



Title	園芸植物の栄養繁殖に関する基礎的研究 : (第5報) クロミノウグイスカグラの茎頂培養
Author(s)	鈴木, 卓; SUZUKI, Takashi; 稲川, 裕 他
Citation	北海道大学農学部邦文紀要, 15(1), 104-110
Issue Date	1986-03-31
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/12053
Type	departmental bulletin paper
File Information	15(1)_p104-110.pdf



園芸植物の栄養繁殖に関する基礎的研究

(第5報) クロミノウグイスカグラの茎頂培養

鈴木 卓・稲川 裕

原田 隆・八鍬利郎

(北海道大学農学部果樹・蔬菜園芸学教室)

今 河 茂

(北海道大学農学部附属農場)

(昭和61年1月10日受理)

Basic Studies on the Vegetative Propagation of Horticultural Plants

V. *In vitro* culture of leaf bud apices of *Lonicera caerulea* L. var. *emphylocalyx* NAKAI

Takashi SUZUKI, Yutaka INAGAWA, Takashi HARADA
and Toshiro YAKUWA

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

Shigeru IMAKAWA

(Experiment Farms, Faculty of Agriculture,
Hokkaido University, Sapporo, Japan)

緒 言

クロミノウグイスカグラ (俗称ハスカップ) (*Lonicera caerulea* L. var. *emphylocalyx* NAKAI) は、北海道の原野に自生しているスイカズラ科の多年生植物であるが、最近ジャムなどの加工用原料として果実の需要が急激に増大し、新しい小果樹として注目されている。クロミノウグイスカグラは、一般には挿木などにより増殖されているが、果樹の増殖法の一つとして、すでにリンゴなど数種の作物^{1,6,8,12,17)}で、茎頂培養法による大量増殖が実用化されており、クロミノウグイスカグラについてもこの方法を適用することの適否について検討することは有意義であると考えられる。また、筆者らは遺伝子源保存の立場から、各作物について茎頂を用いた凍結保存技術⁷⁾の確立を目指しており、この意味からも凍結・融解後の個体再生の過程である茎頂培養法を、多くの作物について確立しておくことは大変重要である。以上のことから、本研究は、クロミノウグイスカグラの栄養繁

殖法を確立するための基礎的知見を得る目的で行ったものである。

材料及び方法

I. 茎頂の生長に及ぼす諸条件の検討

実験材料として、北海道大学農学部附属農場に栽植されているクロミノウグイスカグラ10株を用い、7月13日又は10月4日に任意に採取した枝の腋生の葉芽から、茎頂(横径1mm、葉原基4個程度を有するもの)を無菌的に取り出し、口径20mmの試験管内で培養した。材料の調製は以下のようにして行った。すなわち、枝を各節ごとに切断し、樹皮と外側のりん片2~3枚を除去した後、70%エタノールで数秒間、次に次亜塩素酸ナトリウム溶液(有効塩素1%)で約10分間表面殺菌を行った。その他の方法については以下に示すとおりである。

1. 茎頂の生長に及ぼす培地のpH及びNAA濃度の影響

培地の無機塩類、アミノ酸及びビタミンなどの組成

は、MURASHIGE と SKOOG の処方に従い、しょ糖 30 g/l と NAA を Fig. 2 に示す濃度で添加した。この 4 水準の NAA 濃度と組み合わせ、Fig. 1 に示す pH の 3 水準を設定した。培地は、口径 20 mm の試験管に 10 ml ずつ分注した。また、pH が低いと寒天が固まらないため、培地は液体培地とし、ペーパーウィック法により、ろ紙でブリッジを作製し、その上に材料を置床した。調製した培地は、アルミホイルで封をした後、120°C、1.1 kg/cm² で約 10 分間加圧滅菌した。

2. 茎頂の生長に及ぼす BA 及び 2iP 濃度の影響

MS 培地に、しょ糖 30 g/l、寒天 7 g/l 及び BA と 2iP を各々単独に Fig. 3 に示す濃度で添加し、pH を 5.5 に調整した。分注や滅菌の方法は 1 に準じた。

3. 茎頂の生長に及ぼす GA₃ 濃度の影響

MS 培地に、しょ糖 30 g/l、寒天 7 g/l、BA 10⁻⁶M 及び GA₃ を Fig. 4 に示す濃度で添加し、pH を 5.5 に調整した。分注や滅菌の方法は 1 に準じた。

培養は、各実験とも 25°C、1 日 16 時間照明 (白色蛍光灯、約 4,000 lx) の条件下で行い、1 区当たりの組織片数は 15 とした。植え込みから 4 週間後に、展葉数、最大葉長、シュートの形成及びカルスの形成の各項目について調査を行い、シュートの形成が認められた個体については、シュートの本数及び長さについても、あわせて調査した。

II. シュートの発根条件の検討

I の実験において伸長したシュート (数節を有する) から節部切片 (約 5 mm、1 節を有する) をとり、BA 10⁻⁶M 及び GA₃ 10⁻⁶M を添加した培地で培養して節部からシュートを発生させ (1 節から 1~3 本)、多数のシュートを得た。つぎに、これらのシュートを基部から切り取り、基部を寒天培地に差し込むようにして植え込んだ。

培養は、MS 培地にしょ糖 30 g/l、寒天 7 g/l を加え pH を 5.5 に調整したのみの生長調節物質無添加の培地と、IBA を 1、3 及び 10 mg/l 添加した 4 区で行った。植え込みに用いたシュート数は、1 区当たり 10 本とし、25°C、1 日 16 時間照明 (白色蛍光灯、約 4,000 lx) で 1 か月間培養した。

結果及び考察

I. 茎頂の生長に及ぼす諸条件の検討

1. 茎頂の生長に及ぼす培地の pH 及び NAA 濃度の影響

Fig. 1 と Fig. 2 に茎頂の生長に及ぼす pH 及び NAA の影響を示した。両図から、茎頂の生存率は試験

区の pH や NAA 濃度の範囲内では常に 80% 以上の高い値を示した。しかし、茎頂の生長はほとんど認められず、展葉数と最大葉長はともに低い値となった。したがって、茎頂の生存は比較的広い範囲の pH 及び NAA 濃度で可能であるが、オーキシンは茎頂の生長にほとんど影響を及ぼさないものと考えられる。

2. 茎頂の生長に及ぼす BA 及び 2iP 濃度の影響

Fig. 3 に茎頂の生長に及ぼす BA 及び 2iP の影響を示した。図中に生存率は示していないが、各区ともに 80% 以上の高い値であった。展葉数と最大葉長については、BA、2iP を添加した区で無添加区と比べ高い値を示し、ダンカンの多重検定 5% 水準で無添加区の平均値との間に有意差が認められた。また、シュート形成率については、BA や 2iP の濃度との間に一定の傾向は認められなかったが、BA や 2iP を添加することにより、シュートの形成が促進されることがわかった。このことは、茎頂の生長やシュートの増殖に BA や 2iP などのサイトカイニンが必要であるとする他の多くの果樹 (リンゴ^{9,12,13,16}、ブドウ^{2,5,8,10,14}、ブラックカラント^{3,18}、ラズベリー^{15,17}、ブラックベリー¹、プルナス属^{4,6}) の結果と一致した。しかし、リンゴやブドウなどでは BA 1~2 mg/l がシュート形成に適しているのに対し、本実験の結果では 10⁻⁷~10⁻⁵ M とかなり広い範囲でシュート形成が認められ、適濃度は明らかではなかった。

つぎに、カルス形成率をみると、2iP は BA に比べ茎頂からカルスを形成させる作用が強く、濃度が高まるにつれてその効果が顕著となり、2iP の高濃度区では 80% 近い組織片にカルスの形成が認められた。これらのことから、サイトカイニンは茎頂からのシュートの形成を促進するが、カルスの形成も促進しやすいという作用性をもつことがわかった。また、BA はカルスの形成を促進しやすい 2iP に比べ、クロミノウグイスカグラの茎頂培養に適していると考えられる。

3. 茎頂の生長に及ぼす GA₃ 濃度の影響

2 においてサイトカイニンの影響について検討した結果、BA 10⁻⁶M の濃度区で比較的良好なシュートの形成が認められ、しかもカルスの形成が比較的少なかったため、茎頂の生長に及ぼす GA₃ 濃度の影響は、培地に BA 10⁻⁶M を添加した条件で検討した。その結果を Fig. 4 に示した。図中に生存率は示していないが、各区ともに 80% 以上の高い値であった。展葉数と最大葉長については、ともに GA₃ の中・高濃度区で無添加区と比べ高い値を示した (ダンカンの多重検定 5% 水準で無添加区の平均値との間に有意差が認められた)。また、シュエ

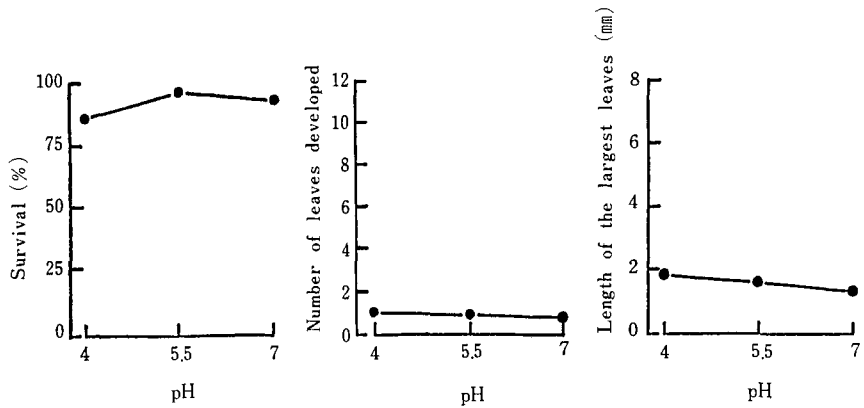


Fig. 1. Effect of pH on growth of leaf bud apices cultured *in vitro*. Sampling date: Jul. 13. Data are obtained after 4 weeks of culture.

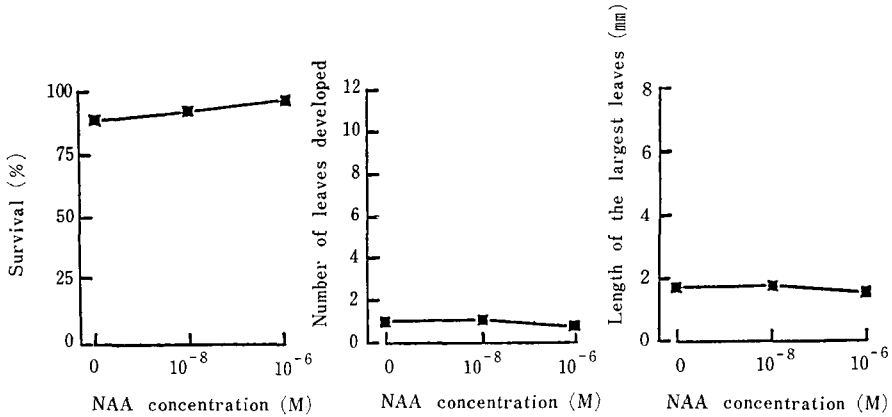


Fig. 2. Effect of NAA on growth of leaf bud apices cultured *in vitro*. Sampling date: Jul. 13. Data are obtained after 4 weeks of culture.

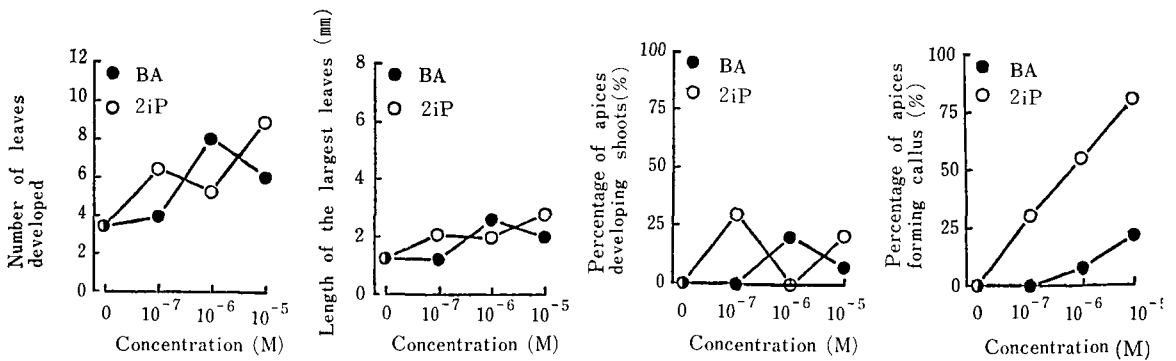


Fig. 3. Effect of cytokinins on growth of leaf bud apices cultured *in vitro*. Sampling date: Oct. 4. Data are obtained after 4 weeks of culture.

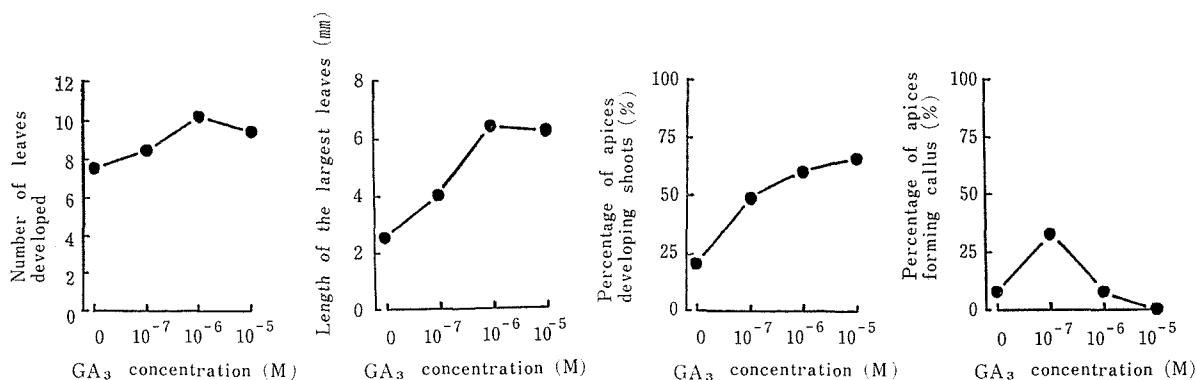
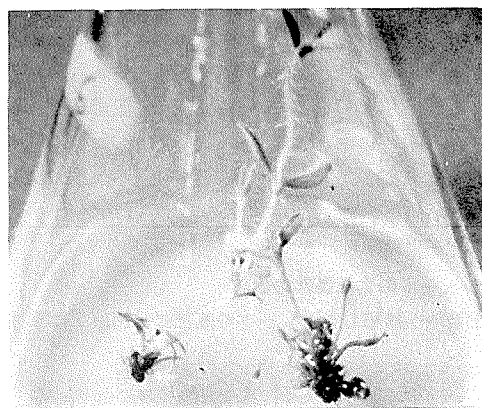


Fig. 4. Effect of GA₃ on growth of leaf bud apices cultured *in vitro*. Sampling date: Oct. 4. BA (10⁻⁶ M) are added uniformly to all media. Data are obtained after 4 weeks of culture.



[A]



[B]

Fig. 5. A: Multiple shoot development from a leaf bud apex after 4 weeks of leaf bud culture.
B: A long shoot elongating from a leaf bud apex after 2 months of leaf bud culture.
Culture media contain BA (10⁻⁶ M) and GA₃ (10⁻⁶ M) uniformly.

ト形成率は、GA₃濃度が高まるに従って増加し、GA₃高濃度区では70%近くの個体にシュート形成が認められた。

他の果樹でも、ラズベリー¹⁵⁾、ブラックベリー¹⁾などではBAと一緒にGA₃を0.1 mg/l程度の濃度で添加すると、シュートの形成が良好になることが報告されている。しかし、本実験の場合、GA₃の10⁻⁶~10⁻⁵ M (約0.35~3.5 mg/l)と高い濃度を必要としており、クロミノウグイスカグラでは他の果樹に比べシュートの形成に対するジベレリンの関与が大きいものと考えられる。

Fig. 5には、形成されたシュートの形状を示した。当初、

組織は叢状を呈したが(Fig. 5-A)、その後長いシュートを形成した(Fig. 5-B)。一方、カルス形成率は、シュート形成率とは反対に、GA₃濃度が高まるにつれて低下した。

Fig. 6にシュート形成個体における平均シュート数と平均シュート長に及ぼすGA₃の影響を示した。組織片1個から形成された平均シュート数はGA₃の低濃度又は無添加の場合1本であったが、GA₃ 10⁻⁶ Mでは平均1.5本近くに増加し、さらに高濃度の10⁻⁵ Mでは1.1本に減少した。

茎頂培養による大量増殖を考える場合、増殖率が問題になるが³⁾、本実験で増殖率を考える限り、BA 10⁻⁶ M

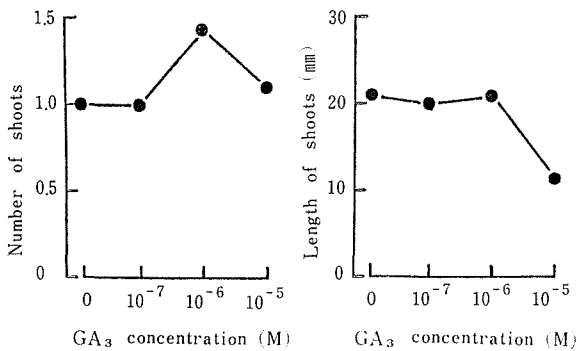


Fig. 6. Effect of GA₃ on the number and length of shoots developed in the *in vitro* culture of leaf bud apices. BA (10⁻⁶ M) are added uniformly to all media. Data shows the average per shoot-forming culture after 4 weeks of culture.

の存在下で GA₃ 10⁻⁶ M 程度が至適濃度であろうと考えられる。一方、各培養体中の最大シュートの平均シュート長は、GA₃ の中・低濃度あるいは無添加で 20 mm 以上の値を示したのに対し、GA₃ 高濃度区では 10 mm 近くの低い値を示し、この結果からも GA₃ 10⁻⁶ M が適することが裏付けられる。

II. シュートの発根条件の検討

発根培地へ移植したシュートの基部に、Fig. 7 に示す

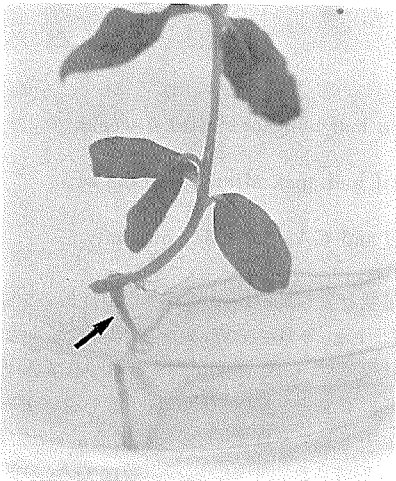


Fig. 7. Root differentiation on a shoot which is obtained in the culture of nodal segments derived from shoots in leaf bud culture, and cultured for one month on media with 1 mg/l of IBA.

ような根の分化が認められた。しかし、発根個体数は各区とも 10 個体中 2 個体と少なかった。根の分化は生長調節物質無添加の培地で培養後 2 週間目に観察されたのに対し、IBA を添加した培地では培養後約 1 か月経過してから観察された。

なお、寒天培地は通気性が悪いいため、根の分化や伸長が悪いとする報告があり¹¹⁾、SNIR¹⁷⁾ はラズベリーのシュートをベリットと呼ばれる培養基に直接挿木することにより 100% 近い発根率を得ている。本実験で、生長調節物質無添加の培地でも発根したことから考えると、クロミノウグイスカグラの発根能力は、本来高いものと考えられるので、今後通気性の問題をはじめ、培地の改良などにより、さらに好適な発根条件について検討する予定である。

摘 要

クロミノウグイスカグラ (俗称ハスカップ) (*Lonicera caerulea* L. var. *emphylocalyx* NAKAI) の腋生の葉芽から取り出した茎頂 (横径 1 mm, 葉原基 4 個程度を有するもの) を培養し、器官形成に及ぼす pH の影響並びにオーキシン (NAA), サイトカイニン (BA, 2iP), ジベレリン (GA₃) の濃度について検討した。培養基は、MURASHIGE と SKOOG の培地に、しよ糖 30 g/l, 寒天 7 g/l 及び生長調節物質を種々の濃度で添加したものをを用いた。pH の検討では寒天を添加せず、ペーパークロマト法を用いた。培養は、25°C, 4,000 lx, 1 日 16 時間照明の条件下で行った。結果の概要は以下のとおりである。

1. pH 4~7 の範囲で茎頂の生存率は非常に高く、80% 以上の値を示した。しかし、この場合、培地に NAA を種々の濃度で添加しても、茎頂の生長はほとんど認められなかった。

2. 培地に BA あるいは 2iP を添加した場合、各々 10⁻⁶ と 10⁻⁵ M の区で、葉数と最大葉長の増加が認められた。同時に、シュートを形成する個体も出現した。

3. サイトカイニン濃度が高まるにつれ、茎頂からカルスが形成される割合は増加した。2iP は BA に比べ、カルス形成を促進する能力が著しく高く、2iP 10⁻⁵ M の区では、80% 近くの個体にカルスの形成が認められた。したがって、茎頂培養には、2iP より BA の方が適していると考えられた。

4. BA 10⁻⁶ M を添加した培地で、GA₃ の濃度を変化させた場合、GA₃ 10⁻⁶ と 10⁻⁵ M の区で、葉数と最大葉長の増加が認められた。また、GA₃ 濃度が高まるに従

いシュート形成率は著しく高まり、 GA_3 10^{-5} M の区では、70% 近くの個体にシュートの形成が認められた。一方、カルス形成率は GA_3 濃度が高まるにつれて低下した。

5. 茎頂1個から形成される平均シュート数は、 GA_3 10^{-6} M で最も多く1.5本程度であったが、さらに高濃度の 10^{-5} M になると少なくなった。また平均シュート長も、 GA_3 10^{-6} M 以下では20 mm 以上の値を示したが、 10^{-5} M になると10 mm 程度と短くなった。したがって、シュートの形成については、 GA_3 の至適濃度は 10^{-6} M 前後ではないかと考えられた。

6. 伸長したシュートを生長調節物質無添加あるいは低濃度の IBA (1~10 mg/l) を含む培地へ移植した場合、発根する個体が認められた。発根条件等については今後検討する予定である。

引用文献

1. BABIĆ, V. and NESKOVIĆ, M.: Propagation of three blackberry cultivars from small apical buds *in vitro*, *J. Hort. Sci.*, **59**(2): 183-185. 1984
2. BARLASS, M. and SKENE, K. G. M.: Studies on the fragmented shoot apex of grapevine. II. Factors affecting growth and differentiation *in vitro*, *J. Exp. Bot.*, **31**(121): 489-495. 1980
3. FLEGMANN, A. W. and WAINWRIGHT, H.: Shoot doubling time: a quantitative parameter for characterizing shoot cultures *in vitro*, *Plant Cell Tissue Organ Culture.*, **1**: 85-92. 1981
4. GARLAND, P. and STOLTZ, L. P.: Micropropagation of pissardi plum, *Ann. Bot.*, **48**: 387-389. 1981
5. GOUSSARD, P. G.: Morphological responses of shoot apices of grapevine cultured *in vitro*. Effects of cytokinins in routine subculturing, *Vitis*, **21**: 293-298. 1982
6. HAMMERSCHLAG, F.: Factors influencing *in vitro* multiplication and rooting of the plum rootstock myrobalan (*Prunus cerasifera* EHRH.), *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **107**(1): 44-47. 1982
7. HARADA, T., INABA, A., YAKUWA, T. and TAMURA, T.: Freeze-preservation of apices isolated from small heads of brussels sprouts, *HortScience*, **20**(4): 678-680. 1985
8. HARRIS, R. E. and STEVENSON, J. H.: *In vitro* propagation of *Vitis*, *Vitis*, **21**: 22-32. 1982
9. JAMES, D. J. and THURBON, I. J.: Shoot and root initiation *in vitro* in the apple rootstock M.9 and the promotive effects of phloroglucinol, *J. Hort. Sci.*, **56**(1): 15-20. 1981
10. JONA, R. and WEBB, K. J.: Callus and axillary bud culture of *Vitis vinifera* 'Sylvaner Riesling', *Scientia Hort.*, **9**: 55-60. 1978
11. KITTO, S. L. and YOUNG, M. J.: *In vitro* propagation of carrizo citrange, *HortScience*, **13**(3): 305-306. 1981
12. LANE, W. D.: Regeneration of apple plants from shoot meristem-tips, *Plant Sci. Lett.*, **13**: 281-285. 1978
13. LANE, W. D. and MCDUGALD, J. M.: Shoot tissue culture of apple: comparative response of five cultivars to cytokinin and auxin, *Can. J. Plant Sci.*, **62**: 689-694. 1982
14. NOVÁK, F. J. and JŮVOVÁ, Z.: Clonal propagation of grapevine through *in vitro* axillary bud culture, *Scientia Hort.*, **18**: 231-240. 1983
15. PYOTT, J. L. and CONVERSE, R. H.: *In vitro* Propagation of heat-treated red raspberry clones, *HortScience*, **16**(3): 308-309. 1981
16. SINGHA, S.: *In vitro* propagation of crabapple cultivars, *HortScience*, **17**(2): 191-192. 1982
17. SNIR, I.: Micropropagation of red raspberry, *Scientia Hort.*, **14**: 139-143. 1981
18. WAINWRIGHT, H. and FLEGMANN, A. W.: The influence of light on the micropropagation of blackcurrant, *J. Hort. Sci.*, **59**(3): 387-393. 1984

Summary

To obtain a fundamental knowledge concerning vegetative propagation of kurominouguisukagura (*Lonicera caerulea* L. var. *emphyllocalyx* NAKAI), axillary leaf bud apices (approximately 1 mm in diameter with about 4 leaf primordia) were aseptically cultured on the media containing MURASHIGE & SKOOG's medium, 30 g/l sucrose, 7 g/l agar and growth regulators (NAA, BA, 2iP and GA_3). Culture conditions were defined as follows: pH of the media were adjusted to 5.5; the cultures were maintained at 25°C under 16-hour daily illumination (4,000 lx). Paper-wick method was used in experiment on pH. The materials used were sampled on Jul. 13 or Oct. 4. The results obtained are summarized as follows.

1. High survival rate of more than 80% was obtained at 4-7 of pH. Little growth of the apices

was observed even in case of adding NAA to the media.

2. Increase of both leaf number and the largest leaf length was recognized at 10^{-6} and 10^{-5} M of cytokinins (BA and 2iP), and a few apices formed a shoot.

3. Relatively high cytokinin concentrations enhanced callus formation. On callus formation, 2iP was more effective than BA, and showed its rate of 80% at 10^{-5} M. BA seems to be desirable to obtain normal organogenesis.

4. Addition of GA_3 (10^{-6} or 10^{-5} M) combined with BA (10^{-6} M) made both leaf number and the largest leaf length larger. Seventy percent of explants cultured developed a shoot at 10^{-5} M of GA_3 . Percentage of apices with callus decrease with the

increasing of GA_3 concentration.

5. Average shoot number per apex was comparatively large (1.5) at 10^{-6} M of GA_3 , while decrease slightly at 10^{-5} M of GA_3 . Average shoot length was more than 20 mm at less than 10^{-6} M of GA_3 , and approximately 10 mm at 10^{-5} M of GA_3 . It is considered that optimal concentration of GA_3 for shoot formation is nearly 10^{-6} M.

6. Shoots, which was obtained in the culture of nodal segments derived from shoots developed in primary culture, were cultured on the media containing 1-10mg/l of IBA and some of those differentiated roots. Optimum culture conditions for root differentiation need to be examine in the near future.