カキ '西村早生' 組織培養個体の順化に及ぼす要因とその圃場生育

鉄村琢哉¹・田尾龍太郎²・行永壽二郎¹

¹京都大学農学部附属農場 569 大阪府高槻市八丁畷町 12-1

²京都大学農学部 606-01 京都市左京区北白川追分町

Factors Influencing Acclimatization of 'Nishimurawase' Japanese Persimmon Micropropagules and Their Field Performance

Takuya Tetsumura¹, Ryutaro Tao² and Hisajiro Yukinaga¹

¹Experimental Farm, Faculty of Agriculture, Kyoto University, Takatsuki, Osaka 569

²Faculty of Agriculture, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606-01

Summary

We studied the factors influencing the acclimatization of Japanese persimmon (*Diospyros kaki* Thunb. cv. Nishimurawase) micropropagules derived from shoot tips and evaluated their field performance. During acclimatization, optimum plantlet survival was at 28 °C, but most died at 22° or 34 °C. Plantlets grew better under continuous lighting than under a 16 hr photoperiod. Enhanced PPF stimulated growth of the micropropagules and raised their survival rate. When shoots were transplanted into pots, immediately after the rooting treatment, none survived. On the other hand, when transplanted after root induction on the rooting medium, almost all of them survived. The highest plant growth rate was obtained with those plantlets cultured for 20 days on the rooting medium. Although plantlets grew vigorously when transferred outside, they grew better when transplanted in the field than in partly glazed pots. Rejuvenation did not occur in the shoot tip culture of Japanese persimmon, because some of the plantlets planted in the pots bore both male and female flowers four months after being transferred outside.

緒 言

カキはオウトウ、クリ、クルミなどと同様、挿し木繁殖がきわめて困難である。そのため遺伝的に不斉な種子を播いて台木を育成し、その台木に栽培品種を接ぎ木して苗木を生産してきた。マイクロプロパゲーションが実用化すれば、遺伝的に斉な台木を効率的に生産することが可能となり、わい化作用やストレス耐性のある優良台木クローンが大量に増殖されるであろう。また栽培品種の自根樹そのものに上記の台木のような特性があれば、接ぎ木にかかわる労力を省くことも可能である。

カキの組織培養に関する技術は、この数年間で茎頂培養の成功 (Cooper・Cohen, 1985; Fukui ら, 1989;

Sugiura ら, 1986) に始まり、葉からの不定芽形成 (福井ら, 1989; Yokoyama・Takeuchi, 1981), カルスからの植物体再生 (Tao ら, 1988), さらにプロトプラストからの植物体再生 (Tao ら, 1991) と著しく発展してきた。いっぽう、カキ台木の大量増殖を目的とした茎頂培養に関する研究も進められているが (加々美ら, 1991; 文室ら, 1988; 立松ら, 1988), リングのわい性台木や核果類の台木のように実用化には至っていない (小崎・野間, 1990)。培養個体の順化の難しさがあげられているものの (Cooper・Cohen, 1985; 村山ら, 1989), その順化に関する詳細な研究は行われていない。本実験ではカキの大量増殖実用化のために、また組織培養によって得られた変異個体を効率的に獲得するために、順化中の環境条件、特に光と温度が個体の生長や生存に及ぼす影響を調査し、その最適条件を検討した。また順化に成功した個体の一

1993年3月12日 受理

本報告の一部は1991年園芸学会秋季大会において発表した。

部を鉢あるいは圃場に直接植えて、その生育状況を調査した。

材料および方法

カキ「西村早生」休眠枝（滋賀県農業試験場園芸分場より分譲）の茎頂由来のシュートを 3-indole-butyric acid (IBA) を用いて発根処理し、実験に供試した。茎頂培養および発根処理の手法は前報（鉄村ら、1991）に従ったが、定着および増殖用サイトカニンとして 6-benzyladenine (BA) 20 μM を、発根処理直前のシュート伸長用サイトカニンとして Zeatin 5 μM をそれぞれ用いた。

実験1. 温度および日長が順化に及ぼす影響

上記のシュートのうち長さ 15 mm 以上、葉数 3 枚以上のものを選び、IBA により発根促進処理を行った。IBA 処理後 20 日目に根に付着している寒天を取り除き、1 個体ずつバーミキュライト（約 80 ml）を入れたピート製のポット（直径 60 mm、高さ 60 mm）に鉢上げし、ポリカーボネイト製プラントボックス（縦および横 75 mm、高さ 100 mm）に入れてふたをかぶせ、人工気象器内に置いた。バーミキュライトはあらかじめハイポネックス液 5-10-5 (N-P₂O₅-K) の 500 倍希釈液をしみこませ、ポットおよびプラントボックスとともにオートクレーブで滅菌しておいた。鉢上げ後に発生した新葉が 2 枚展開した個体から、プラントボックスのふたを徐々に開け外気にならしていき、ふたを開け始めてから 40 日後に完全にふたを取り去った（第 1 図）。

人工気象器内の環境条件としては 22 °C-16 hr 日長、28 °C-16 hr 日長、28 °C-連続照明、34 °C-16 hr 日長の 4 区を設けた。光源には白色蛍光灯を用い、光合成

有効光量子束（photosynthetic photon flux, PPF）を 60 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$ （培養棚面）に設定した。1 処理区当たり 20 個体を用い、ふたを開けた個体について順化後 50 日目に個体長および着葉数を調査した。

実験2. 光量が順化に及ぼす影響

鉢上げおよび順化の方法は実験 1 と同様の方法で行った。人工気象器内の光源を増加したり、寒冷しゃを用いたりして、培養棚面の光合成有効光量子束を 120, 60, 30 および 15 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$ に調節し順化を試みた。いずれの処理区も連続照明、温度 28 °C とした。1 処理区当たり 25 個体を用い、実験 1 と同様の調査を行った。

実験3. 鉢上げ時期が順化に及ぼす影響

実験 1 と同様のシュートに IBA 処理を行い、直接、あるいは寒天培地で発根誘導した後、鉢上げした。鉢上げ時期としては、以下の 4 区を設定した。すなわち ①寒天培地に植え付けず直接バーミキュライトに挿し木する（IBA 処理後 0 日目、直接挿し）、②半数の個体が発根する IBA 処理後 10 日目、③9 割の個体が発根する IBA 処理後 20 日目、④すべての個体が発根する IBA 処理後 40 日目。

発根促進のため IBA 処理後 10 日間は暗黒条件で培養した。その後、鉢上げした個体は連続照明、寒天培地で発根誘導中の個体は 16 時間日長で培養および順化を行った。順化方法は実験 1 と同様の方法で行い、いずれの処理区も光合成有効光量子束 60 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$ 、温度 28 °C とした。1 処理区当たり 25 個体を用い、実験 1 と同様の調査を行った。

実験4. 鉢上げ個体の初期生育

鉢上げ・順化に成功した個体を、5 月（鉢上げ後約 4 か月後）に植木鉢（partly grazed pot, 直径 18 cm）あるいは圃場に植え付けた。植え付け後、1 か月間寒冷しゃで被覆した。植木鉢には圃場の土を入れ、鉢植え、圃場栽植いずれの個体に対しても適宜化成肥料（8N-8P-8K-1Mg）を施した。植え付けた個体数は鉢植え 98、圃場 82 とした。12 月に生存個体数、樹高および基部径（地上部 5 cm）を調査した。

結 果

実験1. 温度および日長が順化に及ぼす影響

新葉を展葉し、プラントボックスのふたを開けて順化を試みることでできた個体は、28 °C-連続照明区が 90% でもっとも多く、ついで 28 °C-16 hr 日長区 75%、22 °C-16 hr 日長区 70% の順で、34 °C-16 hr 日長区が 65% ともっとも少なかった。28 °C 区の個体は順化中

Fig. 1. The acclimatization method of Japanese persimmon. A: Transplanting in the pot, B-C: Acclimatization to low relative humidity, D: Completion of acclimatization.

および順化終了後の枯死率が低く、16 hr 日長区では70%、連続照明区では85%の個体がそれぞれ生存した(第1表)。これらの個体は数 cm 伸長するといったん生長を止め、一定期間後、頂芽あるいは頂部付近の腋芽が発達し、新しょうが発生するといった生長を繰り返したが、連続照明区の個体の方が16 hr 日長区のそれよりも生長が優れ、葉色は濃くシュートも太く充実していた。いっぽう 22 および 34 °C 区の個体は順化中および順化終了後に生長を止めた後は、新たに新しょうを発生することはなく、順化開始 90 日目にはすべての個体が枯死した。

実験 2. 光量が順化に及ぼす影響

光量が低い区の個体は、鉢上げ後生長が衰え、プラントボックスのふたを開ける前に枯死するものが多かった。いっぽう光量が高い区の個体は、順化中および順化終了後に枯死することはまれで、各個体の生長も光量が高いほど優れる傾向にあった(第2表)。

実験 3. 鉢上げ時期が順化に及ぼす影響

寒天培地に植え付けず直接バーミキュライトに植え付けた個体は、鉢上げ後 20 日目までに、ほとんどが発根することなく枯死した(第3表)。また発根し新葉を展開して順化を試みることでできた個体も、順化

Table 1. Effect of temperature and photoperiod on the growth of plantlets.^z

Conditions		No. of plantlets investigated	Shoot length (mm)	No. of leaves
Temperature (°C)	Photoperiod (hr)			
22	16	6 ^y	2.7±0.6 ^x	3.8±0.6 ^x
28	16	14	8.0±1.3	7.1±0.9
28	24	17	10.9±1.4	8.5±0.7
34	16	4	2.8±0.2	3.8±0.5

^z Data were taken 50 days after acclimatization. PPF was 60 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$.

^y Although 20 plantlets were used for each treatment, some died during acclimatization.

^x Mean $\pm$ SE.

Table 2. Effect of PPF on the growth of plantlets.^z

PPF ($\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$)	No. of plantlets investigated	Shoot length (mm)	No. of leaves
15	3 ^y	1.7±0.3 ^x	3.0±0.8 ^x
30	15	6.2±1.0	5.4±0.6
60	24	11.7±0.9	7.7±0.3
120	25	13.0±0.9	8.2±0.4

^z Data were taken 50 days after acclimatization. Conditions were continuous lighting and 28°C.

^y Although 25 plantlets were used for each treatment, some died during acclimatization.

^x Mean $\pm$ SE.

Table 3. Effect of the culture duration on the rooting medium on the growth of plantlets.^z

Days of culture on rooting medium before transplanting	No. of plantlets investigated	Shoot length (mm)	No. of leaves
0 ^y	1 ^x	2.0±0 ^w	3.0±0 ^w
10	24	8.0±0.6	7.1±0.4
20	23	10.3±0.5	8.9±0.3
40	23	8.0±0.7	8.0±0.5

^z Data were taken 50 days after acclimatization. Conditions were 60 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$ and 28°C.

^y Direct rooting in the pots containing vermiculite.

^x Although 25 plantlets were used for each treatment, some died during acclimatization.

^w Mean $\pm$ SE.

開始 80 日目には枯死した。

IBA 処理後 10 日目の発根率は 52% であったが、その時期に鉢上げした個体はほとんど枯死せずに順調に生育した。鉢上げ時に未発根であった個体も、ほとんどが鉢上げ後に発根し、新葉を展葉し順化できた。IBA 処理後 20 日目および 40 日目の発根率はそれぞれ 88%, 96% であり、その時期に鉢上げした個体は、IBA 処理後 10 日目に鉢上げした個体と同様、ほとんど枯死せずに順調に生育した。直接挿し区以外の個体は順化後も良好に生育を続け、中でも IBA 処理後 20 日目に鉢上げした個体の生長が優れる傾向にあった。

実験 4. 鉢上げ個体の初期生育

屋外に移植した個体は、圃場、植木鉢どちらに植え付けても、その 90% 以上が生存した (第 4 表)。圃場に植え付けた個体の多くは、生長期間中、連続的に生長し、半数が樹高 1 m 以上となった。いっぽう、鉢植え個体は、伸長→停止→伸長→停止といった断続的な生長を行い、圃場の個体に比べ樹高は約半分であった。また鉢植え個体のうち、8 月下旬から 9 月上旬にかけて 3 個体に着花が認められた (第 2 図)。その内訳は、雄花のみ、雄花と雌花の両方、雌花のみを有する個体それぞれ 1 個体ずつであった。

考 察

組織培養中に形成されたイチゴの葉は、柵状組織の細胞の発達が悪く、細胞間隙が広く、光合成能力も劣っているが、鉢上げ後に発達した葉は、培養中に形成された葉よりも柵状組織の細胞の割合が増え、十分光合成能力のあることが確かめられており、鉢上げ後の個体の順調な生育は鉢上げ後に発達する葉に左右されと考えられている (Grout・Millam 1985; Fabbri ら, 1986)。カキに関しても鉢上げ後に発達した葉は組織培養中に形成した葉と形態的に異なり、その生理状態

も異なっていると考えられる。予備実験において鉢上げ後に新葉を出さなかった個体を順化した場合、発根しても順化中に枯死するものが多く、また順化に成功した個体も新葉を出すことはまれで、徐々に枯死していった。それゆえ本実験においては、各個体ごとに順化操作ができるよう 1 個のプラントボックスに 1 個体のみ植え付け、鉢上げ後に発生した新葉が十分発達した個体から順化操作を行い、各個体の調査も順化を試みたものについて行った。

カキの茎頂培養は、一般に温度 27℃ 前後、16 時間日長あるいは連続照明という環境条件で行われており、

Fig. 2. Micropropagated Japanese persimmons bore both male and female flowers. A : The whole plantlets, bar indicates 50 cm, B : Arrow indicates a female flower, C : Arrows indicate male flowers.

Table 4. Effect of planting place on survival and growth of micropropagated plantlets.²

Planting place	Survival (%)	Plant height (cm)	Trunk diameter ^y (mm)
Field	91	95.7±3.6 ^x	8.3±0.3 ^x
Partly glazed pot	96	45.7±1.7	7.2±0.1

² Ninety-eight micropropagated plants were planted in the partly glazed pots, and eighty-two in the field. They were planted in May, and data were taken after the growing season.

^y Measured at 5 cm above ground level.

^x Mean ± SE.

鉢上げ・順化の試みも茎頂培養時とはほぼ同じ条件で行われている (Cooper・Cohen, 1985; 文室ら, 1988). しかしながら, その最適条件については検討されていない. 鉢上げ・順化によって植物体が糖の存在しない培地へ移植され, 従属栄養から独立栄養へと変化することにより, 環境条件が個体の生育に及ぼす影響がより大きくなると考えられることから, 本実験ではまず環境条件の検討から行った. その結果, 茎頂培養時と同じ条件下で順化した場合に多くの個体が生存することが確かめられた. いっぽう $\pm 6^{\circ}\text{C}$ の温度の違いは, 順化時の個体の生存に大きな影響を及ぼし, 順化時における正確な環境条件の設定の必要性を示唆した. 日高・梶浦 (1989) もカンキツの順化における温度調節の重要性を認め, まず管瓶内で順化を行い, その後ミストハウス内で順化する「2段階順化法」を試み, 良好な結果を得ている.

カキにおける 16 時間日長での茎頂培養の結果 (鉄村ら, 1991) と, 連続照明での結果 (村山ら, 1989) を比較してみると, 'Nagara' を除いて最大シュート長はほぼ同じである. しかしながら本実験では, 16 時間日長で生育した個体よりも連続照明下で生育した個体の方が, シュート長, 葉色やシュートの太さのいずれにおいても優れていた. このことは鉢上げ・順化において, 光条件が個体の生育に及ぼす影響が大きいことを示している. ただし順化操作によって培養容器のふたを開けた結果, 個体が接するガス環境に大きな変化が生じると推察されることから CO_2 濃度との関係も明確にする必要があると考えられる. いっぽう, この光条件の違いによる順化中の個体の生長の差は, 実験 1. の 28°C , 16 時間日長区 ($60 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$) の光エネルギー量が, 実験 2. の $30 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$ 区と $60 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$ 区 (いずれも連続照明) との間にあり, その生存率やシュート長の結果も同様の傾向を示していることから, 日長の違いによるものではなく, 光エネルギー量の違いによるものであろう.

したがって人工気象器内の光量を高めることは, 個体の生存および生長に有効な手段であるが, 鉢上げ・順化に最適な光量がどの程度であるかは本実験だけでは明らかでなく, 前述の CO_2 濃度との関係において実験を進める必要がある.

発根処理後の鉢上げ時期に関して, Simmonds (1983) はリング台木 M. 26 のシュートの鉢上げにおいて, 発根処理後できるだけ早く鉢上げを行った方が

活着率が高くなることを認め, 直接挿しを行って多くの培養苗を得ている. いっぽうツバキ 'Alba Plena' においては IBA による発根処理後 12 日目に, まだシュートが発根していない状態で鉢上げすると, 発根処理直後や発根処理後 4 週目に鉢上げするよりも多くの個体が生存し (Vieitez ら, 1989), またケヤキの培養苗は発根培地での培養期間が 6~8 週間では根が未発達で活着率も低かったが, 10~12 週間になると 90% 以上が活着した (富田, 1992) ことが報告されている. 本実験におけるカキ '西村早生' の場合では IBA 処理後, シュートのある程度の期間, 発根培地に植え付けておく必要のあることが明らかとなり, その期間は 20 日間程度がもっとも良かった.

本実験に用いたシュートはすべて長さ 15 mm 以上, 葉数 3 枚以上とした. これは *Euphorbia fulgens* のマイクロカッティングの順化に関する試験で, シュートの長さが順化中の生存率に大きな影響を及ぼすこと (Zhang・Stolz, 1989), またカキに関しても文室ら (1988) が順化中の生存率にシュートの充実度が重要であることを示唆しているのを考慮したからである. 今後, 他の品種でも鉢上げ・順化に関する実験を行う予定であるが, 充実したシュートを使用することが必要であろう.

鉢上げ個体の圃場における植え付け 1 年目の生育はきわめて順調であった. このことは屋外で活着すると, その後は従来の苗木と同様の扱いで十分であることを示している. カキは植え傷みの激しい果樹であるが, 組織培養によって得られた苗木は実生と比べて根系が発達していることが示されている (田尾ら, 1992). 今後は従来の実生台木に接ぎ木した個体と比較して生育状況を調査する必要がある.

組織培養によって得られた果樹苗木の rejuvenation や precocity は非常に重要な問題である. 圃場に直接植え付けた個体に着花は認められなかったが, 鉢植え個体の一部に着花が認められた. これは茎頂培養によって rejuvenation は引き起こされなかったことを示しており, 同じ '西村早生' を鉢上げした文室 (1992) の結果や, 茎頂培養由来の '次郎' の結果 (田尾ら, 1992) とも一致している.

摘 要

カキ (*Diospyros kaki* Thunb.) '西村早生' の茎頂培養より得たシュートを用い, 鉢上げ・順化に関する諸条件の検討を行うと同時に, 一部の個体を圃場に移植しその生育状況を調査した. 順化時の温度は 28°C が最

も良く、多くの個体が生存したが、22℃あるいは34℃ではほとんどの個体が枯死した。連続照明で順化した個体の方が16時間日長で順化した個体よりも生育が優れていた。人工気象器内の光合成有効光量子束を高めることは、個体の生存および生長に有効であった。IBAによる発根促進処理直後に鉢上げするとすべての個体が枯死した。発根培地においてある程度発根を誘導してから鉢上げを行うとほとんどの個体が生存したが、発根培地で20日間培養してから鉢上げした個体の生長が最も良かった。屋外に搬出した鉢上げ個体は順調に生育したが、鉢植えしたものよりも圃場に直接植え付けたものの方が生長が優れた。鉢植え個体の一部に雄花および雌花の着花が認められ、茎頂培養によるrejuvenationは起こらなかったことが示された。

引用文献

- Cooper, P. A. and D. Cohen. 1985. Micropropagation of Japanese persimmon (*Diospyros kaki*). Comb. Proc. Inter. Plant Prop. Soc. 34(1984): 118-124.
- Fabbri, A., E. Sutter and S. K. Dunston. 1986. Anatomical changes in persistent leaves of tissue-cultured strawberry plants after removal from culture. Scientia Hort. 28: 331-337.
- Fukui, H., M. Sugiyama and M. Nakamura. 1989. Shoot tip culture of Japanese persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.). J. Japan. Soc. Hort. Sci. 58: 43-47.
- 福井博一・野崎国芳・中村三夫. 1989. カキ‘富有’の培養シュートの葉からの不定芽形成. 園学雑. 58 (別2): 58-59.
- 文室政彦・村山秀樹・田尾龍太郎・村田龍一・杉浦明. 1988. カキのわい性台木の育成に関する研究(第1報). 組織培養による西村早生わい性系統の繁殖. 滋賀農試研究報告. 29: 20-32.
- 文室政彦. 1992. カキ‘西村早生’における組織培養由来樹の着花および結実性. 園学雑. 61 (別1): 122-123.
- Grout, B. W. and S. Millam. 1985. Photosynthetic development of micropropagated strawberry plantlets following transplanting. Ann. Bot. 55: 129-131.
- 日高哲志・梶浦一郎. 1989. 組織培養により得られたカンキツ植物体の簡易順化法. 果樹試報. B16: 19-28.
- 加々美 裕・鹿野英士・荒木勇二. 1991. カキ *In vitro* 増殖シュートの発根に及ぼす糖類の効果. 園学雑. 60 (別2): 158-159.
- 小崎 格・野間 豊. 1990. 果樹苗生産とバイオテクノロジー. p. 31-32. 博友社. 東京.
- 村山秀樹・田尾龍太郎・田中辰美・杉浦 明. 1989. カキ数品種の *in vitro* でのシュート増殖と発根. 園学雑. 58: 55-61.
- Simmonds, J. 1983. Direct rooting of micropropagated M. 26 apple rootstocks. Scientia Hort. 21: 233-241.
- Sugiura, A., R. Tao, H. Murayama and T. Tomana. 1986. *In vitro* propagation of Japanese persimmon. HortScience 21: 1205-1207.
- Tao, R., H. Murayama, K. Moriguchi and A. Sugiura. 1988. Plant regeneration from callus cultures derived from primordial leaves of adult Japanese persimmon. HortScience 23: 1055-1056.
- Tao, R., M. Tamura, K. Yonemori and A. Sugiura. 1991. Plant regeneration from callus protoplasts of adult Japanese persimmon (*Diospyros kaki* L.). Plant Science 79: 119-125.
- 田尾龍太郎・伊藤 準・杉浦 明. 1992. カキの茎頂培養における発根の改善と鉢上げ個体の生育特性. 第3回植物組織培養コロキウム講演要旨集. 100-101.
- 立松伸夫・平野三男・細野満典・河野 満. 1988. カキの組織培養に関する研究(第1報) カキ台木の大量増殖. 園学要旨. 昭63秋: 162-163.
- 鉄村琢哉・田尾龍太郎・杉浦 明. 1991. サイトカイニンの種類がカキの *in vitro* 繁殖に及ぼす影響. 植物組織培養. 8: 209-211.
- 富田正徳. 1992. ケヤキ培養苗の発根および順化の諸条件. 植物組織培養. 9: 34-38.
- Vieitez, A. M., M. C. San-Jose and A. Ballester. 1989. Progress towards clonal propagation of *Camellia japonica* cv. Alba Plena by tissue culture techniques. J. Hort. Sci. 64: 605-610.
- Yokoyama, T. and M. Takeuchi. 1981. The induction and formation of organs in callus cultures from twig of mature Japanese persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.). J. Japan. Soc. Hort. Sci. 49: 557-562.
- Zhang, B. and L. P. Stoltz. 1989. Acclimatization systems for *Euphorbia fulgens*. HortScience 24: 1025-1026.