花ウメ品種の in vitro におけるシュートの増殖および発根

村井泰広・原田 久・高木敏彦

静岡大学農学部 422 静岡市大谷 836

In vitro Shoot and Root Proliferation in Flowering Mume Cultivars

Yasuhiro Murai, Hisashi Harada and Toshihiko Takagi

Faculty of Agriculture, Shizuoka University, Shizuoka 422

Summary

Optimal micropropagational conditions for shoot proliferation and rooting in vitro were investigated using 3 flowering mume cultivars, Ichinotani, Hakubotan and Yae-bungo. The effects of three types of cytokinin and their concentrations on shoot proliferation were tested with 'Ichinotani'.

1. Benzyladenine (BA) at 5 or 10 μ M was most effective for shoot proliferation, whereas zeatin (Zn) was not; however, BA and Zn were both effective for shoot elongation. N-(2-chloro-4-pyridyl)-N-phenylurea (CPPU) had little effect on shoot proliferation and shoot elongation.

2. The use of sorbitol, sucrose and glucose on survival rates, shoot proliferation and shoot elongation on the three cultivars revealed that the survival rate was higher on the medium containing sorbitol than on the medium containing sucrose or glucose. Sorbitol was also most effective for shoot proliferation, whereas glucose was most promotive for shoot elongation. Sucrose had little effect on shoot proliferation and shoot elongation.

3. IBA treatments enhanced rooting. Except for 'Ichinotani', the number of roots and rooting percentages were higher as IBA concentration increased. For 'Ichinotani', optimal IBA concentration was 1 μ M. Dark treatment for 10 days in combination with 1 μ M IBA gave higher rooting percentages and number of roots than those receiving IBA treatment alone.

緒 言

ウメは中国原産の落葉小高木で古来より栽培されてきた。ウメの栽培品種は観賞用の花ウメと果実用の実ウメに分化してそれぞれ発達してきた。現在、本邦では花ウメで約 300 品種が確認されており (Yoshida, 1994), 絶滅の危機に瀕している希少品種も多い。これらの品種は開花期, 花型, 花色等が変異に富んでおり, 野梅性, 紅梅性, 豊後性および杏性に分類されている (大坪, 1993)。また, これらの品種は優良形質を保持している可能性もあり育種上重要な遺伝資源と考えられる。よって, これらの品種について in vitro での培養系を確立すれば, 大量増殖による苗生産や遺伝子導入による形質転換など最近の交配育種にかわる

バイオテクノロジー技術を用いたウメ育種に役立つものと思われる。しかし, ウメの in vitro での増殖に関する報告は少なく, 実ウメに関する筆者 (原田ら, 1994) らの報告および胚や子葉組織による増殖の報告がわずかにあるのみである (岩本ら, 1990; 中川ら, 1994)。

そこで, 本研究では花ウメ品種の培養系確立のため, 豊後性と杏性に属する品種を用い in vitro でのシュートの増殖と発根の最適条件を検討した。

材料および方法

供試樹は静岡市丸子の丸子梅園栽植の花ウメ品種, '八重豊後', '白牡丹', '一の谷' の計 3 品種を用いた。なお, 用いた品種は '一の谷' が杏性で他の 2 品種は豊後性の品種であった。1994 年 4 月下旬に各品種のよくそろった新梢を採取し, 摘葉後, えき芽を含む一節

1995 年 10 月 31 日 受理。

ごとに切り分け、流水で約1時間洗浄後、70%エタノールに2分間、Tween 20を0.1%添加した1%次亜塩素酸ナトリウム溶液に25分間それぞれ浸漬後、滅菌水で3回すすいだ。得られた外植体を筆者らの以前の報告(原田ら, 1994)で初代培養に適当であったLloyd・McCown (1980)のWoody Plant Medium (WP培地とする)を基本培地とし、6-ベンジルアデニン (BA) $5\text{ }\mu\text{M}$ 、ソルビトール3%、寒天0.7%をそれぞれ添加した培地に植え付けた。なお、培地はpH 5.8に調整し、直径22 mm×高さ115 mmのガラス管に10 mlずつ分注後、ポリプロピレン製のキャップで栓をし、 $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、20分間オートクレーブで加圧滅菌した。培養条件は $26\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、16時間日長、 $40\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ とした。外植体のえき芽から得られたシュートは同じ培地で3週間ごとに継代培養し、得られたシュートを以下の実験に供試した。なお、以下のすべての実験の培養条件は上記と同様とした。

実験1. シュートの増殖に及ぼすサイトカイニンの影響

基本培地であるWP培地にソルビトール3%、寒天0.7%を添加し、サイトカイニンとしてBA、ゼアチンおよびCPPU (N-(2-chloro-4-pyridyl)-N-phenylurea)のいずれかを2, 5, $10\text{ }\mu\text{M}$ の濃度で添加した培地に前述の継代培養(約100日間)で得られた長さ1 cm程度の‘一の谷’のシュートを植え付けた。植え付け後、30日間培養し、シュート数、最大シュート長を測定した。なお、シュート数は長さ2 mm以上のものをシュートとみなし測定した。各処理区とも供試個体数は20個体とした。

実験2. シュートの増殖に及ぼす糖の影響

WP培地に寒天0.7%、BA $5\text{ }\mu\text{M}$ を添加し、糖としてソルビトール、スクロースおよびグルコースをそれぞれ3%を添加した培地に前述の継代培養(約180日)で得られた‘白牡丹’、‘八重豊後’および‘一の谷’のシュートを植え付けた。シュートの長さは約1 cm程度のものを植え付けた。培養は30日間行ない、生存率、シュート数、最大シュート長を測定した。なお、シュート数については長さが2 mm以上のものと2 mm以下のものとに分けて測定した。供試個体数は各処理区とも20個体とした。

実験3. シュートからの発根および順化

WP培地に寒天0.7%、ソルビトール3%、オーキシシンとしてインドール酪酸 (IBA) を0, 1, $2\text{ }\mu\text{M}$ のいずれかを添加した培地に継代培養(約180日)で得

られた15 mm程度のシュートを1本ずつ植え付け、30日間培養後、発根率、発根個体当たりの平均根数を測定した。なお、各処理区とも供試個体数は15個体とした。また、発根に及ぼす暗黒処理の影響を調査するために継代培養(約200日)で得られた‘白牡丹’および‘一の谷’のシュートをIBA $1\text{ }\mu\text{M}$ 、ソルビトール3%、寒天0.7%を含んだWP培地に植え付けた。暗黒処理は試験管を10日間遮光した後、通常の培養条件に戻した。対照区は前述の培養条件のまま培養した。両処理区とも30日間培養後、発根率と発根個体当たりの平均根数を測定した。供試個体数は15個体とした。順化は5月にバーミキュライト:パーライト=1:1 (v/v)をポットに入れ、発根した個体を植え付け、ミスト条件下で行なった。なお、ミストは40分間に20秒間噴霧した。

結果および考察

実験1. シュートの増殖に及ぼすサイトカイニンの影響

‘一の谷’のシュートの増殖に及ぼすサイトカイニンの種類とその濃度の影響を第1表に示した。すなわち、シュートの増殖がもっとも促進されたサイトカイニンはBAであり、シュート数は濃度が5または $10\text{ }\mu\text{M}$ 添加区でともに9.4本で最大となった。一方、ゼアチンでは濃度が高くなるほどシュート数の増加がみられたが、BAほど増殖促進効果は認められず、もっともシュート数の多かった $10\text{ }\mu\text{M}$ 添加区でもBA 5または $10\text{ }\mu\text{M}$ 添加区の半分以下となった。また、CPPUでも濃度が高い方がシュート数の増加がみられたが、もっともシュート数が多くなった $10\text{ }\mu\text{M}$ 添加区でも2.5本となり、BAやゼアチン添加区よりもかなり少なくなった。一方、最大シュート長はBA添加区においてシュート数とは逆に濃度が低い方が値が大きくなり、濃度が $2\text{ }\mu\text{M}$ 添加区で最大の14.5 mmとなった。ゼアチンではいずれの濃度でも他のサイトカイニン添加区より伸長が促進され、もっとも促進されたのは濃度が $5\text{ }\mu\text{M}$ 添加区の21.7 mmであり、同じ濃度のBA添加区の2倍以上となった。CPPU添加区でも濃度が低いほうがシュートの伸長が促進されたが、他のサイトカイニン添加区よりも明らかに劣り、6~8 mm程度であった。一般にシュートの増殖においてサイトカイニンとしてはBAやゼアチンが多く使われる。BAは濃度が高くなるとシュートの増殖は促進されるが、シュートの伸長が抑制されることが知られている。また、ゼアチンはシュートの増殖も促進するが、他のサイト

カイニンと比較してシュートの伸長に効果的な場合が多い (富田, 1993). 本実験においても同様であり, シュートの増殖には BA がもっとも効果的であり, その最適濃度は 5 または 10 μ M 添加区であった. また, シュートの伸長にはゼアチンが最適で 5 μ M 添加区がもっとも効果的であった. 最近, 開発された尿素系の合成サイトカイニンの CPPU は, シュートの増殖に使用された例はアーモンドなどでみられる程度である (Uematsu ら, 1987). 本剤は, リンゴの子葉のカルスやキウイフルーツの節間のカルスからのシュート分化に効果的であるとする報告が多い (劉ら, 1994; 志村ら, 1990). 花ウメにおいては CPPU の添加でシュート基部のカルス形成は促進するものの, シュートの増

殖はほとんどみられず, ウメのシュートの増殖には本剤は不適当と考えられた.

実験 2. シュート増殖に及ぼす糖の影響

各品種のシュートの増殖に及ぼす糖の影響は第 2 表に示す通りである. シュートの生存率はいずれの品種でもソルビトール添加区は 100% であった. スクロースまたはグルコース添加区では '一の谷' で 100% であったが, '白牡丹', '八重豊後' では若干低くなった. また, いずれの品種もスクロースまたはグルコース添加区では基部や葉の褐変が多くみられた. 一方, いずれの品種でも 2 mm 以上のシュートの数はソルビトール添加区がスクロースやグルコース添加区よりも多くなった. その程度は品種により異なり, '一の谷' がもっとも増殖が促進された. 長さ 2 mm 以下のシュート数については '一の谷' や '八重豊後' ではソルビトール添加区で他の糖添加区よりかなり多くなったが, '白牡丹' ではほとんど差異がみとめられなかった. 最大シュート長はいずれの品種もソルビトールやスクロース添加区において 12~13 mm 程度で差異が認められなかったが, グルコース添加区ではいずれの品種も 15~20 mm とシュートの伸長がもっとも促進された. 一般にシュートの増殖において培地中の糖はスクロースが多く使われる. しかし, 培地中の糖の種類がシュートの増殖に影響を及ぼすとする報告もみられる (石田ら, 1989; Marino ら, 1993). すなわち, アンズやニワウメなどについてはスクロースよりもソルビトールのほうがシュートの増殖に効果的であった. 以前, 筆者らはアンズ '平和' やウメ '南高' のシュートの増殖においてスクロースを添加した WP 培地で培養した

Table 1. Effects of cytokinin types and their concentrations on in vitro shoot proliferation from microcuttings of flowering mume cv. Ichinotani.

Cytokinin	Concentration (μ M)	No. of shoot	Length of the longest shoot (mm)
BA	2	5.9 $\pm$ 0.5 ^z	14.5 $\pm$ 0.5 ^z
	5	9.4 $\pm$ 0.6	12.8 $\pm$ 0.6
	10	9.4 $\pm$ 0.8	11.0 $\pm$ 0.6
Zeatin	2	1.5 $\pm$ 0.2	16.8 $\pm$ 1.4
	5	1.6 $\pm$ 0.1	21.7 $\pm$ 1.4
	10	4.2 $\pm$ 0.4	18.0 $\pm$ 1.4
CPPU	2	1.6 $\pm$ 0.2	8.0 $\pm$ 0.5
	5	1.7 $\pm$ 0.2	6.5 $\pm$ 0.5
	10	2.5 $\pm$ 0.4	6.1 $\pm$ 0.5

^z Mean $\pm$ standard error. Twenty shoots were tested in each treatment.

Table 2. Effect of carbon source on in vitro shoot proliferation from microcuttings of flowering mume cultivars.

Cultivar	Carbon source	Survival rate (%)	No. of shoot		Length of the longest shoot (mm)
			2mm > length	2mm $\leq$ length	
Ichinotani	Sorbitol	100	2.6 $\pm$ 0.4 ^z	7.8 $\pm$ 0.9 ^z	12.9 $\pm$ 1.1 ^z
	Sucrose	100	0.7 $\pm$ 0.2	3.8 $\pm$ 0.4	13.9 $\pm$ 0.9
	Glucose	100	0.6 $\pm$ 0.4	3.6 $\pm$ 1.0	16.2 $\pm$ 0.9
Hakubotan	Sorbitol	100	1.6 $\pm$ 0.3	4.7 $\pm$ 0.6	12.6 $\pm$ 1.0
	Sucrose	85	1.8 $\pm$ 0.5	4.0 $\pm$ 0.7	12.4 $\pm$ 0.5
	Glucose	95	1.7 $\pm$ 0.6	4.6 $\pm$ 0.9	15.4 $\pm$ 1.0
Yae-bungo	Sorbitol	100	1.9 $\pm$ 0.7	3.7 $\pm$ 0.7	12.6 $\pm$ 0.5
	Sucrose	100	0.4 $\pm$ 0.2	1.6 $\pm$ 0.3	12.8 $\pm$ 0.6
	Glucose	95	0.3 $\pm$ 0.1	1.1 $\pm$ 0.1	20.2 $\pm$ 1.6

^z Mean $\pm$ standard error. Twenty shoots were tested in each treatment. Each carbon source was added to WP medium containing 5 μ M BA and 0.7% agar.

ところ、ほとんどのシュートの増殖が不良で枯死する個体もみうけられた（データ未発表）。これらと本研究の結果を合わせ考えると、バラ科植物体内の糖の転流形態がソルビトールとされることから（Coffin ら, 1976）、培地におけるソルビトールは糖の中でもっとも利用されやすい形態であり、ウメのシュートの増殖にもソルビトールがもっとも効果的であると考えられた。

Table 3. Effect of IBA concentrations on in vitro rooting from microcuttings of flowering mume cultivars.

Cultivar	IBA concentration (μ M)	Rooting (%)	No. of roots per rooted shoot
Ichinotani	0	13.0	3.0 ± 1.0^z
	1	93.3	4.9 ± 0.6
	2	60.0	5.1 ± 0.6
Hakubotan	0	0	—
	1	40.0	2.5 ± 0.7
	2	93.3	3.1 ± 0.4
Yae-bungo	0	0	—
	1	46.7	1.9 ± 0.3
	2	73.3	2.4 ± 0.3

^z Mean $\pm$ standard error. Fifteen microcuttings were tested in each treatment. Each rooting medium contained 3% sorbitol and 0.7% agar.

Fig. 1. Root formation on a shoot of flowering mume cv. Hakubotan.

実験 3. シュートからの発根および順化

各品種のシュートからの発根率を第3表および第1図に示した。品種‘一の谷’はいずれのIBA濃度でも発根率がすぐれており、オーキシンプリーの培地でも13.0%の発根個体が得られた。IBA濃度と発根率との関係は‘八重豊後’と‘白牡丹’において濃度が高いほど発根率が高く、平均根数が多くなるが、‘一の谷’では2 μ M添加区でシュート基部のカルス形成が著しくなり、逆に発根率が低くなった。ウメは挿し木による発根が困難とされており、一般には接ぎ木繁殖がされている（猪崎・丸橋, 1989）。しかし、今回、in vitroで増殖したシュートではオーキシンプリーやIBA 1 μ M添加区のような低い濃度で発根することが明らかになった。カキやニホンナシも発根困難な樹種であり、in vitroでシュートを何代も継代培養を重ねると発根が容易になるといわれている（Banno ら, 1989; Tao ら, 1994）。本実験でも継代培養を180日程度行なったシュートで発根実験を行なっているため、カキなどと同様に発根率の上昇が起こったとも考えられる。一方、‘白牡丹’および‘一の谷’に10日間の暗黒処理を施したところ、1 μ MのIBA添加区でもそれぞれ80%か100%の発根率が得られ、平均根数も無処理区（対照区）に比べ多くなった（第4表）。発根困難な樹種の発根に暗黒処理の効果があげられているが、これは根原体形成を促すためとされており（村山ら, 1989; Orlikowska, 1992）、これと同じ現象が本実験で起きた結果、発根の促進がみられたものと考えられる。発根した個体はミスト室に搬入し順化を試みたところ、ほとんどの個体が容易に順化できた（第2図）。

以上のように花ウメの品種はWP培地にソルビトール3%、BA5または10 μ Mを添加した培地でシュートを増殖させた後、IBA 1 μ Mを添加した発根培地

Table 4. Effect of dark treatment on in vitro rooting from microcuttings of flowering mume cultivars.

Cultivar	Treatment	Rooting (%)	No. of roots per rooted shoot
Ichinotani	Dark ^z	100.0	5.5 ± 0.3^y
	Control ^x	100.0	5.1 ± 0.4
Hakubotan	Dark	80.0	3.2 ± 0.2
	Control	53.3	2.9 ± 0.4

^z Dark treatment in combination with 1 μ M IBA treatment.

^y Mean $\pm$ standard error.

^x Control indicated IBA treatment alone.

Fig. 2. Plantlets of flowering mume 'Hakubotan' after acclimatization.

にシュートを植え付け、10日間の暗黒処理を施せば容易に発根し、小植物体が得られることが明らかになった。今回、用いた品種は豊後性と杏性のみであったが、他の系統の品種についてもシュートの増殖や発根特性を調査する必要がある。今後、培養で得られた植物の生育特性について調査する予定である。

摘 要

花ウメの品種の *in vitro* でのシュートの増殖と発根の最適条件を検討した。シュートの増殖には BA 5 または $10 \mu\text{M}$ 添加区がもっとも効果的であり、ゼアチンや CPPU では効果が少なかった。一方、シュートの伸長ではゼアチンが有効で特に $5 \mu\text{M}$ 添加区がもっとも効果的であった。また、BA や CPPU の効果は劣った。シュートの生存率および増殖に及ぼす糖の影響はソルビトールがもっとも効果的であり、スクロースやグルコースでは生存率やシュートの増殖とも劣った。シュートからの発根は IBA 1 または $2 \mu\text{M}$ 添加区で 40.0~93.3% の発根率が得られた。また、暗黒処理は発根率と平均根数を増加した。

謝 辞 本実験を遂行するにあたり貴重な材料を提供して頂いた静岡市丸子梅園園主梅田 操氏に深謝します。

引用文献

Banno, K., K. Yoshida, S. Hayashi and K. Tanabe. 1989. *In vitro* propagation of Japanese pear cultivars. J.

- Japan. Soc. Hort. Sci. 58 : 37-42.
 Coffin, R., C. D. Taper and C. Chong. 1976. Sorbitol and sucrose as carbon source for callus culture of some species of the Rosaceae. *Can. J. Bot.* 54 : 547-551.
 原田 久・佐藤仁是・村井泰広. 1994. ウメ '南高' の Micropropagation. 園学雑誌. 63 (別 1) : 8-9.
 石田雅士・松山剛士・北島 宣・傍島善次. 1989. ニワウメ (*Prunus japonica* THUNB.) の茎頂培養について. 園学雑誌. 58 : 49-54.
 猪崎政敏・丸橋 亘. 1989. ウメ. p. 128-132. 果樹繁殖法. 養賢堂. 東京.
 岩本和也・原野博実・藤田政良. 1990. ウメにおける実生個体の茎頂培養について. 園学雑誌. 59 (別 2) : 160-161.
 Lloyd, G. and B. McCown. 1980. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia* by use of shoot tip culture. *Proc. Intl. Plant Prop. Soc.* 30 : 421-427.
 劉 明広・荻原 勲・箱田直紀・志村 勲. 1994. リンゴ子葉カルスからのシュート形成に及ぼす BA, TDZ および CPPU の影響. 園学雑誌. 63 : 505-514.
 Marino, G., G. Bertazza, E. Magnanini and A. D. Altan. 1993. Comparative effects of sorbitol and sucrose as main carbon energy sources in micropropagation of apricot. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 34 : 235-244.
 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. 園学雑誌. 58 : 55-61.
 中川文雄・冬廣吉朗・山本 仁・渡辺 毅. 1994. ウメ未熟子葉由来カルスからの不定芽形成. 園学雑誌. 63 (別 1) : 88-89.
 大坪孝之. 1993. 趣味の園芸作業 12 か月. ウメ. p. 140-146. 日本放送出版協会. 東京.
 Orlikowska, T. 1992. Influence of arginine on *in vitro* rooting of dwarf apple rootstock. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 34 : 235-244.
 志村 勲・樋口幸男・石川駿二. 1990. 4-ピリジル尿素処理によるキウイフルーツ節間カルスからのシュート形成. 園学雑誌. 58 : 841-847.
 Tao, R., J. Ito and A. Sugiura. 1994. Comparison of growth and rooting characteristics of micropropagated adult plants and juvenile seedlings of persimmon (*Diospyros kaki* L.). *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 63 : 537-541.
 富田正徳. 1993. ケヤキ茎頂培養に及ぼすサイトカイニンの種類と濃度の影響. 植物組織培養 10 : 67-70.
 Uematsu, C., T. Akihama and C. Inokuma. 1987. Propagation of almond by shoot tip culture. *Japan. J. Breed.* 37 : 464-468.
 Yoshida, M. 1994. Mume. p. 37-38. Horticulture in Japan. Asakura Press, Tokyo.