

茎頂培養によるカキ台木の大量増殖

松本 敏一*・山田 員人*

Micropropagation of a Japanese Persimmon Rootstock (*Diospyros Kaki* THUNB.) by Stem Tip Culture

Toshikazu MATSUMOTO and Kazuto YAMADA

I 緒 言

カキ (*Diospyros kaki* THUNB.) は、我国の代表的な果樹の一つであるが、樹高が高くなり過ぎることが栽培上、大きな問題となっている。すなわち、作業性、収量、品質等から、樹高は低く抑える必要があり、これには苗生産の段階でわい性台木の利用が注目されている。ところが、カキの台木は同じカキの種類から選択されるが、一般に挿し木による増殖が極めて困難であるため、形質の揃ったわい性台木を大量に得ることができない。そのため、苗生産は実生台木に穂木を接ぐ方法で行われているが、台木の影響を受けるため苗の形質に不揃いが生じている。このような理由で、優良形質のわい性台木の大量増殖が強く要望されてきた。

カキの *in vitro* 繁殖については最近、茎頂培養^{1,2,7,11,13)}、不定芽形成^{5,12,15,18,19,20,21)}、不定胚形成⁴⁾等の報告がみられ、ほとんど実用化に近い段階にきている。しかし、その培養法、特にシュートからの発根については品種間差異¹¹⁾があり、すべての品種について安定的な技術として確立しているとはいえない。

筆者らは、*in vitro* 繁殖のうち遺伝的に最も安定したクローンの得られる茎頂培養法を用いて、カキ台木の

大量増殖法について検討を行ったのでその結果を報告する。

なお、本研究の一部は農林水産省の地域バイオテクノロジー研究開発事業による助成を受けた。また、当場開発営農科河野良洋科長からは、材料提供を受けた。ここに記して感謝の意を表する。

II 試験方法

1. 茎頂からのシュートの再生と生育

実験用の原材料のシュートは、当场保存の‘台木用実生1号’ (以下‘実生1号’) の休眠枝の茎頂を約3年間継代培養したものをを用いた。継代培養は、MS培地¹⁰⁾のNH₄NO₃及びKNO₃を1/2に希釈した1/2 MS培地¹³⁾を用い、25°C、3,000 μ 、16時間日長の条件で行った (特記しない限り、以下の実験同様)。

1) 培地及びホルモンの種類と濃度

培地は、Gellan gum 0.2%で固化した1/2 MS及びWPM⁹⁾を用いた。また、ホルモンは、BA (6-Benzyladenin) を0, 1.0, 5.0, 10.0mg/l, NAA (α -naphthylacetic acid) を0, 0.1, 1.0mg/lの濃度でそれぞれ組み合わせた。

培養材料の茎頂は、シュートの先端から1mm程度に調整し、1区10個体を供試した。培養には径9mm試験管を用い、25°C、2,000~3,000 μ 、16時間日長とした (特

記しない限り以下同様). 置床30日後にシュートの再生した茎頂数を調べ, シュート再生率を算出した. また, 再生したシュートから発生している芽数を調べ, 草丈を測定し, その平均値を算出した. また, 枯死あるいはカルス化した茎頂についても調査した.

2) 培養条件

培地は, しょ糖3%, BA 5mg/lを添加し, Gellan gum 0.2%で固化した1/2 MSとした(以下の実験同様). 試験区は, pH5.8, 25°C, 3,000lx, 16時間日長を標準設定とし, 温度については20°C, 日長については全日長, また培地のpHについては4.8及び6.8にそれぞれ変更した区を設けた. 材料は, 原材料のシュートを先端から約4mmの長さに調整して用い, 1区50個体を置床した. 調査は, 前実験と同様に行った.

2. 発根法

1) シュート基部へのIBA処理濃度及び発根培地におけるしょ糖とBAの濃度

培養材料のシュートは, 展葉3枚, 草丈30mm程度のものを用いた. 培地は1/2 MSとした.

試験区は, 培地組成についてはしょ糖濃度及びBAの添加を検討した. しょ糖の1%及び3%, BAの1mg/lの添加及び無添加についてそれぞれを組み合わせた区を設けた. また, シュート基部に対するIBA (Indolebutyric Acid) の60秒間浸漬処理区を設け, 処理濃度は0, 200, 400, 1,000, 2,000mg/lとした.

培養容器として200ml容メクリンフラスコを用い, 培養時は中央に直径5mmのメンブレンフィルターのついたアルミ箱で蓋をし, 500lxの照度で培養した(以下の実験同様). 1区20個体を用い, 調査は, 60日後に置床シュートに対する発根及び枯死個体数を調査し, それぞれ発根率及び枯死率を算出した.

2) BA添加とシュートの生育程度及び発根

原材料のシュートを草丈10mm程度に調整して供試した. 試験区は, 1/2 MS培地(しょ糖3%)を用いてBAを添加(1mg/l)した区と無添加区を設けた. 1区当たり, BA無添加区では10個体, 添加区では50個体を用い, 30日後のシュートの生育を草丈によって, 10mm未満, 10~30mm, 30mm以上の3段階に分類し, それぞれの発根数と枯死数を調べ, その率を算出した.

3. 順化法

材料は, '西条'の種子内の胚を培養して得られ

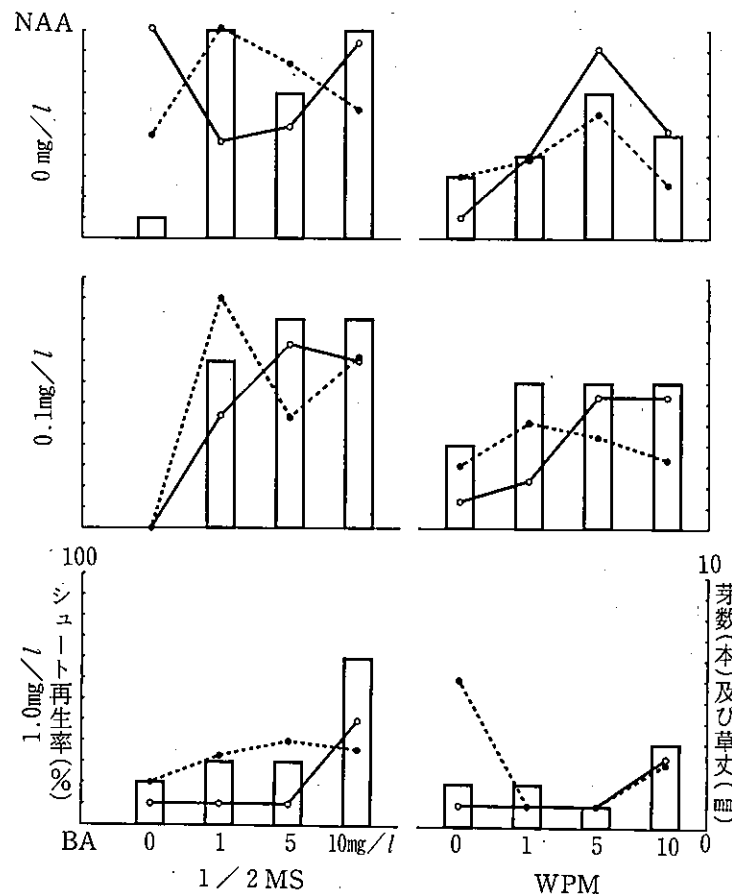
た展葉3~4枚の幼植物体とした. 用土は, 水苔, パーミキュライトのほかにパーミキュライトとピートモスを1:1で混合したものを用いた. また, 灌水法については, 60秒間, 10分間隔, 1日22回のミスト散布法及び鉢下の受け皿に水を張った底面吸水法について検討した. 試験区としては, これらの用土と灌水法をそれぞれ組み合わせた区を設けた. なお, 灌水区においては, 鉢上部を育苗箱で7日間被覆した. 順化は, 15~35°Cの無空調ガラス室で行い, 1区10~11個体を用い, 鉢上げ30日後に生存個体数について調査した.

III 結果

1. 茎頂からのシュートの再生と生育

1) 培地及びホルモンの種類と濃度

シュートの再生と生育に対する培地の影響をみた結果は, 第1図に示した. これによれば, NAAとBAの添加の有無及びその量にかかわらず, 1/2 MSがWPMよりシュートの再生及び生育が全般に優れる傾向にあった.



第1図 台木用カキのシュート生育に及ぼすホルモン及び培地の影響

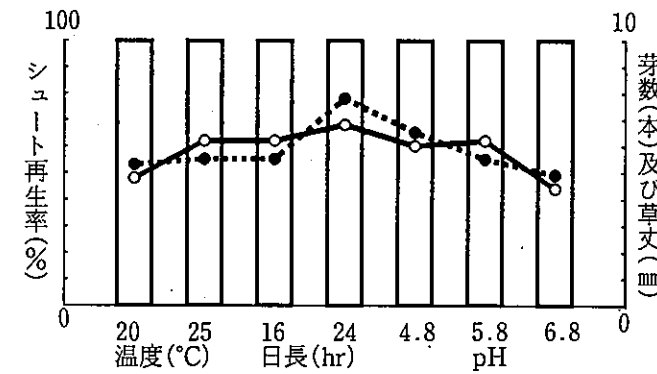
□ シュート再生率 ○ 芽数 ● 草丈

1/2 MSを用いた場合, NAAの無添加又は0.1mg/lを添加し, 更にBAを加えることによりシュートの再生率が高くなった. しかし, NAAを1.0mg/l添加した場合には枯死あるいはカルス化する傾向がみられた(データ省略). シュートから発生した芽数は, 再生率の低かったホルモンフリー区を除けば, BA10mg/l単用区, 次いでNAA0.1mg/lにBA 5mg/l又は10mg/l添加区で多かった. また, シュートの草丈についてはBA 1mg/l単用区又はそれにNAA0.1mg/lを組み合わせた区が良好であった.

一方, WPMを用いた場合は, シュートの再生率が最高でも70%と低く, また, シュートの芽数や草丈についても多くの区で1/2 MSの場合と比べ劣った.

2) 培養条件

培養条件とシュートの再生及びシュートから発生した芽数とシュートの草丈との関係について検討した結果を第2図に示した. シュートの再生は, 各区とも96



第2図 培養条件とシュートの生育

● シュート再生率 ○ 芽数 □ 草丈

~100%で極めて高く, 区間差もほとんど認められなかった. 芽数と草丈については, まず, 温度との関係は, 20°Cに比べ25°Cが明らかに芽数が多かったが, 草丈についてはほとんど差がみられなかった. 日長については, 16時間より全日長において芽数が多く, 草丈も高かった. また, pHについては, 4.8と5.8がほぼ同等で6.8に比べ多く, 草丈はpHが高くなるに従って劣った. すなわち, pHが高くなるに従って生育が劣る

第3表 BA添加及びシュートの生育程度と発根

処理区	シュートの生育程度別発根率 (%)			計	枯死率 (%)
	10mm未満	10~30mm	30mm以上*		
BA 1mg/l	11	20	78	26	5
無添加	0	0	50	20	40

注) *調査時におけるシュートの草丈

傾向にあったが, 4.8と5.8の間の差は少なかった.

総合的にみて, 日長の影響が大きく, 24時間照明で, pH5.8, 25°Cの条件が最も適し良好であった.

2. 発根法

1) シュート基部へのIBA浸漬処理

IBA浸漬処理をした結果を第1表に示した. 発根率

第1表 IBA浸漬処理とシュートの発根

IBA濃度	発根率 (%)	枯死率 (%)
0 mg/l	10	0
200	18	10
400	25	50
1000	28	30
2000	4	90

は, 60日後に調査したが, 無処理区は10%と低かったのに対し, IBA処理区ではそれより高かった. その処理濃度については, 200mg/lでは低く, 400mg/l~1,000mg/lの間で高まり40~50%であった. しかし, 2,000mg/lの高濃度では発根率は著しく劣り, シュートの枯死率も高くなった.

次に, 培地中に添加するしょ糖の濃度とBAの添加が発根に及ぼす影響をみたのが第2表である. しょ糖

第2表 しょ糖濃度及びBA添加とシュートの発根

処理区	発根率 (%)	枯死率 (%)
SUC 3%	30	0
SUC 1%	40	0
SUC 3%+BA 1mg/l	25	0
SUC 1%+BA 1mg/l	20	0

SUC: しょ糖

濃度はBA無添加の場合には, 1%区が3%区より若干高い発根率となった. また, BAを添加すると発根率が低下する傾向を認め, しょ糖1%添加区では半減した.

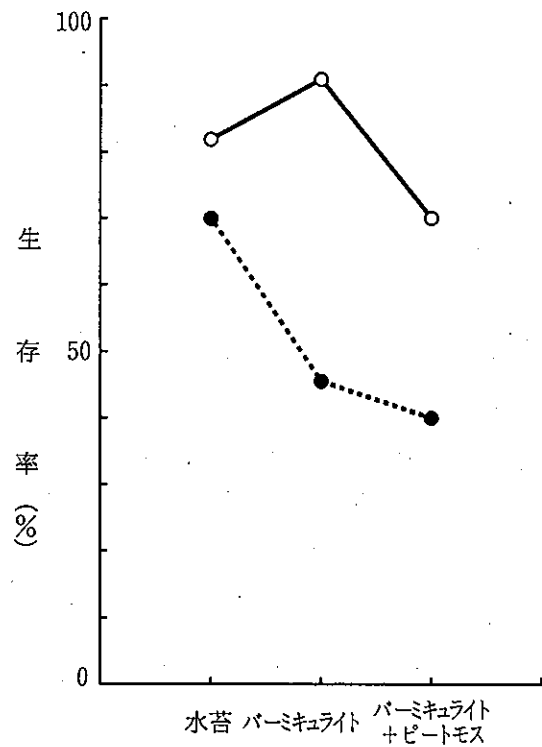
2) BA添加及びシュートの伸長程度と発根

シュートの伸長程度と発根については, 第3表に示

すとおろ、各区とも30mm以上に生育したシュートでの発根率が高く、特にBA添加区において78%の高率となった。

3. 順化法

順化处理を行った結果を第3図に示した。これによ



第3図 用土及び灌水方法と順化

○—○ 底面吸水 ●.....● ミスト散布

ると、幼植物体の順化率は、灌水方法については底面吸水条件がミスト散布条件より高く、70%以上であった。用土の種類では、底面吸水条件の場合パーミキュライト区が90%と最も高く、次いで水苔区であった。

IV 考 察

カキは自根苗生産のための栄養繁殖法が確立していないため、これまで効率的な繁殖法がないのが現状であった⁷⁾。近年、組織培養技術によるクローン植物の大量増殖が多くの植物で可能となり、カキについてもCOOPERら¹⁾から始まる一連の研究により、ほぼ確立した技術に達している⁶⁾。また、最近では、不定芽形成^{5,12,15,18,19,20,21)}、不定胚形成⁴⁾、更に薬培養¹⁵⁾、カルス培養^{14,19)}、プロトプラスト培養¹⁶⁾による植物体再生等の報告がみられている。しかし、これら研究結果

には、なお相違がみられ、培地として、COOPERら¹⁾はMSが適し、WPMは不適としたのに対し、SUGIURAら¹³⁾、FUKUIら²⁾は改変MSに次いでWPMも適すと報告している。また、ホルモンでは、SUGIURAら¹³⁾はBA、2 iP (N 6 - (2-isopentenyl) adenine) の添加で促進されたと述べているのに対し、FUKUIら²⁾はZEATINの添加の方が効果的であると報告している。本実験では、COOPERら¹⁾と同様に改変MSが適し、WPMは適さなかった。この原因は、供試材料としてCOOPERら¹⁾は‘富有’等を、SUGIURAら¹³⁾は‘平核無’を、FUKUIら²⁾は‘西村早生’等の栽培種を用いたのに対し、著者らは台木‘実生1号’を用いたためと考えられる。したがって、培養法についても用いる品種によりそれぞれ検討する必要があると考えられる。

カキの培養条件についての報告は、FUKUIら²⁾、SUGIURAら¹³⁾、YOKOYAMAら²⁰⁾が培地の種類と組成について、また、YOKOYAMAら²⁰⁾は培地添加物としてyeast extractとphytonの検討を行っているが、照明時間、培地のpH、温度についての報告はない。そこでこれらについて検討を行ったところ、カキの培養においては25°C、全日長、培地のpHは4.8~5.8の弱酸性条件が適していることが明らかとなった。

発根は、シュート基部をIBA^{3,11)}、NAM (α -Naphthylacetamide)³⁾、あるいはL-Proline、L-Hydroxyproline等のアミノ酸⁸⁾に浸漬処理、また、培地のしよ糖濃度を高める³⁾ことにより促進することが認められているが、品種間差が存在するといわれている¹¹⁾。本実験で用いた台木‘実生1号’については、西村ら¹²⁾により2 iPとIBAの共存により生存個体の30~50%で発根を認めている。IBA浸漬処理について村山ら¹¹⁾は‘平核無’を用い、0~1,000mg/lの濃度範囲で行ったところ50~250mg/lの間では濃度の上昇に伴って発根が促進され、250mg/lで最大となり、500mg/l以上では低下してシュートの生育が抑制され奇形化すると述べている。本実験では、400~1,000mg/lでの発根が適することを認めたが、発根率は25~28%程度であった。また、処理後9日間の暗黒処理が発根に効果的との報告¹¹⁾があるが、‘実生1号’では別に行った試験からは明らかな効果を認めることができなかった。

サイトカイニンの添加は発根に阻害的に働くと考えられており、‘実生1号’に対して同様なわずかに影響のあることを認めた。しかし、発根処理中のシュートの生育促進に効果があり、BA添加により生育が旺盛となった個体では80%近い高い発根率を認めた。合計で

も25%程度の発根率であり、IBA浸漬処理の場合と大差ないことが明らかとなった。また、IBA浸漬は処理時に雑菌混入の危険が高く、さらに操作が煩雑であるという問題を持っている。

以上から、‘実生1号’に対する発根法は、1/2 MSにしよ糖3%、BA 1mg/l添加した培地を用いる方法がよいと判断された。

カキの順化については、鉄村ら¹⁷⁾が‘西村早生’を用い、人工気象器内で28°C、全日長条件で80%以上の生存を認めている。しかし、この方法では電気代等のコストがかかり、また、大量に処理できない欠点を持っている。筆者らは、ガラス室を用いて用土と灌水の面から検討したところ、用土として水苔又はパーミキュライトを用い、鉢の底面に水を張った条件に保つことが順化に適することを認めた。また、順化終了後にしばしば突然落葉して休眠状態を呈するが、しばらくすると腋芽が伸長し、生育が回復する現象がみられることから、かなり高率で順化が可能であると考えられる。しかし、最低気温が15°C以下の順化は困難である。一年を通じて順化を行う場合には、空調ガラス室において、パーミキュライト用土の底面吸水状態で、植物体に直接風が当たらないようにビーカーで覆いをし、徐々に開放状態にすることにより、30日後に80%の生存率を認めている(未発表)。したがって、カキの順化はパーミキュライトを用土とし、底面吸水条件で室温15~35°Cにすることにより可能であることが明らかとなった。

V 摘 要

カキ台木用‘実生1号’を用い、茎頂培養による増殖法について検討を行った。

(1) 培地は、硝酸アンモニウムと硝酸カリウムを半分に希釈した改変MSが適し、シュートの増殖にはBA 10mg/l、伸長にはBA 1mg/lの添加が有効であった。

(2) 培養環境については、温度25°C、3,000lxの全日長、pH4.8~5.8が適していた。

(3) 発根については、1/2 MSにしよ糖3%とBA 1mg/l添加が有効であった。

(4) 順化については、‘西条’実生を用いた場合、用土にパーミキュライトが、灌水方法としては底面吸水が適していた。

引用文献

- 1) COOPER, P. A. and D. COHEN (1984): Micropropagation of Japanese persimmon (*Diospyros kaki*). Comb. Proc. Intl. Plant Prop. Soc. 34: 118-124.
- 2) FUKUI, H., M. SUGIYAMA and M. NAKAMURA. (1989): Shoot Tip Culture of Japanese Persimmon (*Diospyros kaki* THUMB.). J. Japan. Soc. Hort. Sci. 58(1): 43-47.
- 3) 福井博一・西元和男・村瀬一生・中村三夫 (1988): カキの *in vitro* での発根に及ぼす処理方法と培地中のシヨ糖濃度の影響。岐阜大農研報(53): 133-137.
- 4) FUKUI, H., K. NISHIMOTO, I. MURASE and M. NAKAMURA (1988): Somatic Embryogenesis from the Leaf Tissues of Continuously Subcultured Shoots in Japanese Persimmon (*Diospyros kaki* THUMB.). Japan. J. Breed. 38: 465-469.
- 5) 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.
- 6) 福井博一 (1991): カキにおけるバイオテクノロジーの利用と問題点。園芸学会平成元年度秋季大会シンポジウム講演要旨: 10-17.
- 7) 文室政彦・村山秀樹・田尾龍太郎・村田隆一・杉浦 明 (1988): カキのわい性台木の育成に関する研究 (第1法) 組織培養による西村早生わい性系統の繁殖。滋賀農試研報. 29: 20-32.
- 8) 加々美裕・松井俊治・鹿野英士 (1992): L-Proline および L-Hydroxyproline によるカキ *In Vitro* 増殖シュートの発根促進。園学雑61別. 2: 104-105.
- 9) LLOYD, G. and B. MCCOWN (1980): Commercially feasible micropropagation of mountain laurel (*Kalmia latifolia*) by use of shoot tip culture. Comb. Proc. Intl. Plant Prop. Soc. 30: 421-427.
- 10) MURASHIGE, T. and F. SKOOG (1962): A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497.
- 11) 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(1): 55-61.
- 12) 西村浩一郎・山田員人 (1992): カキ葉組織からの

- 不定芽形成による植物体再生. 島根農試研報. 26 : 106-113.
- 13) SUGIURA, A., R. TAO, H. MURAYAMA, and T. TOMANA (1986) : *In Vitro* Propagation of Japanese Persimmon. HORTSCIENCE.21(5) : 1205-1207.
- 14) 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 (6) : 1055-1056.
- 15) 田尾龍太郎・伊東わかば・米森敬三・杉浦 明 (1991) : カキ'夫婦柿'薬由来カルスからの不定芽形成と再生個体のアイソザイム変異. 園学雑60別. 1 : 58-59.
- 16) 田尾龍太郎・田村美穂子・米森敬三・杉浦 明 (1991) : カキ'次郎'プロトプラストからの植物体再生. 園学雑60別. 2 : 160-161.
- 17) 鉄村琢哉・田尾龍太郎・伊藤ホルヘエドワルド・行永壽二郎 (1991) : カキ'西村早生'の培養個体の化に関する研究. 園学雑60別. 2 : 156-157.
- 18) 山田員人・松本敏一・春木和久 (1987) : カキの子内胚軸部からの不定芽形成. 園学要旨. 昭62秋 154-155.
- 19) YOKOYAMA, T. and M. TAKEUCHI (1976) : Organ and plantlet formation from callus in Japanese persimmon (*Diospyros kaki*). Phytomorphology 26 : 273-275.
- 20) YOKOYAMA, T. and M. TAKEUCHI (1981) : The Induction and Formation of Organs in Callus Cultures from Twigs of Mature Japanese Persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.). J. Japan. Soc Hort. Sci.49(4) : 557-562.
- 21) YOKOYAMA, T. and M. TAKEUCHI (1988) : Relationship between Ontogenic Age and Formation of Bud from Leaf Segments in Japanese Persimmon, *Diospyros kaki*, THUNB. Plant Tissue Culture Letters. 5(1) : 6-10.

Summary

The method of micropropagation of a Japanese persimmon rootstock 'Mishou No.1' was investigated by *in vitro* culture, and the results were as follows.

1. The optimal medium for micropropagation was the modified MS with NH_4NO_3 and KNO_3 reduced to half concentration (1/2MS). Addition of 10mg/l BA was most suitable for shoot proliferation and 1mg/l B. for growth.
2. An environmental temperature of 25°C with continuous lighting and a pH maintained between 4.8 and 5 were found suitable for *in vitro* culture and growth.
3. Shoot rooting was enhanced by adding 3% sucrose and 1mg/l BA to 1/2MS medium.
4. Acclimatization that used seedlings of 'saijo' was achieved best by using vermiculite as the soil substrate and subirrigating.