HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ハイブッシュブルーベリーの茎頂の生長に及ぼす生長調節物質の影響とその季節的変化
Author(s)	福井, 博一; 村上, 保之; 原田, 隆; 田村, 勉
Citation	北海道大学農学部邦文紀要, 15(1), 1-6
Issue Date	1986-03-31
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/12043
Type	bulletin (article)
File Information	15(1)_p1-6.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

ハイブッシュブルーベリーの茎頂の生長に及ぼす生長調節物質の影響とその季節的変化

福井博一・村上保之
原田　隆・田村　勉
(北海道大学農学部果樹蔬菜園芸学教室)

(昭和60年10月12日受理)

Response of Highbush Blueberry Axillary Leaf Bud Apices to Growth Regulators and its Seasonal Changes

Hirokazu FUKUI, Yasuyuki MURAKAMI, Takashi HARADA and Tsutomu TAMURA
(Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo, Japan)

緒　言

近年，小果樹に対する関心が高まっており，その中でも特にブルーベリーの需要が増大しつつある。しかし，ブルーベリーの苗木を養成する場合，現在用いられている挿木法では射出髄及び硬組織の配置が障害となり他の果樹に比べ発根率が低く[1]，増殖能率が悪い。

果樹，特にリンゴにおいては茎頂培養の手法を用いた苗木の大量繁殖法が確立されており，実用化の段階に至っている。石原[4,5]は，茎頂培養による大量繁殖に関する総説の中で，この繁殖法を確立するためには苗条の生長要因の解明と初期培養のための培地の検討が重要な課題であることを指摘している。

ブルーベリーに関しては，LYRENE[11]によって茎頂培養が試みられているが，研究例が少なく，その詳細については明らかになっていない。また，ALTMAN[2]はオレンジを用いた実験で，材料の採取時期の違いによって苗条の生長要因が異なることを報告している。したがって，本研究では茎頂培養による大量繁殖法の確立のための最初の段階として，採取時期の異なる茎頂の生長に及ぼす生長調節物質の影響についての検討を行った。

材料及び方法

北海道大学農学部附属農場に栽植されているハイブッシュブルーベリー‘バーリントン’ *Vaccinium corymbosum* L. cv. BURLINGTON) の枝を1984年5月10日から1985年3月12日にわたって採取し，その腋生の葉芽を供試材料とした。枝は葉芽1個を有する長さ2cmの切片とした後，芽のりん片をすべて除去した。これを中性洗剤で洗浄し十分に水道水ですすいだ後，70%エタノールに15秒間浸漬し，クリーンベンチ内で次亜塩素酸ナトリウム溶液（有効塩素1%，Tween 20を0.01%含む）を用いて10分間表面殺菌を行い，その後滅菌水で10回洗浄し溶出するフェノール性物質を除去した。この殺菌した材料から葉原基6個程度を有する長さ1mmの茎頂を取り出し培養に用いた。

基本培地として，WOLFE[12]の報告に従い，LLOYD and MCCOWN[9]の処方によるWPM (Wood Plant Medium, 第1表) を用い，グルコース0.2Mと種々の濃度の N^6-benzylaminopurine (BA) および Gibberellin A_3 (GA_3) を添加後，pH 5.5に調整した。これに寒天0.7%を加えて25×150mmの試験管に1本当たり10mℓを分注し，120°C，1.2kg/cm^{2}の条件下で10分間殺菌した。1区当たりの反復数は11～14とし，培養は25°C，4,000 lx，16時間日長の条件下で行った。

調査項目は，最大葉長，葉数，シュート形成の有無及びカルス形成率の4項目で，4週間培養後に調査した。

結　果

供試した‘バーリントン’は5月下旬に萌芽し，新梢の

伸長停止期は7月中旬であった

1. 葉　　長

Fig. 1 に葉の生長に及ぼす GA_3 および BA の影響を示した。10^{-5} M の GA_3 は葉の生長を著しく促進したが，10^{-7} M では無添加の場合とほとんど差がなかった。採取時期別の GA_3 10^{-5} M の作用について見ると，萌芽前後の5月から6月にかけては高い促進効果が認められたが7月には低くなった。しかし，8月に採取したものでは葉長が大きな値を示し再び促進効果が現われたが，その後1月に至るまで漸次低下した。そして，萌芽期が近づくに従い再び葉の生長は良好になった。

BA の効果については，無添加区と 10^{-7} M 添加区との間には有意な差は認められなかったが，10^{-5} M と高濃度になると葉の生長は促長された。採取時期別にみると，9月に採取した茎頂の葉の生長がいくらか良好であったが，GA_3 におけるような大きな変化は認められず，年間を通じてほぼ一定であった。

GA_3 及び BA 各々の主効果は共に有意で，交互効果は認められなかった。したがって，葉を伸長させるには高濃度の BA および GA_3 を同時に培地に添加することが必要であると考えられる。

2. 葉　　数

Fig. 2 に示すように，GA_3 を添加した区の葉数は6月から9月にかけては無添加区のものより大きな値を示し，GA_3 の葉の分化促進効果が認められたが，それ以外の時期のものでは無添加区との間にほとんど差が認められなかった。しかし，葉数は7～8枚前後で推移し，GA_3 の葉の分化に及ぼす影響は小さいものと考えられる。

BA を低濃度 (10^{-7} M) で添加した区では，いずれの時期の茎頂でも葉の分化はほとんど見られず，無添加区との差は認められなかった。しかし，10^{-5} M の高濃度の BA を添加した培地では著しく葉数が増加し，高濃度の BA による高い葉の分化促進効果が認められた。時期別の BA の効果は，8～11月の茎頂で大きく，それ以外の時期のものでは低かった。したがって，葉を分化させるためには高濃度の BA を必要とすることが明らかとなった。

3. シュート形成

Fig. 3 にシュート形成に及ぼす GA_3 および BA の影響を示した。GA_3 無添加区の茎頂のシュート形成率はいずれの採取時期においても低く，BA 単独ではシュート形成が促進されないことが明らかとなった。10^{-7} M 添加区では8月及び9月に採取したもので10%前後のシュート形成が観察されたが，それ以外の時期のものでは全く形成されなかった。これに対し，10^{-5} M 添加区では6月から9月にかけてシュート形成が観察され，特に6月のものでは30.8%の値となった。

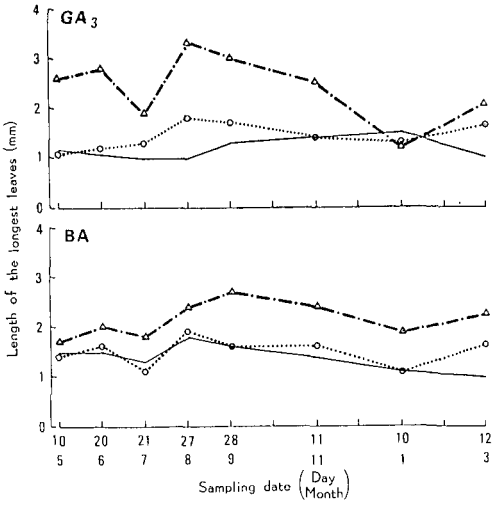

Fig. 1. Effect of GA_3 and BA on leaf development of the *in vitro*-cultured axillary leaf bud apices sampled on various times. —— 0 ····· 10^{-7} M ----- 10^{-5} M

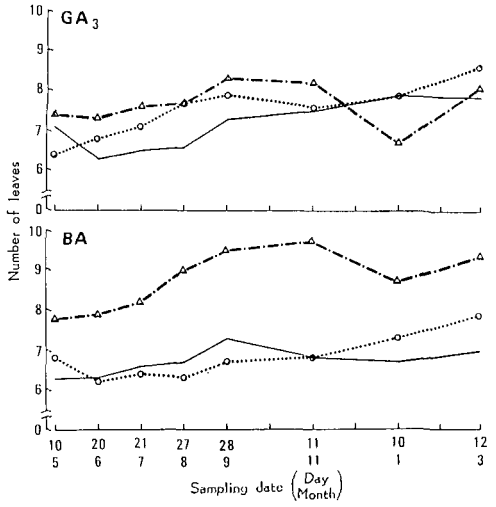

Fig. 2. Effect of GA_3 and BA on leaf differentiation from the *in vitro*-cultured axillary leaf bud apices sampled on various times. —— 0 ····· 10^{-7} M ----- 10^{-5} M

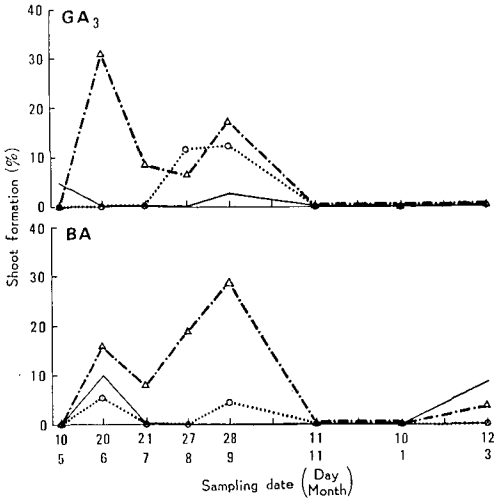

Fig. 3. Effect of GA_3 and BA on shoot formation of the *in vitro*-cultured axillary leaf bud apices sampled on various date. —— 0 ····· 10^{-7} M —— 10^{-5} M

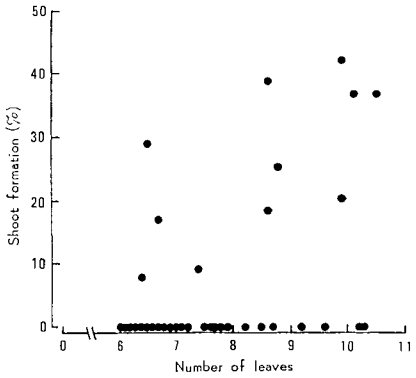

Fig. 4. Correlation between leaf numbers and shoot formation in the *in vitro*-culture of axillary leaf bud apices sampled on various times.

BA 無添加区および 10^{-7} M 添加区ではいずれの時期においてもシュート形成率は低く，GA_3 単独及び BA 低濃度と GA_3 との併用ではシュートの形成が促進されなかった。これに対し，BA 10^{-5} M 添加区では6月から8月にかけてシュート形成が観察され，高濃度のBA がシュート形成を促進することが明らかとなった。

Fig. 4 に示すように，シュート形成率の高い区では葉数が多い傾向が見られ，シュート形成率と葉数との間には高い相関が認められた。

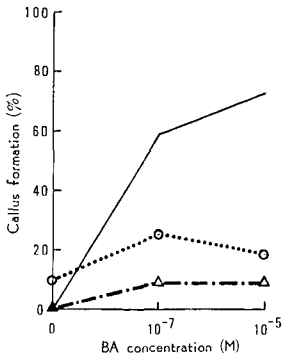

Fig. 5. Effect of GA_3 and BA on callus formation in the *in vitro*-culture of axillary leaf bud apices sampled on Aug. 27. GA_3 concentration: —— 0 ····· 10^{-7} M —— 10^{-5} M

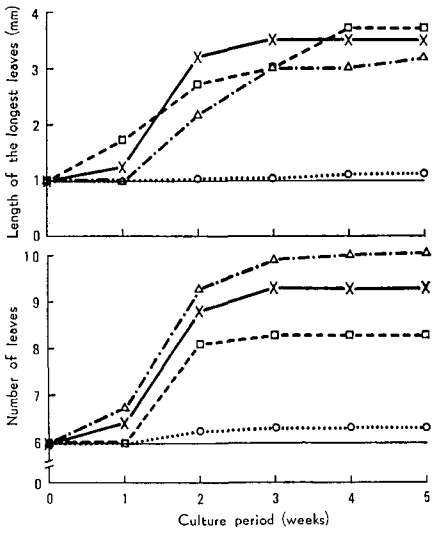

Fig. 6. Development of leaves in the *in vitro*-culture of axillary leaf bud apices.
—— no growth regulator
····· GA_3 10^{-7} M+BA 10^{-7} M
—— GA_3 10^{-5} M+BA 10^{-7} M
-·-·- GA_3 10^{-7} M+BA 10^{-5} M
—— GA_3 10^{-5} M+BA 10^{-5} M

4. カルス形成

8月に採取した茎頂のカルス形成に及ぼす GA_3 及び BA の影響を Fig. 5 に示した。BA 単独添加区においてはその濃度が高くなるに従いカルス形成率は高くなり，10^{-5} M 添加区では73% となった。しかし，この BA のカルス形成促進効果は GA_3 を同時に添加するこ

とにより低下し，BA 10^{-5} M と GA_3 10^{-5} M を添加した区のカルス形成率は BA 10^{-5} M 単独添加区の約 1/8 となった。

5. 培養期間中の茎頂の生長

培養期間中の茎頂の生長は Fig. 6 に示すように，培養開始1週間後までは緩慢であったが，その後2週間目にかけて葉長，葉数共に急激に増加した。しかし，それ以後両者共に増加率が低下し，4週間目以降は一定となった。

なお，オーキシンである 1-naphthaleneacetic acid (NAA) についても検討を行ったが，カルス形成促進以外の作用が認められなかった。

考　　察

石原[5]は，リンゴの茎頂培養法を用いた大量繁殖には，1) 培養確立，2) 増殖，3) 発根，4) 馴化，の4つの過程が考えられると述べている。ブルーベリーでは，節部の培養は行われている[12,13]が，繁殖法として茎頂培養が用いられた例はわずかである[6,11]。したがって，ブルーベリーの茎頂培養を用いた大量繁殖を行うためには，まずその第1段階として，茎葉を増殖するための初代培養の確立が望まれ，そのためには茎頂の生長に及ぼす諸要因の検討が必要である。

ELLIOT[3]は，リンゴの茎頂培養に関する研究の中で，GA が葉の伸長を促進する働きを持つことを指摘している。本実験においても GA_3 の葉の伸長を促進する作用が認められた。BA は単独添加の場合には顕著な葉の伸長促進作用を示さなかったが，GA_3 と併用することによって GA_3 の葉の伸長促進作用を強める働きがあることが明らかとなった。採取時期別にみると，3月から6月にかけて，葉の伸長が GA_3 によって促進された。リンゴにおいては，萌芽前から萌芽直後にかけて，樹液中のジベレリンが増加し[8]，これが芽の生長と密接な関係を持つことが考えられることから，ブルーベリーに関しても同様の現象があるものと推察され，本実験において萌芽期に近づくに従い GA_3 の葉の伸長促進効果が増大したのはこのことを示すものと考えられる。しかし，7月に採取したものではこの GA_3 の効果が小さく，8月および9月には再び大きくなった。これは，培養した新梢の腋生の葉芽が，7月では伸長中の新梢から採取したものであったのに対し，8月以降のものでは生長が停止した成熟期の新梢から採取したものであったことによると考えられる。すなわち7月の腋生の葉芽は，新梢伸長停止期以前であったためその茎頂組織の成熟度が低く，したがってジベレリンに対する感応性が乏しかったと考えられる。これに対し，8月及び9月のものでは，新梢のが停止し，成熟度が高まっていたために，培地に添加さ生長れた GA_3 に対する感応性が高かったと推察される。同様のことは ALTMAN ら[2]によっても指摘されている。9月以降の茎頂では葉の伸長は順次低下し，1月には最も低い値となったが，これは休眠に伴う現象と推測され，このことはオレンジでも観察されている[2]。したがって，茎頂培養によって良好な葉の伸長を示す個体を得るためには，培地に GA_3 と BA を高濃度で添加し，材料としては休眠最深期を除いた成熟期のものを用いる必要があると言える。

JONES[7]は，リンゴの茎頂培養において葉数の増加がサイトカイニンによって促進されることを観察しているが，本実験においても同様に高濃度の BA が葉の分化を促進することが明らかとなった。採取時期別に見ると8月から11月にかけての休眠前の新梢成熟期のもので，BA の高濃度区の葉数の増加が見られ，生長点部組織の分裂能が高いことが推測された。しかし，その後休眠が深まり1月になると葉数の増加は見られなくなった。これは，前述の休眠最深期における生長点部組織の分裂能の低下に伴う現象であると考えられる。以上のことから，茎頂培養によって葉数を増加させるためには高濃度の BA の添加が不可欠であり，材料を採取するにあたっては8月から11月にかけての新梢成熟期のものを用いることが望ましい。

シュート形成は高濃度の BA 及び GA_3 によって促進された。JONES[7]はリンゴの茎頂培養において，BA がシュートの形成を促進する作用を持つことを報告しており，本実験の結果はこれと一致した。ジベレリンは一般に節間伸長を促進する作用があり[11]，本実験で見られた GA_3 高濃度添加区における高い率でのシュート形成は，この作用に基づくものであろう。採取時期別に見ると，BA 高濃度区における BA のシュート形成促進効果は，7月から9月にかけて著しく高まり，その後急速に低下した。これに対し，GA_3 高濃度区では6月のものが著しく高いシュート形成率を示した。このことから，萌芽期の茎頂組織はジベレリン要求性が高く，新梢成熟期のものはサイトカイニン要求性が高いと考えられる。休眠期のものではいずれの生長調節物質を添加してもシュートは形成されなかった。Fig. 4 に示すように葉の分化とシュート形成の間には密接な関係が認められた。石原[5]は，茎頂培養による大量繁殖の第1段階は摘出した茎頂から健全なシュートを得ることであると述べている。本

実験では，シュート形成率は最も高い区で38.5%にとどまり，実用化段階としては不十分であると考えられたが，Fig. 4の結果からシュート形成率の向上は葉数の増加に適した条件を今後検討することによって達成されると考えられる。

大量繁殖法は，均一なクローンを得ることを目的としているために，カルスが形成されることは望ましくない。Fig. 5に示すように，BAを高濃度で添加した区において高い率でカルス形成が観察されたが，同時にGA_3を添加することによって，そのBAのカルス形成促進効果は抑えられた。したがって，茎頂培養による大量繁殖法には，培地へのGA_3の添加が不可欠であると考えられる。

以上の結果から，ブルーベリーの大量繁殖のための初期培養の培地としては，BAとGA_3を10^{-5} Mの高濃度で添加したものを用い，材料は新梢成熟期の茎頂を用いることが望ましいと言える。また，Fig. 6の結果から，2～3週間ごとに培地を更新することが望ましいと考えられる。

摘　　要

採取時期の異なる茎頂の生長に及ぼす生長調節物質の影響について検討した。

葉の生長は高濃度(10^{-5} M)のGA_3及びBAによって促進され，この両者の間には相補的な関係が認められた。時期別では，萌芽期及び新梢成熟期のものの生長が良好であった。葉の分化は10^{-5} MのBAによって著しく促進され，その効果は8月から11月にかけての新梢成熟期のもので大きかった。シュートの形成はGA_3とBAを同時に培地に添加した区において観察され，それは萌芽直後と新梢の伸長停止後の8月から9月の時期に限定された。シュート形成と葉数との間には高い相関が認められ‘葉の分化に適した条件はシュート形成においても好適な条件であることが明らかとなった。カルス形成は高濃度のBAによって促進されたが，それはGA_3を添加することにより打ち消された。また，NAAはカルス形成促進以外の効果を持たなかった。茎頂培養を用いた大量繁殖では，カルスが形成されることは好ましくなく，したがって培地にはGA_3とBAの両者を同時に添加する必要があり，NAAは添加しないほうが好ましいことが明らかとなった。茎頂の生長は，培養2週間後までに終了し，それ以後はほとんど変化しなかった。

以上のことから，ブルーベリーの茎頂培養には BAとGA_3を高濃度で同時に添加し，材料の採取時期は萌芽期および新梢成熟期のものが良く，培養は2～3週間ごとの継代培養が望ましいと考えられた。

引 用 文 献

1. 赤羽紀雄・渡辺久昭： ブルーベリーの特性，北海道園芸研究談話会報，**3**：27–28. 1975
2. ALTMAN, A. and R. GOREN: Growth and dormancy cycles in citrus bud cultures and their hormone control, *Physiol. Plant.*, **30**: 240–245. 1974
3. ELLIOT, R. F.: Axenic culture of shoot apices of apple, *New Zeal. J. Bot.*, **10**: 254–258. 1972
4. 石原愛也： 果樹の茎頂培養と繁殖への利用 (I)，農業および園芸，**55**：1090–1094. 1980
5. 石原愛也： 果樹の茎頂培養と繁殖への利用 (II)，農業および園芸，**55**：1216–1222. 1980
6. 石原愛也・伊藤吉晴・森沢敏哉・伊藤美穂子・鎌田徹： ハイブッシュブルーベリー cv. コンコードのミクロ繁殖法，園学要旨，昭60春：70–71. 1985
7. JONES, O. P.: Effect of benzyladenine on isolated apple shoots., *Nature*, **215**: 1514–1515. 1967
8. JONES, O. P.: Gibberellin-like substances in the transpiration stream of apple and pear trees., *J. Exp. Bot.*, **19**: 526–531. 1968
9. LLOYD, G. and B. MCCOWN: Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, Kalimia latifolia, by use of shoot-tip culture, *Proc. Intern. Plant Prop. Soc.* **30**: 421–427. 1980
10. LUCKWILL, L. C.: The control of growth and fruitfulness of apple trees., p. 237–254. In: L. C. LUCKWILL and C. V. CUTTING (eds.) Physiology of tree crops., Academic Press London and New York. 1970
11. LYRENE, P. M.: Micropropagation of rabbiteye blueberries., *HortSience*, **15**: 80–81. 1980
12. WOLFE, D. E., P. ECK and C. -K. CHIN.: Evaluation of seven media for micropropagation of highbush blueberry., *HortScience*, **18**: 703–705. 1980
13. ZIMMERMANN, R. H. and O. C. BROOME.: Blueberry micropropagation., p. 44–47. In: Proc. of the Conf. on Nursery Production of Fruit Plants through Tissue Culture. -Applications and Feasibility. USDA-SEA, Agr. Results ARR-NE-11. 1980

Summary

Growth of axillary leaf bud apices (1 mm in

length with 6 leaf primodia) of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L. cv. BURLINGTON) was investigated in relation to both the growth regulators (GA_3 and BA) added to artificial culture media and the sampling times of plant materials.

It was observed that buds of highbush blueberry growing in Sapporo sprouted in late May, and growth of shoots ceased in late June. The elongation of leaves was enhanced on a culture medium with high concentration (10^{-5} M) of gibberellin A_3 (GA_3) and N^6-benzyladenine (BA), which were complementary each other. Vigorous leaf growth was observed with the apices derived from shoots at the stage of both sprouting and maturing. Promoting effect of BA (10^{-5} M) on leaf differentiation was considerable and remarkable with the apices excised from maturing-stage shoots from August through November. Shoot formation occurred only on a culture medium containing both GA_3 and BA, and was obtained restrictively with the apices from the shoot without elongation in August and September. A close relation was found between the rates of shoot formation and the number of differentiated leaves. It suggests that a culture medium suitable for leaf differentiation is adequate for shoot formation. BA in high concentration enhanced the callus formation, and this effectiveness of BA was eliminated by GA_3. NAA had an effectiveness only on callus formation. An addition of GA_3 and no NAA to media was therefore indispensable to culturing axillary leaf bud apices of highbush blueberry without callusing. The shoot apices was able to grow rapidly in two weeks and showed a little growth after that.