

氏 名(本籍) ^{うえ}植 ^{まつ}松 ^ち千 ^よ代 ^み美

学位の種類 農 学 博 士

学位記番号 農 博 第 3 6 5 号

学位授与年月日 昭 和 63 年 3 月 25 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 1 項該当

研究科専攻 東北大学大学院農学研究科
(博士課程) 農 学 専 攻

学位論文題目 数種の果樹の茎頂培養に関する研究

論文審査委員 (主 査)

教授 日向 康吉

助教授 尾形 亮輔

助教授 亀谷 寿昭

論文内容要旨

緒言

果樹品種は接ぎ木や挿し木などの栄養繁殖によって増殖され、また遺伝子が異型接合になっているため、組織培養による大量増殖の技術開発が期待されている。さらに組織培養技術はウイルスフリー化、遺伝資源の保存、変異の作出にも利用できると期待されている。これらの技術は一部の果樹においては既に実用化されているが、なお多くの果樹類ではその培養条件について詳細な検討が待たれている。

本研究では、数種類の果樹について組織培養による大量増殖の方法を検討した。その際特にウイルスフリー化や超低温下での遺伝資源保存に応用するために1 mm以下の茎頂からの増殖個体の取得に留意して検討を行った。また合成サイトカイニン様物質の4PU (N-(2-chloro-4-pyridyl)-N-phenylurea, 協和醃酵工業) を実験に供し、その効果について検討を行った。

まずモモ、スモモ等の核果類を供試し、茎頂培養を試み、スモモやアーモンドでは茎頂培養による大量増殖が可能であることを示した(第1章)。次にカキを材料として、4PU の効果が顕著であることを示した(第2章)。キウイフルーツでは茎頂培養とともに節間カルスからの不定芽形成によって増殖できることを明らかにした(第3章)。またパパイヤにおいては6-BAとNAA の組合せによって茎頂ならびにカルスからの大量増殖が可能なことを示した(第4章)。

化学物質の略号と名称

6-BA : 6-benzyladenine

2,4-D: 2,4-dichlorophenoxyacetic acid

IBA : 3-indolebutyric acid

2-iP : N-(2-isopentenyl)-adenine

KA : kinetin

NAA : 1-naphthalene acetic acid

4PU : N-(2-chloro-4-pyridyl)-N-phenylurea

ZA : zeatin

第1章 核果類の茎頂培養

モモ、ネクタリン、オウトウ、ニホンスモモそれぞれ数品種の休眠芽、およびアーモンドの新梢を用いて0.5~1.0mmの茎頂を培養した。培地はMS培地の無機塩を1/2濃度にした修正1/2 MS培地（鉄は規定量）を用いた。ペーパーウィック法の場合は寒天1g/lを加えた液体培地を試験管に分注後、ろ紙床を置いてその上に茎頂を置床した。

初代培養では一般に良好な生存率を示したが、一ヶ月後の茎葉の長さおよび葉数では、4PU 2.0mg/lを与えた区が他の区に比べて良好な生育を示した（第1表）。初代培養した茎葉を4PU 1.0mg/lあるいは6-BA 0.5mg/lを含む増殖培地に移植するとモモ、ネクタリンは褐変が甚しく、オウトウはカルス化がさかんで新たな茎葉の増殖は得られなかった。しかしニホンスモモの「大石早生スモモ」と「太陽」は旺盛な生育を示し、新たな茎葉の増殖が認められた（第2表）。これらの茎葉を4PU濃度を0.1~0.5mg/lに減じた培地に移植することにより発根を促し、順化、定植することができた。

アーモンドの新梢の茎頂も4PUを添加した培地で初代培養すると生存率が高かった（第3表）。これを6-BA 0.5mg/lを加えた増殖培地で培養するとえき芽が伸長して多数の茎葉が増殖した。これらの茎葉はNAA 0.5mg/lを含む培地に移植すると根を形成した。

本研究の結果、4PUを添加したペーパーウィック培地を利用することにより、1mm以下の茎頂培養においても生存率が高まり生育がよくなること、ニホンスモモやアーモンドではこの方法によって大量増殖が可能になることを明らかにした。

第2章 カキの茎頂培養

カキの休眠芽を前章と同様な方法で培養した。茎頂は0.5mmの大きさに切り取り置床した。

平核無、駿河、禪寺丸、次郎の休眠芽を2月に採取し、5°C暗黒下で保存したものを培養すると緑色茎葉の伸長やカルス化が観察された。特に4PU 0.05~0.1mg/l 添加区ではカルス化が少なく緑色茎葉の生存率が高かった(第4表)。また次年に「富有、早生次郎、甘百目」を供試したところ、前年と同様に4PU 0.1mg/l 区で緑色茎葉率が高かった(第5表)。さらにこれらの中の生育良好な個体を4PU 0.05mg/l 添加培地で継代培養すると、茎葉基部に褐色の堅く丸いカルスを形成し、このカルスから不定芽を生じることが観察された(第1図)。この方法により多数の増殖茎葉が得られることから、この方法はカキの増殖に有効であると示唆した。

一方「富有、早生次郎」等を含む10品種を供試して、11月と2月に採取した休眠芽をただちに培養すると、4PU を与えたものでは2週間は生存したがその後すべて褐変し生育しなかった。しかし6-BA区では生育が認められた(第6表)。休眠芽の生理状態と4PU の間には強い相互作用があると考えられた。

第3章 キウイフルーツの茎頂培養と節間カルスからの不定芽誘導

キウイフルーツの茎頂を約0.5mm に切り取り、寒天培地で培養した。4PU 0.1, 0.5, 1.0 mg/l 添加区で初代培養すると生長は速かったが、葉が厚くガラス状になるなどの形態の異常が多発した。一方KA 2.0mg/l 添加区で初代培養すると、生育は遅いが異常個体は出現しなかった。KA区で初代培養後ZA又は4PU を含む培地で継代培養すると茎葉は伸長し基部にはカルスが形成された(第7表)。これらのカルスには第2代、第3代継代培養過程で不定芽の出現が観察された。そしてこれら不定芽由来の再生茎葉には形態異常が認められなかった。これらの茎葉をNAA 又はIBA を含む WHITE培地に移植することによって発根を促し、植物体を鉢上げできた。

一方キウイフルーツの節間切片の培養を試みたところ、2,4-D 添加培地ではカルスが形成されなかったが、4PU, NAA, IBA のいずれかを含む培地では100%カルスが形成された。NAA 区、IBA 区のカルスは柔らかく増殖が速かったのに

対し、4PU 区のカルスは堅く緻密で増殖はやや遅かった。4PU 区で得られたカルスは再分化培地に移植すると容易に不定芽を形成し再分化個体が得られた（第8表）。これらをZA区に移植すると不定芽数も多く、再生茎葉の生育も良好であることがわかった（第2図）。

以上の結果からキウイフルーツにおいては茎頂培養、カルス培養の両系で大量増殖が可能であることがわかった。またカルスからの再分化には4PU 培地でのカルス誘導とZA培地での再分化が有効であることを指摘した。

第4章 パパイヤ実生の茎頂培養と実生カルスからの不定芽誘導

市販のハワイ産パパイヤの種子を播種し、2～3か月の実生を実験に供した。茎頂またはえき芽を1.5～2.0mmの大きさに切って外植体とし、6-BA と NAA を各種濃度で組み合わせた 1/2MS 培地に置床した。茎葉の伸長は6-BA, NAAが低濃度の時に良好で、両者の濃度がともに高くなると異常な生育を示した。継代培養を続けると 6-BA 1×10^{-6} M, NAA 1×10^{-7} M区で葉えきからの茎葉の増殖がさかんだった（第9表）。

一方実生の葉身、葉柄、茎を6-BAとNAA を組み合わせて添加した培地で培養するとカルスを形成した。特に茎、葉柄由来カルスは生育が旺盛で、緻密な乳白色のカルスが得られた。これらは再分化培地に移植すると多数の緑点を生じ、茎葉が再分化した（第10, 11表）。

以上の結果からパパイヤにおいては茎頂培養、カルス培養の両系による大量増殖が可能であることを指摘した。

結 語

本研究では数種の果樹を供試して茎頂培養あるいはカルス培養による増殖技術を検討した。その結果次の一覧表に示した培養条件が明らかになった。

本研究で明らかにした各種果樹の増殖条件

茎頂培養による方法			
種	初代培養	増殖培養	発根条件
ニホンスモモ	4PU 2.0 ペーパー法	4PU 1.0	4PU 0.1-0.5
アーモンド	4PU 2.0-4.0 ペーパー法	6-BA 0.5	NAA 0.5
カキ	4PU 0.1 ペーパー法	4PU 0.05	—————
キウイフルーツ	KA 2.0	ZA 0.5-1.0	WHITE培地 NAA 1.0
パパイヤ	NAA 1×10^{-6} M	6-BA 1×10^{-6} M NAA 1×10^{-7} M	NAA 500mg/l に30秒浸漬
体細胞培養による方法			
種	カルス誘導	不定芽形成	
キウイフルーツ	4PU 2.0	ZA 2.0	
パパイヤ	6-BA 1×10^{-5} M NAA $1-5 \times 10^{-5}$ M	6-BA 1×10^{-6} M NAA 1×10^{-6} M	

特に記入のないものは1/2MS（鉄は規定量）、寒天またはゲルライトによる固形化培地、単位はmg/l。

核果類のニホンスモモとアーモンド、ならびにカキでは4PU とペーパーウィック法の組合せにより茎頂培養による大量増殖が可能となった。これらにおいてはいずれも1mm以下の茎頂からの増殖が可能であることからウイルスフリー株の取得や茎頂の超低温保存法に利用できると考える。

キウイフルーツおよびパパイヤは雌雄異株であるために組織培養による再分化系の確立と大量増殖が強く求められているものである。本研究の結果、これらの果樹においては茎頂培養の方法とともに、カルスからの再分化系が利用できることを明らかにした。特にキウイフルーツのカルス誘導に4PU を用いるとカルスからの不定芽形成が著しく促進されることが明らかになった。

Table 1. Shoot lengths and leaf numbers of Prunus shoots cultured for one month on various establishment media with paper-wick.

species cultivar	6-BA (2.0mg/1)		KA (2.0mg/1)		4PU (0.2mg/1)		4PU (2.0mg/1)	
	a	b	a	b	a	b	a	b
	Peach							
Yahatahakuhou	2.1	6.2	1.3	3.7	1.5	4.6	1.9	5.2
Kurakatawase	2.0	3.0	2.0	5.0	1.8	4.5	3.0	6.5
Nectarine								
Shyuhou	1.5	6.5	1.3	4.5	1.2	6.0	1.0	1.5
Sweetcherry								
Napoleon	3.0	6.0	3.6	6.4	3.6	6.3	7.4	9.3
Satounishiki	3.9	11.8	5.0	6.4	4.0	7.0	5.7	10.8
Takasago	3.3	9.3	2.7	6.0	4.8	7.3	7.8	11.0
Plum								
Ooishiwasesumomo	-	-	1.0	3.0	-	-	4.9	5.3
Taiyou	3.1	4.4	2.9	2.4	2.7	2.2	4.4	5.8
Mean	2.7	6.7	2.5	4.6	2.8	5.4	4.5	6.9

- a) Length of shoot (mm).
b) Number of leaves on a shoot.

Table 2. Propagation rate of Prunus shoots on multiplying medium containing 1.0mg/1 4PU or 0.5mg/1 6-BA.

species cultivar	4PU (1.0mg/1)				6-BA (0.5mg/1)			
	No. of shoots transplanted	No. of shoots survived	No. of shoots with new rate shoot	propagation rate	No. of shoots transplanted	No. of shoots survived	No. of shoots with new rate shoot	propagation rate
Peach								
Yahatahakuhou	47	13	0	1.0	7	2	0	1.0
Kurakatawase	52	2	0	1.0	2	0	0	-
Nectarine								
Shyuhou	53	14	0	1.0	7	3	0	1.0
Sweetcherry								
Napoleon	25	0	0	-	-	-	-	-
Satounishiki	20	4	0	1.0	4	0	0	-
Takasago	10	3	0	1.0	3	1	0	1.0
Plum								
Ooishiwasesumomo	22	2	2	8.0	7	7	7	5.1
Taiyou	63	60	20	1.6	15	12	12	5.7

Propagation rate : Total number of shoots developed on the shoots survived / Number of shoots survived.

Table 3. Survival rates of almond shoot tips cultured on establishment medium.

cytokinin conc. (mg/1)	No. of shoot tips placed	No. of shoots survived
4PU 2.0	10	7
4PU 4.0	10	8
6-BA 2.0	10	4

- 1) Elongated shoots were counted.

Table 4. Green shoot rates and callus induction rates obtained from shoot tip culture of Japanese persimon on the medium containing various kind of cytokinins (%).

cultivar	cytokinin concentration (mg/l)											
	6-BA		KA		4PU							
	1.0		1.0		0.01		0.05		0.1		1.0	
	S	C	S	C	S	C	S	C	S	C	S	C
Hiratanenashi	18.4	0	0	0	43.8	0	25.0	0	33.3	0	17.2	58.6
Suruga	18.4	0	0	0	0	0	0	0	24.0	32.0	0	83.8
Zenjimarū	23.6	0	0	0	27.8	0	66.7	0	70.8	0	17.9	23.1
Jiro	34.0	0	0	0	60.9	0	58.3	0	100.0	0	2.5	97.5

S) Green shoot rate.
C) Callus induction rate.

Table 5. Green shoot rates obtained from dormant shoot tip culture of Japanese persimon in May, 1987 (%).

cultivar	cytokinin concentration (mg/l)							
	4PU		0.1		6-BA 5.0		ZA 1.0	
	2w	4w	2w	4w	2w	4w	2w	4w
Fuyu	100	100	89	89	100	90		
Wasejirou	100	100	40	35	70	70		
Amahyakume	6	6	0	0	10	10		

Green shoot rates were calculated two or four weeks after culturing on the establishment medium.

Table 6. Green shoot rates obtained from dormant shoot tip culture of Japanese persimon in February, 1987 (%).

cultivar	cytokinin concentration (mg/l)			
	4PU		6-BA 5.0	
	2w	4w	2w	4w
Fuyu	94	-	36	38
Matsumotowasefuyu	88	-	43	51
Jirou	92	-	84	72
Wasejirou	61	-	28	23
Hiratanenashi	95	-	82	87
Amahyakume	86	-	48	48
Suruga	69	-	84	84
Zenjimarū	66	-	79	74
Izu	60	-	58	53
2IQ.No.12	50	-	32	35

Green shoot rates were calculated two or four weeks after culturing on the establishment medium.

Table 7. Shoot growth obtained from the 2nd and the 3rd passage culture of kiwifruit with ZA, 4PU or KA.

cytokinin conc. (mg/l)	5 weeks culture on the 2nd passage			cytokinin conc. (mg/l)	4 weeks culture on the 3rd passage	
	height (mm)	callus formation ratio(%)			height (mm)	callus formation ratio(%)
ZA 1.0	23.1	45		ZA 0.5	29.7	32
4PU 0.1	16.4	62		4PU 0.05	28.6	53
KA 1.0	12.4	14		KA 0.5	17.3	92
				+ZA 0.1		

Shoot tips were primary cultured on the medium containing 2.0mg/l kinetin for 5 weeks.

Table 8. Adventitious buds appearance on the kiwi callus obtained by inter node segment culture.

hormone conc. in the callus induction med. (mg/l)	cytokinin conc. in the regeneration med. (mg/l)	% of callus with adventitious buds		
		1w	2w	6w
4PU 2.0	ZA 2.0	60	90	100
	4PU 0.1	55	89	100
	KA 2.0	0	0	0
	hormone free	66	89	100
NAA 2.0	ZA 2.0	0	0	44
	4PU 0.1	0	0	13
	KA 2.0	0	0	0
	hormone free	0	0	0
IBA 2.0	ZA 2.0	0	0	66
	4PU 0.1	0	0	0
	KA 2.0	0	0	0
	hormone free	0	0	0

Table 9. Shoot multiplication rate obtained from 3rd and 4th subculture passages of papaya.

medium No.	S1	S2	S3	S4	S5	S6
6-BA conc. (M)	0	0	0	1×10^{-6}	1×10^{-6}	1×10^{-6}
NAA conc. (M)	0	1×10^{-7}	1×10^{-6}	0	1×10^{-7}	1×10^{-6}
No. of subculture passage						
3	-	1.0	1.3*	2.8	4.5*	3.5
4	2.3*	5.0*	3.4*	5.0	7.0*	6.0*

*) Root induction was observed.

Table 10. Green spot number observed on the leaf blade callus and the leaf petiole callus cultured on the regenerating medium.

cytokinin conc.		35 days				70 days			
		NAA 5×10^{-7} M		NAA 5×10^{-6} M		NAA 5×10^{-7} M		NAA 5×10^{-6} M	
		l.b. ¹⁾	l.p. ²⁾	l.b.	l.p.	l.b.	l.p.	l.b.	l.p.
6-BA	5×10^{-6} M	0	122	0	30	2	115	2	11
	5×10^{-5} M	0	15	0	0	0	33	6	0
	5×10^{-4} M	0	0	0	0	0	0	0	0
4PU	1mg/l	-	0	-	0	-	0	-	0
	5mg/l	-	0	-	0	-	0	-	0

72 leaf blade calli and 3 leaf petiole calli were cultured in each treatment. Total number of green spots was counted for each treatment. 1) Leaf blade callus. 2) Leaf petiole callus.

Table 11. Green spot appearance rates of the papaya stem callus cultured for 60 days on the regenerating medium (%).

6-BA conc. (M)	NAA conc. (M)		
	0	1×10^{-7}	1×10^{-4}
0	13	13	20
1×10^{-6}	33	33	53*
5×10^{-6}	13	21	27
1×10^{-5}	7	7	13

Calli obtained from one callus induction medium were transferred to 12 kinds of regenerating medium. All regenerating media included 14 to 15 calli respectively. *) Shoot regeneration was observed.



Fig. 1 Shoot multiplication and of Zenjimarú obtained from multiplying medium containing 0.05mg/l 4PU.

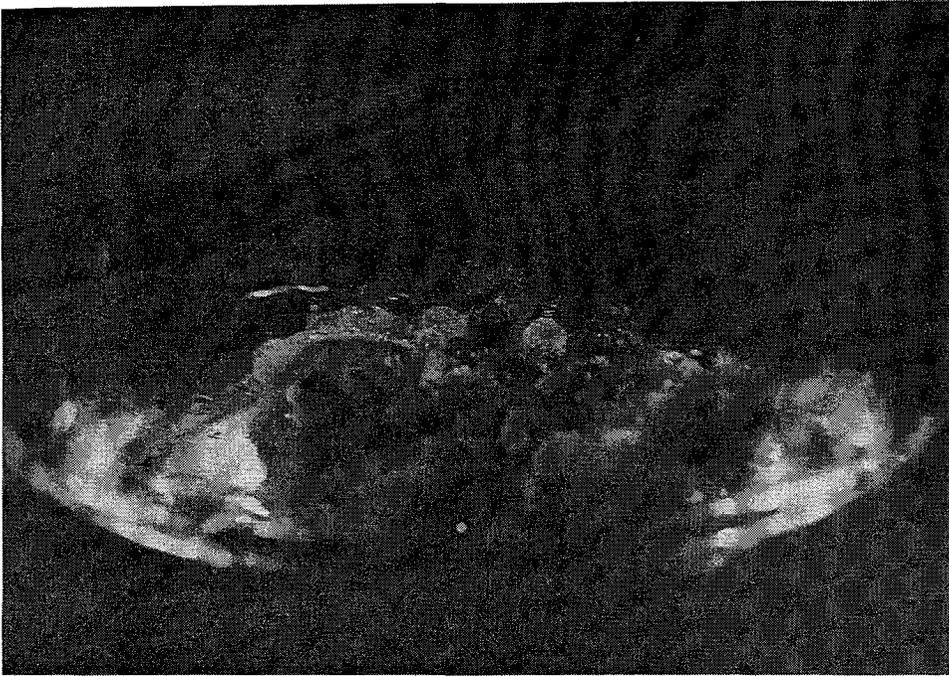


Fig. 2 Adventitious buds were regenerated on the callus.

The callus was induced by the 4PU medium and then transferred to the ZA medium.

審査結果の要旨

果樹品種は遺伝子が異型接合になっているために、接ぎ木や挿し木などの栄養繁殖によって増殖されており、果樹類の組織培養は大量増殖、ウイルスフリー化、遺伝資源の超低温保存、変異の作出、などに極めて有効であると考えられ、その技術開発が期待されている。

本研究は数種類の果樹を材料として、ウイルスフリー化や低温保存に利用価値の高い1mm以下の茎頂を培養して、大量増殖技術の開発を試みたものである。また合成サイトカイニン様物質4PU(N-(2-chloro-4-pyridyl)-N-phenylurea)の効果についても検討を行った。

まずモモ、スモモなどの核果類を供試して茎頂培養を試み、4PUを添加した培地を用い、ペーパーウィック法を利用することによって、茎頂の生存率が高まり生育が良くなることを示した。そして、ニホンスモモおよびアーモンドはこの方法によって大量増殖が可能になることを明らかにした。

次にこの方法をカキの休眠芽の茎頂培養に適用し、その増殖条件を明らかにした。そして休眠芽の生理状態と4PUとの間には強い相互関係があり、休眠芽を早期に採取すると生存率が低下することを明らかにした。一方、カキにおいては茎葉基部に堅く丸いカルスを形成し、このカルスから多数の不定芽が分化するので、この方法によっても増殖が可能であることを示した。

キウイフルーツやパパイアは、雌雄異株であるために、組織培養による大量増殖が強く望まれていることから、これらを材料にして実験を更に展開し、キウイフルーツの茎頂培養条件を明らかにした。キウイフルーツの節間切片の培養においてはカルスが得られること、その再分化には4PUによって誘導したカルスを用いると再分化しやすいことも示した。また、パパイアにおいては、茎頂培養およびカルス培養の両系による大量増殖が可能であることも示している。

以上のように、本研究は果樹類の茎頂培養法の開発に多大の貢献をなしたものであり、著者は農学博士の学位を授与される十分な資格があるものと認定した。