



Title	園芸植物の栄養繁殖に関する基礎的研究 : 第1報 組織培養におけるブドウ新梢組織片からのカルス形成と発根
Author(s)	八鍬, 利郎; YAKUWA, Toshiro; 原田, 隆 他
Citation	北海道大学農学部邦文紀要, 8(4), 397-403
Issue Date	1973-03-30
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/11846
Type	departmental bulletin paper
File Information	8(4)_p397-403.pdf



園芸植物の栄養繁殖に関する基礎的研究*

第1報 組織培養におけるブドウ新梢組織片
からのカルス形成と発根

八 鍬 利 郎 ・ 原 田 隆

(北海道大学農学部果樹蔬菜園芸学教室)

黒 崎 利 明

(北海道日高支庁日高西部地区農業改良普及所)

Basic studies on the vegetative propagation of horticultural plants

I. Callus and root formation from tissue segments of grape shoots in tissue culture

Toshiro YAKUWA and Takashi HARADA

(Department of Horticulture, Faculty of Agriculture,
Hokkaido University, Sapporo, Japan)

Toshiaki KUROSAKI

(Hokkaido Hidakaseibuchiku Agricultural Extension Station)

Received September 14, 1972

緒 言

園芸植物の栄養繁殖に関しては多数の研究報告があるが、その多くは実用的な立場のもので、形態形成に関する基礎的研究は比較的少ないようである。

しかし、今後繁殖に関する技術を高めるためには形態形成に関する基礎問題を究明することが必要であると考えられる。例えば、挿木繁殖において発根困難な植物の発根率を高めるためには、その植物の発根の機構を見極めることが必要であり、その結果を応用することによって人為的に容易に発根させ得る場合も考えられる。その一つの方法として、発根の容易な植物と対比しながら発根の機構を調べることが考えられる。以上の観点から筆者らは、発根容易なものと同様なものを含めた数種の園芸植物についての形態形成に関する研究を行なっているが、本報ではブドウ新梢組織片を培養した場合のカルスの形成と器官分化について報告する。

なお材料を提供された、月寒学院の小原佐助氏に衷心より感謝の意を表する。

材料および方法

1. 供試材料：月寒学院農場果樹園(札幌市)の30年生 'Campbell early' の数樹より採取した新梢を用い、採取時期は昭和46年6月16日(10~15 cm程度に伸長したもの)および7月29日(40~50 cm程度に伸長したもの)の2回とした。新梢採取後節間部を約4 cmの長さに切り取り、アンチホルミン液(市販の有効塩素10%液を10倍に稀釈)に30分間浸漬して表面殺菌を行なった。つぎに無菌室内で両端約5 mmを切除したのち、これを輪切りにして厚さ1 mmの円盤状の組織片をつくり材料とした。

2. 培養基の調製：Murashige and Skoog (MS) 培地(組成は第1表に示す)を基本培地とし、これに蔗糖20 g/lおよび生長調節物質を添加し、pHを5.5に調整したのち粉末寒天7 g/lを加えた。つぎに加熱溶解後100 ml容三角フラスコに25 mlずつ分注し、アルミ фольで封じたのち、オートクレーブを用いて1 kg/cm²で15分間加熱殺菌を行なった。

*) 園芸作物の組織培養とその利用に関する研究 V

第1表 Murashige and Skoog 培地の組成

塩 類	mg/l
NH ₄ NO ₃	1650.0
KNO ₃	1900.0
H ₃ BO ₃	6.2
KH ₂ PO ₄	170.0
KI	0.83
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440.0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370.0
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22.3
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6
Na ₂ -EDTA	37.35
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.85
添加物	
Thiamine-HCl	0.1
Nicotinic acid	0.5
Pyridoxine-HCl	0.5
Glycine	2.0
myo-Inositol	100.0

第2表 カルス形成率の経時的変化 (6月16日採取の材料)

生長調節物質		調査組 織片数	培養期間 (週間)		
BA (mg/l)	NAA (mg/l)		3 (%)	4 (%)	6 (%)
0	0	18	79.1	95.2	100
0	0.01	24	96.6	100	100
0	0.1	30	100	100	100
0	1.0	27	100	100	100
0.1	0	21	96.2	100	100
0.1	0.01	21	96.2	100	100
0.1	0.1	27	100	100	100
0.1	1.0	27	100	100	100

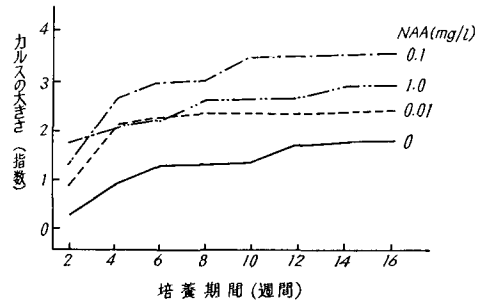
生長調節物質は cytokinin として 6-benzyladenine (BA), auxin として α -naphthaleneacetic acid (NAA) を用い、BA の濃度を 0 および 0.1 mg/l とし、このそれぞれに NAA の濃度 0, 0.01, 0.1 および 1.0 mg/l を組み合わせた 8 区を設定した。

3. 培養法: さきに述べた組織片を 1 容器あたり 3 個ずつ置床し、25°C 暗所で 16 週間培養した。植込み数は各区とも 10 フラスコで 30 組織片とした。

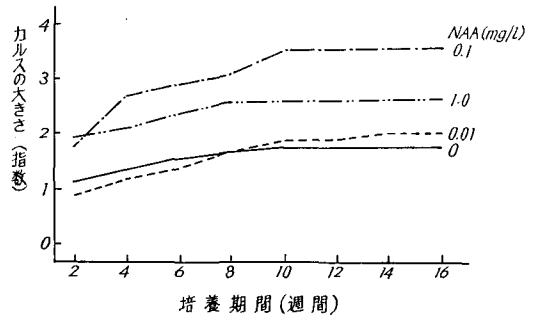
結 果

実験 1. 10~15 cm 程度に伸長した新梢からとった (6月16日採取) 組織片におけるカルスの形成と器官分化

(1) カルスの形成: カルスの形成は 1 週間後より始まり、各区とも 4~6 週間で形成率が 100% に達した (第 2 表)。カルスの生長の経時的変化は第 1 図および第 2 図のとおりで各区とも 8~10 週間でほとんどの生長が停止した。各区の比較では BA 無添加および BA 0.1 mg/l で NAA 0.1 mg/l の 2 区において生長が最も良好で、ついで BA 無添加・NAA 1.0 mg/l, BA 0.1 mg/l・NAA 1.0 mg/l および BA 無添加・NAA 0.01 mg/l の順であった (第 3 図および図版 I-1)。



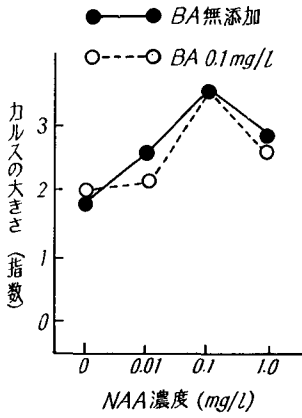
第1図 BA 無添加区におけるカルス生長の経時的変化 (6月16日置床)



第2図 BA 0.1 mg/l におけるカルス生長の経時的変化 (6月16日置床)

以上のことからカルスの生長に適する NAA の濃度は 0.1 mg/l 付近であると思われる。また BA の影響はほとんど認められず、BA および NAA が無添加でもカルスの形成が可能なのことがわかった。

(2) 根の分化: 根の分化は、BA 無添加・NAA 0.01 mg/l 区では 4 週間目より始まり、培養 8 週間で 54.2% の発根率となった。BA 0.1 mg/l・NAA 0.01 mg/l 区で



第3図 カルスの生長に及ぼすBAおよびNAAの影響
(6月16日置床, 16週間培養)

は6週間目より始まり, 16週間で95.2%の発根率を示した(第3表)。その他の区では, BAおよびNAA無添加ならびにBA 0.1 mg/l, NAA無添加の2区で1個体に発根がみとめられたにすぎなかった。カルスの生長のよいBA無添加・NAA 0.1 mg/lならびにBA 0.1 mg/l・NAA 0.1 mg/l区では16週間後においても根の分化が見られなかった(第4図)。

BA無添加・NAA 0.01 mg/lならびにBA 0.1 mg/l・NAA 0.01 mg/l区では8 cm程度に伸長した根もみられた(第3表)。なお, 分化した根は組織片の維管束の部分から発生していることがみとめられた。

実験2. 40~50 cm程度に伸長した新梢(7月29日採取)からとった組織片におけるカルスの形成と器官分化

(1) カルスの形成: カルスの形成は, 早いものでは置床1週間後より始まり, BA, NAAともに無添加の区を除く各区で4~10週間後に100%またはそれに近い形

第3表 6月16日採取材料におけるカルスの形成と発根 (培養16週間)

生長調節物質		調査組織片数	カルスの大きさ*	発根組織片数	発根率 (%)	発根始期 (週間)	平均組織片あたり発根数 (本)	平均根長 (cm)	最大根長 (cm)
BA (mg/l)	NAA (mg/l)								
0	0	18	1.8	1	5.5	8	1.0	0.8	0.8
0	0.01	24	2.5	13	54.2	4	1.4	1.4	8.4
0	0.1	30	3.5	0	0	—	—	—	—
0	1.0	27	2.9	0	0	—	—	—	—
0.1	0	21	2.0	1	4.8	16	1.0	0.6	0.6
0.1	0.01	21	2.2	20	95.2	6	4.6	2.6	8.0
0.1	0.1	27	3.5	0	0	—	—	—	—
0.1	1.0	27	2.6	0	0	—	—	—	—

* カルスの大きさはつぎの指数で表した

0: カルスを形成せず 0.1: わずかにカルス形成 0.5: 米粒大
1.0: 小豆粒大 2.0: 大豆粒大 3.0: 大福豆粒大

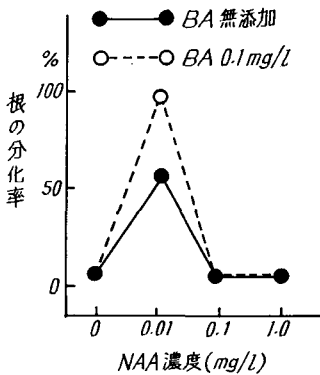
第4表 カルス形成率の経時的変化 (7月29日採取の材料)

生長調節物質		調査組織片数	培養期間 (週間)					
BA (mg/l)	NAA (mg/l)		2 (%)	4 (%)	6 (%)	8 (%)	10 (%)	12 (%)
0	0	15	18.5	29.6	29.6	29.6	29.6	40.0
0	0.01	24	75.0	83.3	83.3	87.5	95.8	95.8
0	0.1	24	95.8	100	100	100	100	100
0	1.0	24	75.0	95.8	100	100	100	100
0.1	0	24	79.1	91.6	95.8	95.8	100	100
0.1	0.01	15	90.4	95.2	94.4	100	100	100
0.1	0.1	24	87.5	95.8	100	100	100	100
0.1	1.0	18	90.4	95.2	100	100	100	100

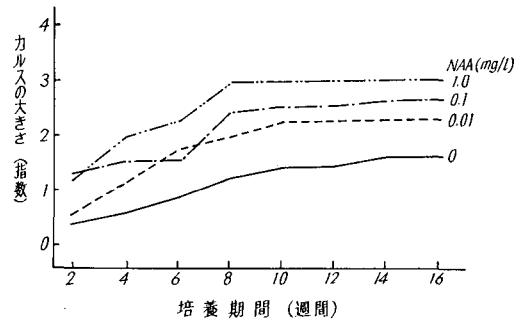
第5表 7月29日採取材料におけるカルスの形成と発根 (培養16週間)

生長調節物質		調査組織片数	カルスの大きさ*	発根組織片数	発根率 (%)	発根始期 (週間)	平均組織片あたり発根数 (本)	平均根長 (cm)	最大根長 (cm)
BA (mg/l)	NAA (mg/l)								
0	0	15	0.8	0	0	—	—	—	—
0	0.01	24	2.2	6	25.0	10	1.8	0.9	2.0
0	0.1	24	3.5	0	0	—	—	—	—
0	1.0	24	3.0	2	8.3	8	2.5	1.2	1.5
0.1	0	24	1.7	4	16.6	10	1.8	1.2	2.5
0.1	0.01	15	2.2	5	33.3	10	2.8	2.8	5.5
0.1	0.1	24	2.6	0	0	—	—	—	—
0.1	1.0	18	2.9	0	0	—	—	—	—

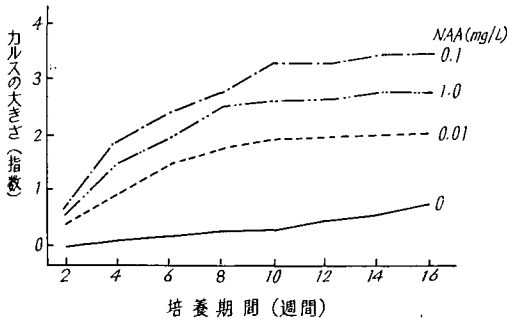
* 指数は第3表と同じ方法による



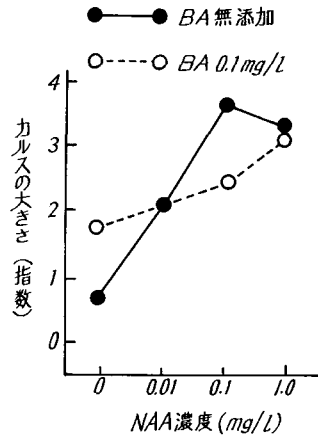
第4図 根の分化に及ぼすBAおよびNAAの影響 (6月16日置床, 16週間培養)



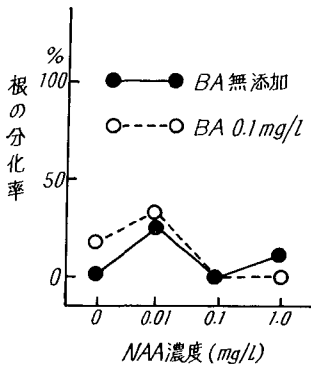
第6図 BA 0.1 mg/lにおけるカルスの生長 (7月29日置床)



第5図 BA 無添加におけるカルスの生長 (7月29日置床)



第7図 カルスの生長に及ぼすBAおよびNAAの影響 (7月29日置床, 16週間培養)



第8図 根の分化に及ぼすBAおよびNAAの影響 (6月16日置床, 16週間培養)

成率になった。ただBA, NAA無添加の区のみカルスの形成が著しく劣り, 16週間後で40%であった(第4表)。

カルスの生長の経時的変化は第5, 6図のとおりで, 6月16日採取の材料と同じく8~10週間後までの生長が顕著で, それ以降はほとんど停止した区が多い。カルスの生長はBA無添加・NAA 0.1 mg/l区において最もよく, ついでBA無添加・NAA 1.0 mg/l区, BA 0.1 mg/l・NAA 1.0 mg/l区ならびにBA 0.1 mg/l・NAA 0.1 mg/l区の順であった(第7図)。

以上のことからカルスの生長に適するNAAの濃度は, BA無添加の場合に0.1 mg/l付近であることは実験1と同様であるが, BAを0.1 mg/l添加した場合は1.0 mg/lかそれ以上の濃度となり, 実験Iの場合と異なる。また, 生長調節物質無添加の場合もカルスの形成がみとめられたが, 形成率は40%にとどまり, 生長量も実験1の場合より小さかった。

(2) 根の分化: カルスからの根の分化は, BA無添加・NAA 0.01 mg/l区では10週間目より始まり, 14週間で25.0%の発根率を示し, BA無添加・NAA 1.0 mg/l区では8週間目に2個体に発根したが, 同じ区他の個体からは16週間目においても分化はみられなかった。BA 0.1 mg/l・NAA無添加区では10週間目より根の分化が始まったが, 培養16週間で16.6%の発根率であった。また, BA 0.1 mg/l・NAA 0.01 mg/l区では10週間目より根の分化がみとめられ, 16週間目で33.3%の発根率を示した(第5表, 第8図)。カルス形成率の良好なBA無添加・NAA 0.1 mg/l区ならびにBA 0.1 mg/lでNAA 0.1または1.0 mg/lの区では根の分化はみられなかった。

分化した根の長さは, BA 0.1 mg/l・NAA 0.01 mg/l区で最長5.5 cm, BA 0.1 mg/l・NAA無添加区では2.5

cmに達した。

考 察

ブドウ新梢の組織片を培養し, カルスの形成と器官分化におよぼす生長調節物質の影響について実験を行なった結果, cytokinin (BA), auxin (NAA)等の生長調節物質を培地に添加しなくてもカルスの形成が可能ことが明らかとなった。またこの場合, カルスの形成率および生長量は新梢の採取時期によって異なり, 萌芽初期に採取した材料の方がカルスの形成率が高く, 生長も良好であった。

植物組織片の培養において cytokinin を含まない培地でカルスが形成された例はかなりの多いが^{2,5,13,14}, auxinを除いた培地でもカルスが形成されたという報告は極めて少なく, auxinは必須成分として加えられることが多い^{1,4,5,7~13}。この意味においてブドウを用いて行なった本実験の結果は大変興味深い。すなわち, ブドウの萌芽し始めた若い新梢にはカルス形成を誘起し得る cytokinin と auxin が内在し, それら生長調節物質の濃度は新梢の伸長にともなって変化するものと考えられる。内生の cytokinin については最近多くの植物でみとめられ, ブドウの根からとった溢液にも cytokinin が含まれていることが報告されている⁶。

実験1および2にみられるように適量のBAとNAAを培地に添加した区においてカルスの生長が良好であったことから, 最初のカルス形成には新梢組織内に内在する cytokinin および auxin で十分であってもその旺盛な生長を持続させるには外部から更に取り込むことが必要であるものと解される。カルスの生長に対するNAAの最適濃度は, 実験1においては0.1 mg/lで, BAの効果は全くみとめられなかったが, 実験2においては, BA無添加の場合に0.1 mg/lであったのに比べ, BA 0.1 mg/l添加した場合は1.0 mg/lであった。このように, BAを添加することによりカルスの生長のためのNAAの最適濃度が高くなる例は他の植物(例えばアスパラガス, バレイショ)においてもみとめられており, カルスの生長に対して cytokinin と auxin が何らかの相互作用をもつことを示すものと考えられる。

小崎⁹)はブドウの組織培養における auxin と kinetin の影響を調べた結果, カルスの形成は休眠芽, 休眠芽基部の若い組織, および新梢節間部などの若い組織を用いた場合によくみられ, auxin, kinetin とも比較的高濃度のときに盛んになる傾向がみとめられたと報告している。また, 分離移植されたカルスの増殖は, 初期には auxin および kinetin が高濃度のとき盛んであるが, 継代培養

をくり返したカルスの増殖に対する最適培地は、継代培養初期の最適培地と異なり、auxin および kinetin については比較的低い濃度が適していたと報じている。

つぎに本実験における新梢組織片からの不定根の形成をみると実験1および2とも NAA 0.01 mg/l 単用区および BA 0.1 mg/l・NAA 0.01 mg/l 区で多くみられ、このうち最大根長を示したものでは、主根と無数の根毛を生じ根としての機能を有していた。前述の小崎の実験では、新梢節間部を輪切りにした組織片からの不定根の形成は比較的容易であり、auxin (NAA) は 0.1-1.0 ppm で効果がみられ、kinetin は 0.1 ppm でやや効果が大きかったが、kinetin 無添加でも発根したと報告している。この濃度は本実験の結果よりもやや auxin が高濃度である。

また、NAA と BA が無添加でも実験1のように5%前後の発根率を示していることから、前述のようにブドウの新梢組織内に cytokinin および auxin などの生長調節物質が内在し、これがブドウを挿木した場合に発根が容易であることの一つの要因になっているとも考えられる。内生の cytokinin については最近多くの植物でみとめられ、ブドウの蔓の基部を切断してとった根からの溢液にも cytokinin 活性がみとめられたことが SKE-NE⁶⁾ により報告されている。これら内生の cytokinin や auxin などの生長調節物質の时期的消長が検討できれば、発根機構についても更に明確になってくると考えられ、今後の研究に期待されるところが大きい。

なお、本実験において全期間を通じて茎葉の分化はみられなかったが、今後採取時期、品種、培地組成、光条件などさらに詳細な検討を加える予定である。

摘 要

ブドウ 'Campbell early' (30年生) の新梢を用いて組織片からのカルス形成と器官分化におよぼす生長調節物質の影響について調べた。6月16日および7月29日に新梢を採取し、厚さ1mmの円盤状の組織片を作り、種々の濃度の6-benzyladenine (BA) と NAA を含む Murashige and Skoog 培地で培養した。培養条件は 25°C 暗所とした。観察結果を要約するとつぎのとおりである。

1. 生長調節物質 (BA および NAA) を含まない培地においてもカルス形成がみとめられた。この場合のカルスの生長は萌芽初期の新梢からとった組織片において大きかった。このことからブドウ新梢にはカルスの誘導に十分な量の cytokinin と auxin を含むものと解され、その濃度は7月になると低下するものと考えられる。

2. カルスの生長は、萌芽初期 (6月16日) の新梢組織片を用いた場合には BA の濃度にかかわらず NAA 0.1 mg/l において最もよかったが、7月29日の新梢組織片では、BA の有無によって最適濃度が異なった。すなわち、BA 無添加の場合 NAA 0.1 mg/l においてカルスの生長が最もよく、BA 0.1 mg/l を添加した場合は NAA 1.0 mg/l において最もよかった。

3. 根は、いずれの場合も NAA 0.01 mg/l においてよく分化した。最高の分化率は95%で萌芽初期の新梢組織片を BA 0.1 mg/l, NAA 0.01 mg/l を含む培養基上で培養した場合にみとめられた。7月29日採取の材料では最高分化率34%で、生長調節物質の濃度は上と同じであった。

4. 本実験においては、いずれの場合にも茎葉の分化はみとめられなかった。

引用文献

- 1) CAREW, D. P. and A. E. SCHWARTING 1958. Production of rye embryo callus. Bot. Gaz. **119**: 237-239.
- 2) GAUTHERET, R. J. 1966. Factors affecting differentiation of plant tissues grown in vitro. In "Cell differentiation and morphogenesis". North Holland Pub. Co. Amsterdam pp. 55-95.
- 3) 小崎 格 1968. ブドウの組織培養におよぼすオーキシンとカイネチンの影響. 昭和43年度園芸学会秋季大会研究発表要旨, pp. 20-21.
- 4) NORSTOG, K. J. 1956. Growth of rye-grass endosperm in vitro. Bot. Gaz. **117**: 253-259.
- 5) OKAZAWA, Y., N. KATSURA and T. TAGAWA. 1967. Effects of auxin and kinetin on the development and differentiation of potato tissue cultured in vitro. Physiol. Planta. **20**: 862-869.
- 6) SKENE, K. G. M. and G. H. KERRIDGE. 1967. Effect of root temperature on cytokinin activity in root exudate of *Vitis vinifera* L. Plant physiol. **42**: 1131-1139.
- 7) STEINHART, C. E. 1962. Tissue cultures of a Cactus, Science **137**: 545-546.
- 8) STEWARD, F. C., M. O. MAPES and K. MEARS, 1958. Growth and organized development of cultured cells I. growth and division of freely suspended cells. Amer. J. Bot. **45**: 693-703.
- 9) ———— and ———— 1958. Growth and organized development of cultured cells II. Organization in cultures grown from freely suspended cells. Amer. J. Bot. **45**: 705-708.

- 10) STRAUS, J. and C. D. LARUE. 1954. Maize endosperm tissue grown in vitro I. Culture requirements. *Amer. J. Bot.* **41**: 687-694.
- 11) ———. 1960. Maize endosperm tissue grown in vitro III. Development of a synthetic medium. *Amer. J. Bot.* **47**: 641-647.
- 12) WEST, F. R. and E. S. MIKA. 1957. Synthesis of atropine by isolated roots and root-callus cultured of belladonna. *Bot. Gaz.* **119**: 50-54.
- 13) 八鍬利郎・原田 隆・嵯峨紘一・志賀義彦 1971. アスパラガスの形態形成に関する研究 (第1報). 組織培養法による若茎柔組織からのカルス形成. *園学雑*, **40**: 230-236.
- 14) 山田康之 1967. 植物におけるカルス誘導と組織培養. *植物の化学調節*, **2**(1): 7-14.

Summary

Experiment on the effect of growth regulators (auxin and cytokinin) on callus and organ formation from the tissue of grape shoots was carried out using 'Campbell early' grape tree (30-year-old).

Disk-shape segments, which were cut from the spring shoots in 1 mm thickness on June 16th and July 29th, were cultured aseptically on Murashige and Skoog's medium containing various concentrations of 6-benzyladenine (BA) and α -naphthaleneacetic acid (NAA), 20 g/l sucrose and 7 g/l agar.

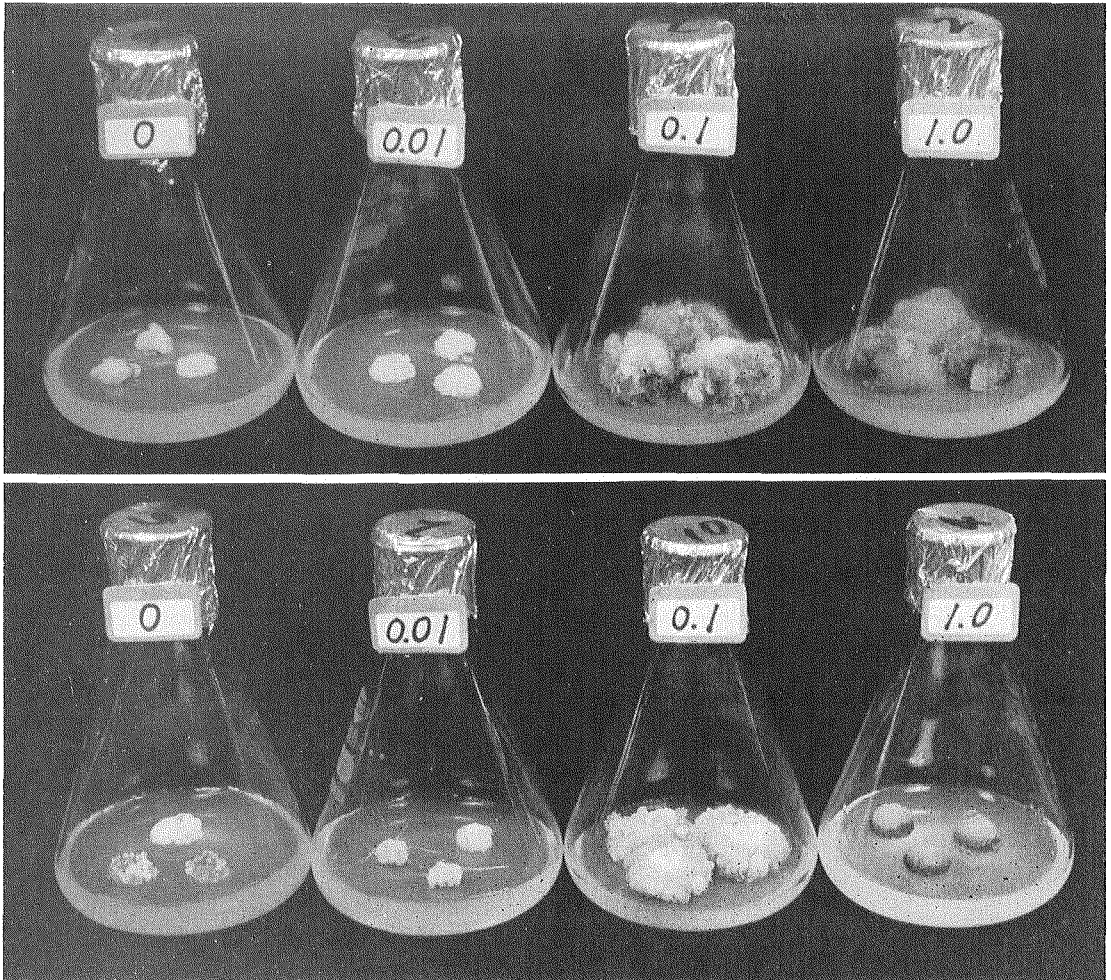
The cultures were kept in a dark room maintained at 25°C. The experimental results are summarized as follows:

1) Callus formation was promoted even in medium without both BA and NAA. In this case, callus growth was better in the culture of segments from shoots collected on June than that on July. Therefore, it would seem reasonable to consider that a sufficient amount of endogenous cytokinins and auxins to induce callus were contained in the spring shoot of grapes in June, and that this changed into an insufficient amount in July.

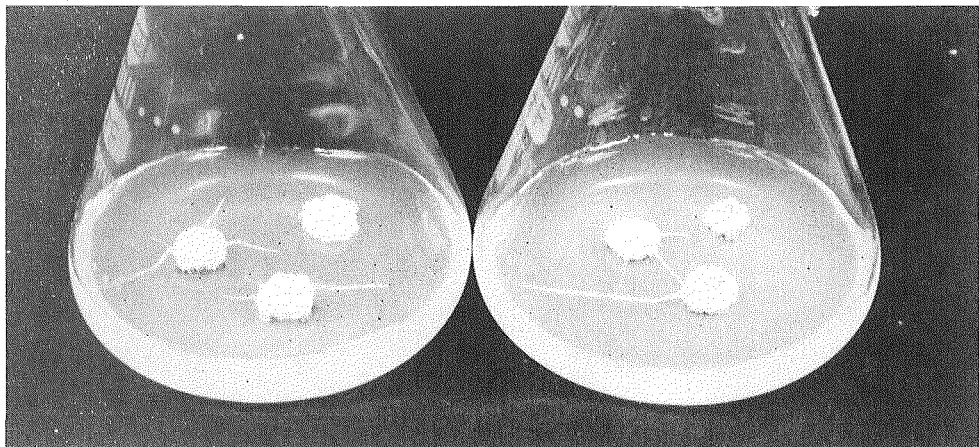
2) Callus growth in the segments from the early collected shoots (June 16th) was best at 0.1 mg/l of NAA regardless of BA. In the case of segments collected on July 29th, however, the optimum concentration of NAA for callus growth shifted, depending upon the presence or absence of BA in the medium. Namely, in the case of absence of BA, callus growth was best at 0.1 mg/l of NAA, but when the concentration of BA was 0.1 mg/l, the best callus growth was observed at 1.0 mg/l NAA.

3) Root formation was good at 0.01 mg/l of NAA regardless of BA. The highest percentage of root formation (segments forming roots) was 95% at 0.01 mg/l of NAA and 0.1 mg/l of BA in the culture of segments cut from the early-collected shoot. In the case of segments prepared on July 29th, the highest percentage of root formation was 34% at 0.01 mg/l of NAA and 0.1 mg/l of BA.

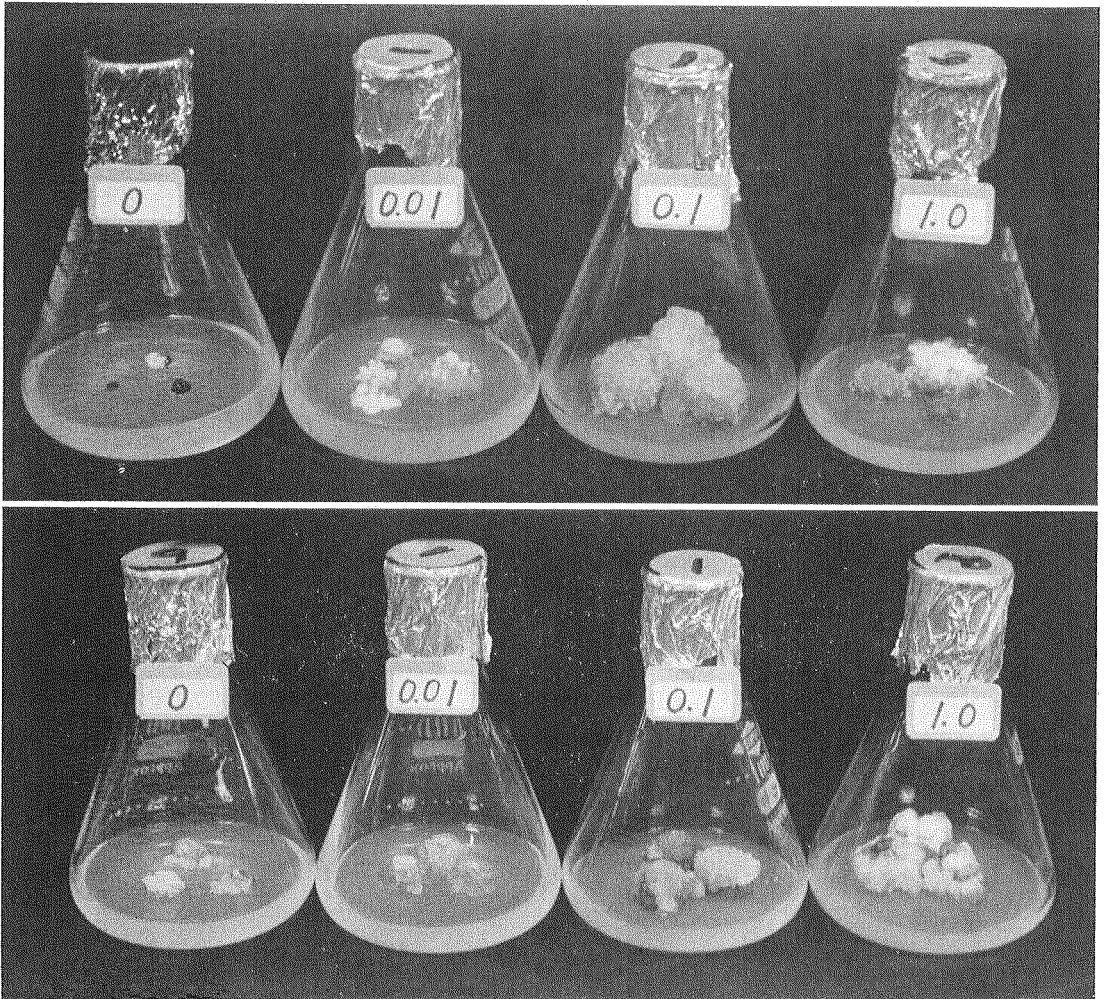
4) There was no shoot formation in any of the flasks in this experiment.



1. 6月16日採取材料におけるカサの形成と根の分化
 上段: BA 無添加, 下段: BA 0.1 mg/l,
 ラベルの数値は NAA の濃度 (mg/l) を示す (培養 10 週間)



2. ブドウ新梢組織片からの発根の状況 (培養 10 週間)
 左: BA 無添加, NAA 0.01 mg/l 右: BA 0.1 mg/l, NAA 0.01 mg/l



3. 7月29日採取材料におけるカサの形成と根の分化
上段：BA 無添加， 下段：BA 0.1 mg/l，
ラベルの数値は NAA の濃度 (mg/l) を示す (培養8週間)