation was very poor.