



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	園芸植物の栄養繁殖に関する基礎的研究 : (第6報) ナシの茎頂培養における材料採取時期および生長調節物質の影響
Author(s)	鈴木, 卓; SUZUKI, Takashi; 堀内, 知之 他
Citation	北海道大学農学部邦文紀要, 15(2), 111-117
Issue Date	1987-01-20
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/12054
Type	departmental bulletin paper
File Information	15(2)_p111-117.pdf



園芸植物の栄養繁殖に関する基礎的研究

(第6報) ナンの茎頂培養における材料採取時期及び生長調節物質の影響

鈴木 卓・堀内知之
原田 隆・八畝利郎

(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3月8日受理)

Basic Studies on the Vegetative Propagation of Horticultural Plants

VI. Influence of sampling time and growth regulators on pear leaf bud apices cultured *in vitro*

Takashi SUZUKI, Tomoyuki HORIUCHI, 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

近年組織培養技術の向上に伴い、茎頂培養法を用いた大量増殖が果樹においても注目され、既にリンゴ⁴⁾、ブドウ²⁾など数種の作物では実用化の段階に入っている。ナンについても茎頂培養に関する研究が数例報告されているが^{3), 5), 6), 8), 9), 10), 11), 12)}、近縁のリンゴなどに比べるとその数が極めて少なく、多くの品種について実用化するにはまだ困難な点を残している。

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の確立を目指しており¹⁾、ナンについても凍結、融解後の個体再生の技術を早期に確立しておくことは、大変重要であると考えている。

以上のことから、本研究は、ナンの茎頂の生長に影響を及ぼすと考えられるいくつかの要因について検討を行い、ナンの栄養繁殖法確立のための基礎的知見を得ることを目的として行った。

材料及び方法

I. 茎頂の生長に及ぼすオーキシンの影響

1. 材料の調製 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セイヨウナシ (*Pyrus communis* L.) 'フレミッシュ・ビューティー' 5樹を用い、1985年6月25日に腋生の葉芽を持つ発育枝を任意に採取した。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5~6枚を除去した後、70% エタノールに数秒間浸漬し、次に次亜塩素酸ナトリウム溶液(有効塩素1%, Tween-20を0.01%となるように添加)で約10分間表面殺菌を行った。その後、解剖顕微鏡下で、茎頂(横径約1mm、葉原基を4個程度有するもの)を無菌的に取り出し培養した。

2. 培養基の作製 培養基の無機塩類、アミノ酸及びビタミン類の濃度や組成は、MurashigeとSkoogの処方に従い、しょ糖30g/l、寒天7g/l、BA 10^{-6} M及びオーキシンとしてNAA、IAA(除菌添加)及び2,4-Dを各々単独にFig. 1に示す濃度で添加し、pHを5.7

に調整した。培養基は、口径20 mm長さ13 cmの試験管に10 mlずつ分注した後、アルミホイルで封をし、120°C、1.1 kg/cm²で、約10分間加圧滅菌を行った。

3. 培養条件 培養は、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区あたりの組織片数は10とした。植え込みから5週間後に、展葉数（幼葉が外方に反りながら伸長し、長さ1 mm以上に達した場合を展葉とした）、最大葉長及び生存個体数の各項目について調査を行った。

II. 茎頂の生長に及ぼすサイトカイニンの影響

Iと同じ実験樹から、1985年8月14日に材料を採取した。材料の調製方法はIに準じた。培養基は、MS培地に、しょ糖30 g/l、寒天7 g/l、GA₃10⁻⁶ M及びサイトカイニンとしてBAとカイネチンを各々単独にFig. 2に示す濃度で添加し、pHを5.7に調整したものをを用いた。分注や滅菌の方法及び培養条件はIと同じとし、植え込みから8週間後に、展葉数、最大葉長、生存個体数及びロゼット状培養体（6~10 mmの細長い幼葉が基部から6~7枚展開しているもの）数の各項目について調査を行った。

III. 材料採取時期の違いと茎頂の生長

Iと同じ実験樹から、1985年6月25日、8月14日、9月23日、11月13日及び12月11日に材料を採取し、植え込みを行った。培養基は、MS培地に、しょ糖30 g/l、寒天7 g/l、BA10⁻⁶ M及びGA₃10⁻⁶ Mを添加し、pHを5.7に調整したものをを用いた。分注と滅菌の方法及び培養条件はIと同じであるが、組織片数は各々20個体とした。植え込みから5週間後に、展葉数、最大葉長及びロゼット状培養体数の各項目について調査を行った。

IV. ロゼット状培養体からのシュートの形成に及ぼすBAとGA₄₊₇の影響

II, III及びその他の実験において得られたロゼット状培養体を、MS培地に、しょ糖30 g/l、寒天7 g/lを添加しpHを5.7に調整したのみの培養基、BAを10⁻⁵ M添加した培養基及びGA₄₊₇を10⁻⁶ M添加した培養基へ、各々8~9個移植した。培養容器は100 ml容三角フラスコを用い、培養基25 mlを分注した。滅菌の方法及び培養条件はIと同様である。移植は10月18日に行い、4週間後にシュート（節間伸長がみられるとともに、節部に展葉があり長さ10 mm以上に達した茎）の形成について調査を行った。

結果及び考察

I. 茎頂の生長に及ぼすオーキシンの影響

Fig. 1に茎頂の生長に及ぼすオーキシンの影響を示した。本実験では、LANE⁵⁾やSINGHA^{9),10)}の報告を参考に、茎頂の生長に重要な役割を担うと考えられるBAを、10⁻⁶ Mの濃度で培養基へ添加した。

茎頂の生存率は、オーキシンの種類に関らず、10⁻⁶ M以下の濃度区では90%以上の高い値を示したが、10⁻⁴ Mの高濃度区ではいずれも枯死する個体が増え、生存率が低下した。添加する各種のオーキシンの濃度が高くなるに従い、展葉数や最大葉長はオーキシン無添加区に比べ低下した。したがって、各種のオーキシンは茎頂の生長に対して抑制的に作用し、濃度が高くなるにつれてその作用が強くなるものと考えられる。しかし、LANE⁵⁾は、NAAをBAやGA₃とともに添加した場合、BAを単独で用いた場合と同様良好な茎頂の生長が認められたことを報告しており、本実験の結果はこれと異なってい

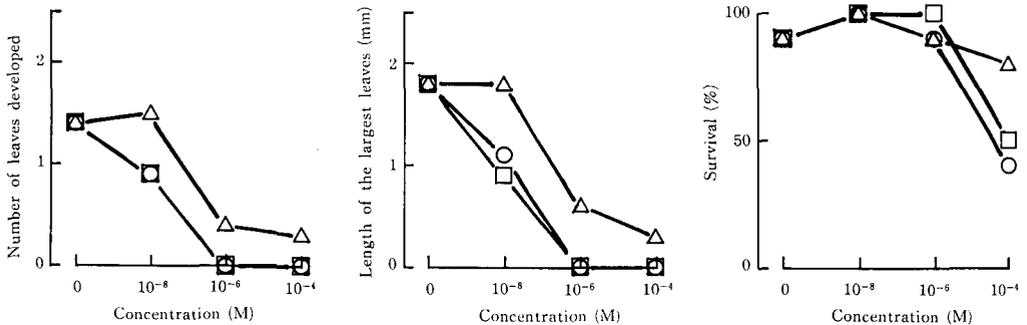


Fig. 1. Effect of auxins on survival and growth of leaf bud apices cultured *in vitro*. BA (10⁻⁶ M) is added uniformly to all media. Plant materials are collected on Jun. 25. The results after 5 weeks of culture are shown.

○—○, NAA; △—△, IAA; □—□, 2,4-D.

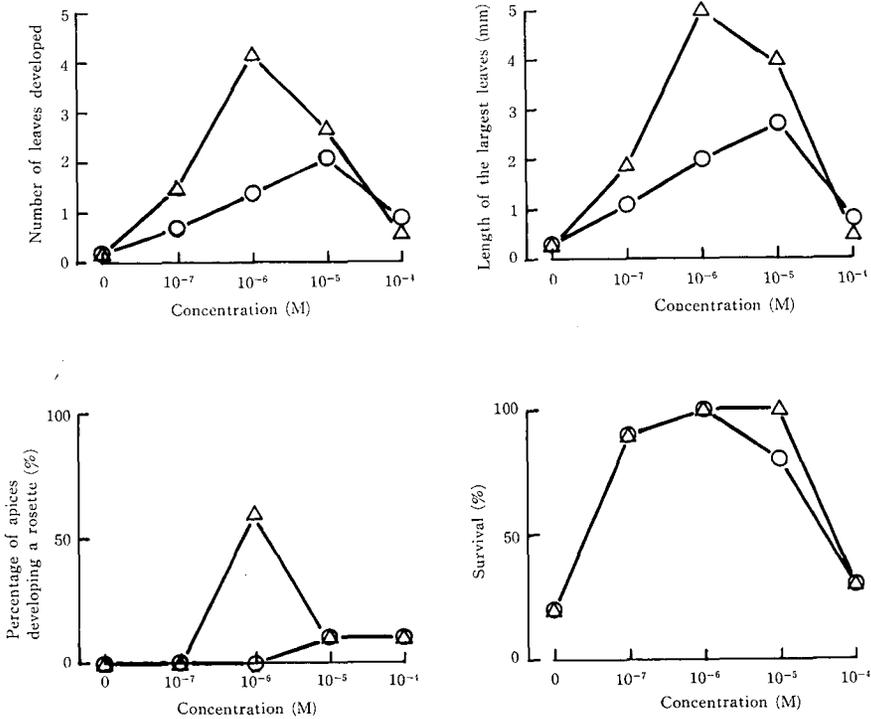


Fig. 2. Effect of cytokinins on survival and growth of leaf bud apices cultured *in vitro*. GA₃ (10⁻⁶ M) is added uniformly to all media. Plant materials are collected in Aug. 14. The results after 8 weeks of culture are shown.

○—○, kinetin; △—△, BA.

た。オーキシンの作用性は、他の生長調節物質の存在により変化する可能性があり、品種の違いによっても異なる可能性がある。したがって、オーキシンと他の生長調節物質の相互作用について、今後さらに検討する必要があるものと考えられる。

II. 茎頂の生長に及ぼすサイトカイニンの影響

Fig. 2 に茎頂の生長に及ぼすサイトカイニンの影響を示した。本実験では、サイトカイニンとともに GA₃ を添加するとシュートの伸長が良好になるとする SINGHA⁹⁾ の報告を参考に、培養基へ GA₃ 10⁻⁶ M を添加した。しかし、初代培養でシュートを形成する個体はほとんど認められなかったため、再生植物体が得られる可能性の高いロゼット状培養体 (Fig. 5) の数を調査し、シュート形成率の代わりにロゼット状培養体形成率を示した。

茎頂の生存率は、サイトカイニンの種類に関らず 10⁻⁷ ~ 10⁻⁵ M の濃度区で 80% 以上の高い値を示したが、サイトカイニン無添加区及び 10⁻⁴ M の高濃度区で低い値となった。展葉数と最大葉長は、サイトカイニンを添

加した区で無添加区に比べ大きな値を示し、至適濃度は BA が 10⁻⁶ M、カイネチンが 10⁻⁵ M であった。BA とカイネチンのいずれも、10⁻⁴ M の高濃度区では、茎頂の生長がほとんど認められなかった。平林ら³⁾ は、ニホンナンの茎頂培養で、BA の至適濃度は 2 × 10⁻⁶ M ~ 10⁻⁵ M であると報告しているが、本実験の結果はこれとよく一致していた。また、BA は、カイネチンに比べ葉数や葉長を増大させる作用が強く、茎頂培養に適しているものと考えられる。さらに、ロゼット状培養体形成率を見ると、BA 10⁻⁶ M の濃度区で 60% と高い値を示した外は、10% 以下の低い値であった。

以上のことから、ナンの茎頂培養では、リンゴ⁴⁾ やブドウ²⁾ など他の作物の場合と同様 BA が大きな作用を示し、初代培養における至適濃度は 10⁻⁶ M 程度であることがわかった。また、初代培養におけるロゼット状培養体形成率が、リンゴなどに比べ著しく低いので、今後この値を高めることが、特に重要であると考えられる。

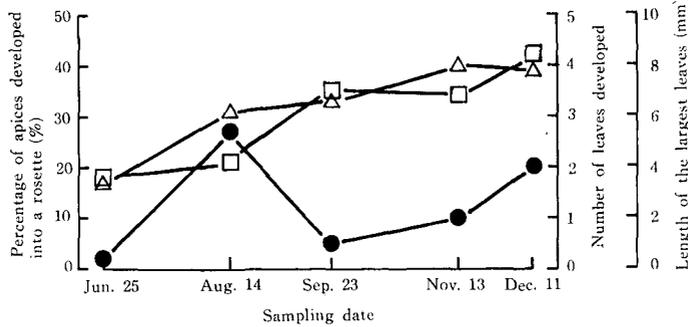


Fig. 3. Seasonal changes of the growth of the leaf bud apices cultured *in vitro*. BA (10^{-6} M) and GA₃ (10^{-6} M) are added uniformly to all media. The results after 5 weeks of culture are shown. ●—●, percentage of apices developed into a rosette; △—△, number of leaves developed; □—□, length of the largest leaves.

III. 材料採取時期の違いと茎頂の生長

Fig. 3 に材料採取時期の違いと茎頂の生長を示した。葉数と葉長は、6月から12月まで漸増の傾向を示し、12月の材料は6月の材料の2倍近い値を示した。また、植物体再生の目安となるロゼット状培養体形成率は、一定の傾向を示さなかったが、8月と12月の材料で20%以上の値を示した。YOTSUYA ら¹³⁾は、茎頂培養法を用いて、ニホンナシの夏季休眠芽と冬季休眠芽の生理状態に違いのあることを明らかにし、夏季休眠芽の生長はりん片の存在により抑制されるが、冬季休眠芽にはこの性質が認められないことを報告している。このことは、材料自身の持つ内生的な性質の違いが、茎頂培養における季節的な差として現れることを示しており、今後さらにこの点について検討する必要があるものと考えられる。

IV. ロゼット状培養体からのシュートの形成に及ぼす BA と GA₄₊₇ の影響

Fig. 4 にロゼット状培養体からのシュートの形成 (Fig. 5) に及ぼす BA と GA₄₊₇ の影響を示した。ジベレリンは、YOTSUYA ら¹³⁾の報告を参考に、GA₃ ではなく GA₄₊₇ を用いた。

生長調節物質無添加または GA₄₊₇ を添加した培養基へ移植したロゼット状培養体は、4週間後までにすべて枯死した。一方、BA を含む培養基へ移植したロゼット状培養体はすべて生存し、そのうち78% がシュートを形成した。

LANE⁵⁾ は、伸長したシュートを BA を含む培養基で継代培養し、新しいシュートを容易に増殖させており、本実験でもその後同様の結果を得た。したがって、いったんシュートが形成されれば、その後の増殖は比較的容易なものと考えられる。

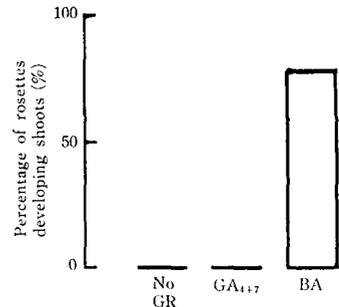


Fig. 4. Effect of GA₄₊₇ and BA on the shoot development of rosettes. No GR stand for absence of growth regulator in media. Conc. of GA₄₊₇ and BA are 10^{-6} M and 10^{-5} M respectively. Plant materials are collected on Aug. 14. The results after 4-week subculture of rosettes which are obtained in 8-week culture of leaf bud apices are shown.

また、ナシの再生個体を得たとする前述の文献^{3),5),6),8),9),10),11),12)}のうち、初代培養で横径1 mm 前後の茎頂を材料としているのは平林ら³⁾と LANE⁵⁾の報告にすぎず、他はすべて新梢から切り取った長さ2~5 cm の節部切片を外植体として用いている。さらに、これらの報告で用いられた品種は数品種に限られており、生長調節物質の検討は、*in vitro* で増殖して得られたシュートを材料に行われている場合がほとんどである。しかも、いずれの報告を見ても、植物体再生率に関する記述は見当たらない。このことから判断すると、初代培養において1 mm 程度の茎頂を材料に用いた場合シュートまたはロゼット状培養体形成率の低いことと培養条件における品種間差の大きいことが、ナシの茎頂培養法の確立を困

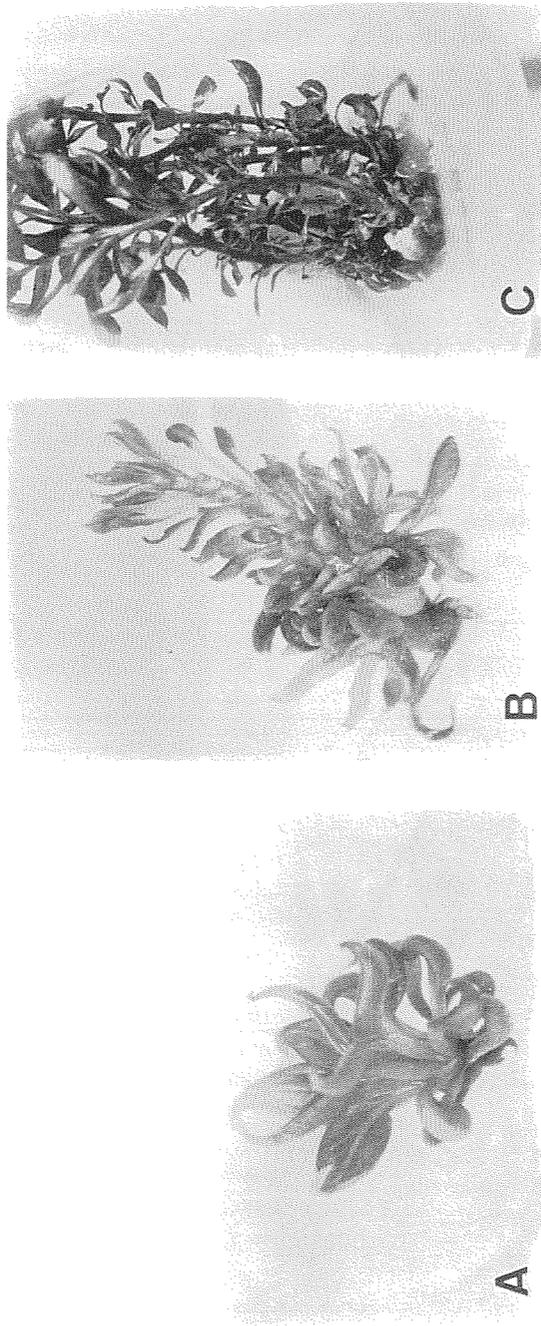


Fig. 5. A : Rosette development from a leaf bud apex after 8 weeks of primary culture.

B : Shoot elongation from a rosette after 4 weeks of subculture.

C : Multiple shoot development after 8 weeks of subculture.

難にしている原因と考えられる。大量増殖のみならず、無ウイルス作物の育成や凍結保存技術への発展性⁷⁾を考える場合、微小な茎頂からの植物体再生は非常に重要な問題である。したがって、今後これらの問題点を解決し植物体再生率を上昇させるため、初代培養の培養条件について再検討するとともに、本実験で得られたシュートを増殖し、シュートからの発根条件についても検討を行う予定である。

摘 要

セイヨウナシ (*Pyrus communis* L.) ‘フレミッシュ・ビューティー’の発育枝の腋生の葉芽から取り出した茎頂(横径約1 mm, 葉原基を4個程度有するもの)を培養し、器官形成に及ぼす材料採取時期及び生長調節物質(NAA, IAA, 2,4-D, BA, カイネチン及びGA₃)の影響について検討した。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単独または組み合わせて種々の濃度で添加し、pHを5.7に調整したものをを用いた。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. 展葉数と最大葉長は、BA 10⁻⁶ Mと組み合わせてオーキシン(NAA, IAA及び2,4-D)を添加した場合、オーキシン無添加区または低濃度のオーキシン添加区で比較的大きな値を示した。展葉数と最大葉長に対するオーキシンの促進効果は認められず、特に高濃度のオーキシンは抑制的に作用した。

2. 展葉数と最大葉長は、GA₃ 10⁻⁶ Mと組み合わせてサイトカイニン(BA及びカイネチン)を添加することにより増加し、BAでは10⁻⁶ M, カイネチンでは10⁻⁵ Mのときその値は最大となった。生存率は、BA及びカイネチンの10⁻⁴ Mの区で低い値を示した。ロゼット状培養体形成率は、BA 10⁻⁶ Mの区で60%と高い値を示した外は10%以下の低い値であった。

3. 展葉数と最大葉長には、年間の材料採取時期の違いにより差が認められた。すなわち、6月から12月にかけての材料を見ると、12月に近い材料ほど展葉数と最大葉長は大きな値を示した。ロゼット状培養体形成率は、8月と12月の材料で20%以上の比較的高い値を示した。

4. ロゼット状培養体を、初代培養と同じ培養条件下で、生長調節物質無添加の培養基及びGA₄₊₇ 10⁻⁶ MとBA 10⁻⁵ Mを各々単独に添加した培養基で継代培養した場合、BA 10⁻⁵ Mを添加した培養基でのみ、培養4週間後に旺盛なシュートの形成が認められた。シュート

を形成したロゼット状培養体の割合は、78%であった。

引用文献

- 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
- HARRIS, R. E. and STEVENSON, J. H.: *In vitro* propagation of *Vitis*, *Vitis*, **21**: 22-32. 1982
- 平林利郎・森口卓哉・小崎 格・山本洋子・松崎重雄: ナシの茎頂培養と発根について, 育種 **35** 巻別冊1, 46-47. 1985
- LANE, W. D.: Regeneration of apple plants from shoot meristem-tips, *Plant Sci. Lett.*, **13**: 281-285. 1978
- LANE, W. D.: Regeneration of pear plants from shoot meristem-tips, *Plant Sci. Lett.*, **16**: 337-342. 1979
- MARINO, G.: Moltiplicazione e radicazione "in vitro" del pero cv. "William", *Riv. Ortoflorofrutt. It.*, **68**: 95-106. 1984
- MORIGUCHI, T., AKIHAMA, T. and KOZAKI, I.: Freeze-preservation of dormant pear shoot apices, *Japan. J. Breed.*, **35**: 196-199. 1985
- SHEN, X. and MULLINS, M. G.: Propagation *in vitro* of pear, *Pyrus communis* L., cultivars 'William's Bon Chrétien', 'Packhamph' and 'Beurré Bosc', *Scientia Hort.*, **23**: 51-57. 1984
- SINGHA, S.: *In vitro* propagation of 'Seckel' pear, Proceedings of the conference on nursery production of fruit plants through tissue culture-applications and feasibility, Agricultural Research (Northeastern Region), Science and Education Administration, U. S. Department of Agriculture, 59-63. 1980
- SINGHA, S.: Influence of agar concentration on *in vitro* shoot proliferation of *Malus sp.* 'Almey' and *Pyrus communis* 'Seckel', *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **107**(4): 657-660. 1982
- SINGHA, S.: Influence of two commercial agars on *in vitro* shoot proliferation of 'Almey' crabapple and 'Seckel' pear, *HortScience*, **19**(2): 227-228. 1984
- SINGHA, S. and TOWNSEND, E. C.: Mineral nutrient status of crabapple and pear shoots cultured *in vitro* on varying concentrations of three commercial agars, *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **110**(3): 407-411. 1985

13. YOTSUYA, T., ICHII, T., SAWANO, M., NAKANISHI, T. and OZAKI, T.: Effects of bud scales and gibberellins on dormancy of *in vitro* cultured Japanese pear leaf buds, *Scientia Hortic.*, 24: 177-184. 1984

Summary

Axillary leaf bud apices (approximately 1 mm with about 4 leaf primordia) of pear (*Pyrus communis* L. cv. Flemish Beauty) were cultured on the agar-solidified media containing MURASHIGE & SKOOG's medium, 30 g/l sucrose, 7 g/l agar and growth regulators (NAA, IAA, 2,4-D, BA, kinetin and GA₃) added alone or combinationally. The culturing was conditioned as follows: pH of the media was adjusted to 5.7; the cultures were maintained at 25°C under 16-hour daily illumination (4,000 lx). The results obtained are summarized as follows.

1. Number of leaves and the largest-leaf length were relatively large at 10⁻⁶M of BA alone or at low level of auxins combined with 10⁻⁶M of BA. Auxins (NAA, IAA and 2,4-D) showed no promotive effect, and especially, high level of auxins had a depressive effect.

2. Number of leaves and the largest-leaf length increased with addition of BA or kinetin combined with GA₃(10⁻⁶M), and was largest at 10⁻⁶M of BA and 10⁻⁵M of kinetin. Survival rate was low at 10⁻⁴M of BA or kinetin. BA was considered more effective than kinetin for leaf bud apex culture of pear. Percentage of rosette-developing explants was high (60%) at 10⁻⁶M of BA, and low at other concentrations of it.

3. Number of leaves and the largest-leaf length increased according as plant material sampling delayed: they were large with materials collected in December than with those in June. Percentage of rosette-developing explants was relatively high (20%) with the August and December-collected plant materials.

4. The rosettes were subcultured on agar-solidified media (containing no growth regulator, 10⁻⁶M GA₄₊₇ or 10⁻⁵M BA separately) under the same culture conditions (except for growth regulators) as in the primary culture of leaf bud apices. Vigorous shoot development was observed on the culture medium with BA(10⁻⁵M) alone after 4 weeks. The ratio of rosettes developing shoots was 78%.