

## *In vitro*でのニワウメ (*Prunus japonica* THUNB.) の不定胚および不定芽形成

片岡郁雄・植村智恵・別府賢治

### INDUCTION OF ADVENTITIOUS EMBRYO AND BUD IN CHINESE BUSH CHERRY (*Prunus japonica* THUNB.) *IN VITRO*

IKUO KATAOKA, Chie UEMURA and Kenji BEPPU

#### Abstract

Conditions inducing adventitious embryo and bud from ovule and embryo of Chinese bush cherry (*Prunus japonica* THUNB.) were studied. For induction of adventitious embryo, MS basal medium containing Gellan gum 0.2 %, sucrose (3, 6, 9 %) and 2, 4-D was used. Ovules collected before flowering did not survive on any medium. In immature embryo, active callus formation was observed on the medium containing 3 % sucrose+15  $\mu$ M 2,4-D, while adventitious embryo was induced only 2, 4-D free medium. Although the adventitious embryos were transferred to the hormone-free MS medium after low temperature treatment, they did not grow into plantlet.

For induction of adventitious buds, 1/2 MS basal medium containing Gellan gum 0.2 %, sucrose 3 % and BA and CPPU (0, 0.2, 2, 10, 20  $\mu$ M), and NAA (0, 0.2, 2  $\mu$ M) was used. From the ovules collected 10days after flowering, the callus was formed, but adventitious bud was not induced. In the cotyledons of mature embryo, adventitious buds were formed most actively on the medium with BA 10  $\mu$ M. Addition of NAA suppressed adventitious bud formation. After elongating the adventitious buds on the 1/2 MS medium with 2iP 2.5  $\mu$ M, the base of the shoots were treated with IBA 10 mM and cultured on hormone-free 1/2 MS medium. 10days after cutting, the shoots started rooting and grew up to the plantlets.

**Key Words :** Adventitious bud, Adventitious embryo, Chinese bush cherry, *In vitro*, *Prunus japonica*.

#### 緒 言

中国原産のニワウメ (*P. japonica* THUNB.) は、核果類の中では比較的耐水性が強く<sup>(1)</sup>、モモのわい性台木としての利用が検討されてきた<sup>(2)(3)(4)</sup>。しかし、在来の系統を台木として用いた場合、種々の接木不親和の症状が現れることが多く、接木親和性の優れた系統が求められている<sup>(5)(6)</sup>。この目的のために、在来系統からの選抜<sup>(3)</sup>や、ニワウメと他の*Prunus*属果樹との種間雑種<sup>(7)</sup>などが行われている。一方、優良系統の育成には培養系における変異誘発や遺伝子導入などによる改良も考えられるが、これには安定した再分化系の確立が不可欠である。本実験では、ニワウメの珠心および胚からの不定胚および不定芽の再分化条件を調査した。

#### 材料および方法

##### 実験 I 不定胚の誘導条件

##### I-1 開花前の未受精胚珠からの不定胚誘導

香川大学農学部構内の研究圃場に植栽のニワウメ (系統No. 3) 成木を用いた。開花直前の花より子房を採取し、70%エタノールに30秒浸漬した後、Tween20を0.05%加えた1%次亜塩素酸ナトリウム溶液に5分間浸漬し殺菌した。滅菌水で洗浄した後、胚珠を摘出し培養した。培地はMurashige and Skoog培地 (MS培地) を基本培地として用い、ジェランガム0.2%を加えた。これらの培地に、Sucroseを3, 6, 9%, 2,4-dichloro phenoxyacetic acid (2,4-D) を0, 15, 30  $\mu$ Mの濃度でそれぞれ組み合わせて添加した。試験管 (25×150mm) 当たり15mlの培地を入れた。培地のpHは5.7とし、オートクレーブで滅菌した。処理区当たり10反復とし、培養は27±1℃、16時間照明下で行った。

## I-2 未熟胚からの不定胚誘導

開花約45日後に幼果を採取し、子房から胚珠を摘出し、1-1と同様に滅菌処理した。無菌下で、幼胚を摘出し、幼根を取り除き子葉部分のみを培養した。処理区あたり10反復とし、培地条件は1-1と同様とした。調査はカルス形成量と不定胚形成率について行った。カルス形成量は、全くカルスが形成されていない状態を0、培地の表面全体に大量のカルスが形成された状態を10とした10段階で評価し、不定胚形成率は、不定胚が形成された外植体の割合で示した。

## 実験II 不定芽の誘導条件

## II-1 未熟胚を含む胚珠からの不定芽誘導

開花約10日後の花の子房を実験Iと同様に滅菌し、胚珠を摘出し培養した。培地は1/2 MS培地を基本培地として用い、Sucrose 3%、ジェランガム0.2%を加え、生長調節物質としてサイトカニンには6-benzylamino purine (BA) と、N-(2-chloro-4-pyridyl)-N'-phenylurea (CPPU) を用い、それぞれ濃度を0, 0.2, 2, 10, 20  $\mu\text{M}$ とした。オーキシンには1-naphthaleneacetic acid (NAA) を用い、濃度は0, 0.2, 2  $\mu\text{M}$ とした。処理区当たり24反復とし、培養条件は実験Iと同様とした。カルス形成量および不定芽形成率について行った。

## II-2 成熟胚からの不定芽誘導

開花約100日後の成熟果実を採取し滅菌後、成熟胚を摘出し、幼根を取り除いた子葉を培養した。培地は実験Iと同様の27処理区を設け、処理区当たり24反復とし、

培養条件も実験Iと同様とした。カルス形成量と不定芽形成率を調査した。

## 結 果

## 実験I 不定胚誘導

## I-1 開花前の胚珠からの不定胚誘導

約1ヶ月後、いずれの培地においても胚珠はすべて褐変し、カルス形成および不定胚形成は認められなかった。

## I-2 未熟胚からの不定胚誘導

カルス形成が最も旺盛であったのは3% Sucrose + 15  $\mu\text{M}$  2,4-D区で、次いで6% Sucrose + 2,4-D無添加区と3% Sucrose + 30  $\mu\text{M}$  2,4-D区、3% Sucrose + 2,4-D無添加区の順であった。その他の処理区ではカルス形成はわずかで、9% Sucrose + 30  $\mu\text{M}$  2,4-D区ではカルス形成は全く見られなかった(第1図)。

いずれの培地において培養6カ月頃までに一旦カルスの増殖は停止し褐変が始まったが、2,4-D無添加の処理区においては、8カ月頃から再び淡黄色のカルスが分化し始め、3%および6% Sucrose区においては新たに多量のカルスが形成された。

不定胚形成は、2,4-D無添加の6%および9% Sucrose区のみで認められた(第2図)。形成された不定胚は白色がかった半透明であった(第3図)。形成された不定胚を1% Sucroseのみを添加した1/2 MS培地に移植し、5℃で2週間低温処理後、27℃に移し培養したが、植物体の形成には至らなかった。

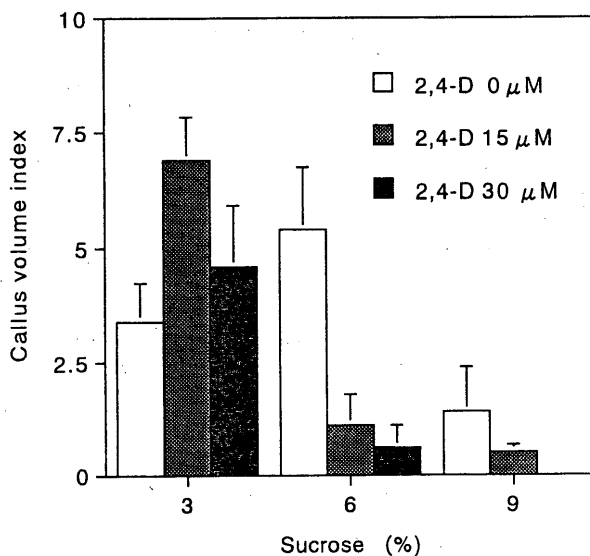


Fig. 1. Effect of sucrose and 2,4-D concentration on callus induction from immature embryo of Chinese bush cherry (*P. japonica* THUNB.). Callus volume index; no callus formation (0)~Abundant callus formation (10). Bars denote SE (n=10).

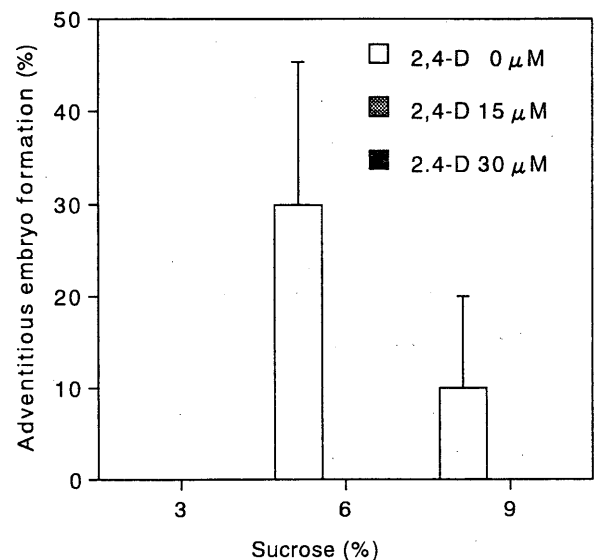


Fig. 2. Effect of sucrose and 2,4-D on adventitious embryo formation from immature embryo callus of Chinese bush cherry (*P. japonica* THUNB.). Bars denote SE (n=10).

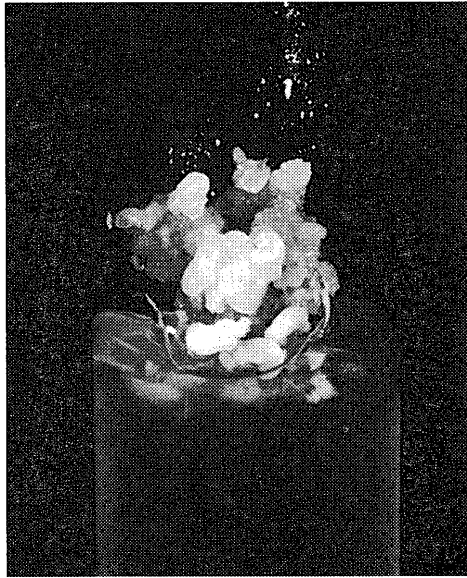


Fig. 3. Adventitious embryo of Chinese bush cherry (*P. japonica* THUNB.). induced from immature embryo on the MS medium containing 6 % sucrose.

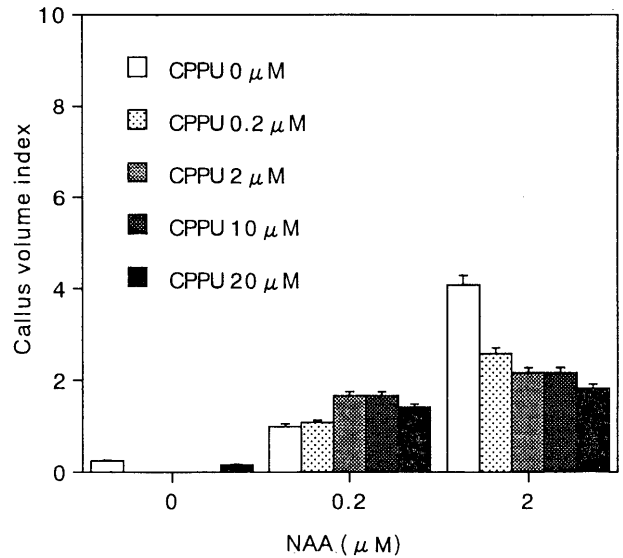


Fig. 5. Effect of CPPU and NAA concentration on callus induction from immature embryo of Chinese bush cherry (*P. japonica* THUNB.). Callus volume index ; no callus formation (0)~Abundant callus formation (10). Bars denote SE (n=24).

実験Ⅱ 不定芽の誘導

Ⅱ-1 未熟胚を含む胚珠からの不定芽誘導

NAA無添加区では、いずれの濃度のBAおよびCPPU濃度区 (0, 0.2, 2, 10, 20 μM) においても、カルス形成は認められなかった (データ省略). 2 μM NAA区においては、10および20 μM BA区、10および20 μM CPPU区でカルス形成が最も旺盛であった. 初期に形成されたカルスは淡緑色または淡黄色であったが、2~

3ヶ月目頃には鮮紅色と緑黄色のカルスが形成された. しかし、いずれの培地においても不定芽分化は認められなかった.

Ⅱ-2 成熟胚からの不定芽形成

NAA無添加区では、いずれの濃度のBAおよびCPPU濃度区 (0, 0.2, 2, 10, 20 μM) においても、カルス形成はほとんど認められなかった (第4図, 第5図). 0.2 μM NAA区においては、いずれのBAおよびCPPU

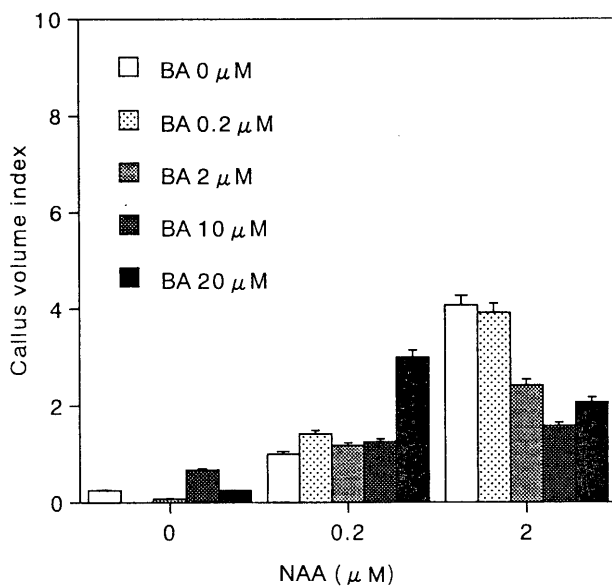


Fig. 4. Effect of BA and NAA concentration on callus induction from immature embryo of Chinese bush cherry (*P. japonica* THUNB.). Callus volume index ; no callus formation (0)~Abundant callus formation (10). Bars denote SE (n=24).

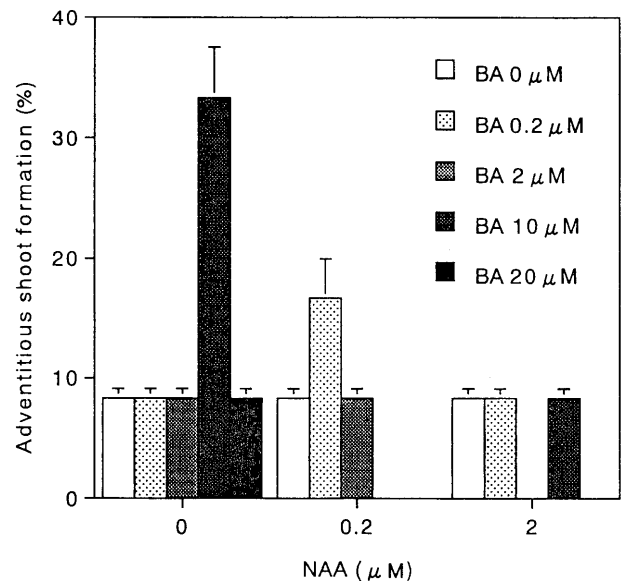


Fig. 6. Effect of BA and NAA on adventitious shoot formation from immature embryo callus of Chinese bush cherry (*P. japonica* THUNB.). Bars denote SE (n=24).

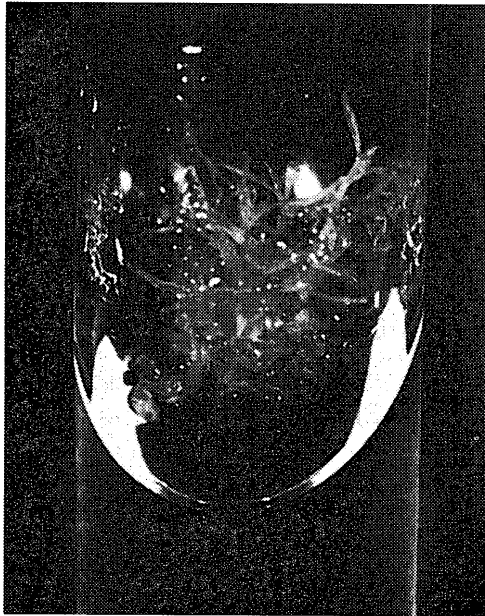


Fig. 7. Adventitious buds of Chinese bush cherry (*P. japonica* THUNB.) formed from the cotyledon of mature embryo on the 1/2 MS medium containing BA 0.2  $\mu$ M.

濃度区においてもカルス形成量はわずかであった。2  $\mu$ M NAA処理区においては、BA無添加区およびCPPU無添加区とBA 0.2  $\mu$ M区で、他と比較するとやや多くのカルスが形成された。またカルスの形状は、ほとんどが淡緑色または淡黄色、黄色であった。

不定芽が最も多く形成されたのは、NAA無添加の10  $\mu$ M BA区で形成率は40%以上であった(第6図)。ま

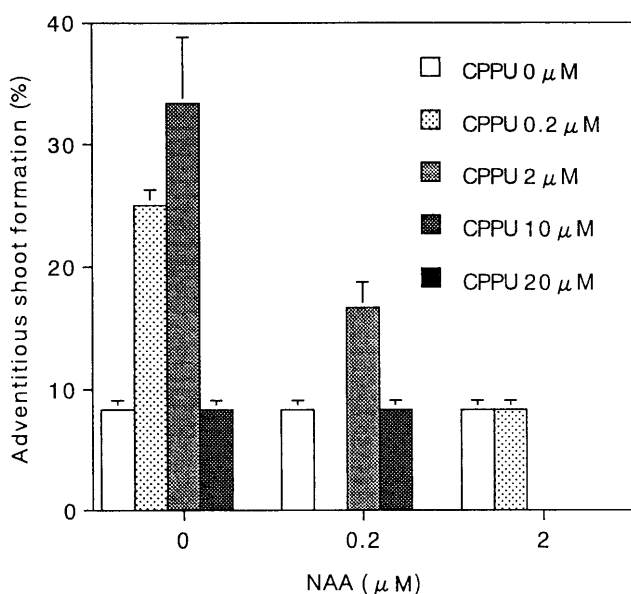


Fig. 8. Effect of BA and NAA on adventitious shoot formation from immature embryo callus of Chinese bush cherry (*P. japonica* THUNB.). Bars denote SE (n=24)

た、外植体当たりの不定芽形成数も多く、他の処理区では1~3本であったのに対し10~20本が形成された(第7図)。続いてNAA無添加区のCPPU0.2  $\mu$ Mおよび2  $\mu$ M区で、形成率は約25%であった(第8図)。

## 考 察

近年、落葉果樹においても組織培養の技術が利用され、モモやスモモ、オウトウなどの茎頂培養による培養苗の大量繁殖の技術はほぼ確立されている<sup>(8)(9)</sup>。ニワウメについても茎頂培養によるシュートの増殖条件は明らかにされている<sup>(10)</sup>しかし、培養系での変異拡大や遺伝子導入などの技術の適用には、不定胚や不定芽の安定した再分化系の確立が必要となる。増田ら<sup>(11)(12)</sup>は、リンゴの葉および幼植物の根からの、不定芽形成と植物体再生を報告している。また、カキ<sup>(13)</sup>や核果類<sup>(14)</sup>においても、葉片からの植物体再生またはカルス誘導条件などが明らかにされている。

本実験では、ニワウメにおいて、外植体として開花前の胚珠を用いた場合、胚珠の生長やカルス形成はまったく認められなかった。この原因は明らかではないが、胚珠の栄養要求性の特異性や胎座組織の必要性などが考えられ、さらに検討が必要である。

一般的にオーキシンはカルス形成を促進する作用を持つが、本実験においても、外植体として未成熟胚を用いた場合、カルス形成が最も旺盛であったのは3% Sucrose+15  $\mu$ M 2,4-D処理区、次いで3% Sucrose+30  $\mu$ M 2,4-D処理区であり、オーキシンの効果が認められた。一方6% Sucrose+2,4-D無添加区においても、相当量のカルス形成が見られ、ニワウメの未成熟胚のカルス形成には2,4-D添加は必ずしも必要ではないものとみられた。さらに不定胚形成においては、2,4-D無添加の処理区でのみ不定胚が形成されたことから、2,4-Dの添加は不定胚形成を抑制するものとみられた。Maureen<sup>(15)</sup>は、パイアにおいて、2,4-Dを添加した培地でカルスの形成が確認された後、直ちに2,4-D無添加の培地に移植することで不定胚が可能であることを報告している。ニワウメの場合、Sucrose 3%に2,4-Dを添加した培地でカルスの形成を促した後、2,4-D無添加のSucrose 6%培地に移植するのが効率的と思われた。

不定胚から植物体再生に至らなかった原因として、胚の休眠打破の未完了および胚の発達不足の2つが考えられる。本実験では休眠打破のために5℃で2週間の低温処理を行ったが、さらに長期間の低温処理を必要とするのかもしれない。鈴木ら<sup>(16)</sup>は甘果オウトウの胚培養において休眠打破のためにチオ尿素処理を試みており、発

芽促進剤の利用についても検討する必要がある。一方、不定胚の熟度の不足により発芽しなかった可能性もある。形成された不定胚の発達を促すための培地での培養が必要かもしれない。

不定芽誘導実験において、外植体として未熟胚を含む胚珠を用いた場合、カルス形成は認められたものの、不定芽形成は全く認められなかった。不定芽を形成するためにはある程度の胚の発達が必要であると思われる。

成熟胚の子葉組織を用いた場合の不定芽形成は、NAA無添加区で最も旺盛であり、NAA添加は不定芽形成を抑制するものとみられた。リンゴにおいても高濃度のオーキシンの添加は不定芽形成を抑制した<sup>(11)(12)</sup>。

形成された不定芽を1/2 MS培地を基本培地とし、Sucrose 2%, 6-( $\gamma, \gamma$ -dimethylallylamino) purine (2iP) 2.5  $\mu$ M, 寒天1%を添加した培地で、シュートの伸長を促進した。このシュートの基部を10mM Indole-3-butyric acid (IBA) に5秒間浸漬させた後、Sucrose 2%, 寒天1%を加えたホルモンフリーの1/2 MS培地培地に置床したところ正常な発根がみられ、植物体が再生した。

## 摘 要

ニワウメの胚珠および胚からの不定胚および不定芽の

再分化条件を検討した。MS基本培地にジェランガム0.2%を加え、Sucrose (3, 6, 9%) と2,4-D (0, 15, 30  $\mu$ M) をそれぞれ添加した。受精前の胚珠は、いずれの培地においてもすべて枯死した。未熟胚を用いた場合、3% Sucrose + 15  $\mu$ M 2,4-D処理区でカルス形成が最も活発であったが、不定胚形成は2,4-D無添加の培地でのみ認められた。休眠を打破するために低温処理した後、ホルモンフリーのMS培地に移植したが、植物体の再生には至らなかった。

不定芽の誘導には、1/2 MS培地にSucrose 3%, ジェランガム0.2%を加え、生長調節物質としてBAおよびCPPU (0, 0.2, 2, 10, 20  $\mu$ M) と、NAA (0, 0.2, 2  $\mu$ M) をそれぞれ添加したものを用いた。開花約10日後の胚珠では、カルス形成は認められたが不定芽は全く形成されなかった。成熟胚の子葉を用いた場合、不定芽が最も多く形成されたのはNAA無添加のBA 10  $\mu$ M区で、NAAの添加により不定芽形成は抑制された。形成された不定芽を、2iP 2.5  $\mu$ Mを添加した1/2 MS培地で伸長させ、シュートの基部を10mMのIBAに5秒間浸漬し、Sucrose 2%を添加したホルモンフリーの1/2 MS培地に移植したところ、約10日後に発根が認められ、幼植物体を形成した。

## 引用文献

- (1) 水谷房雄, 山田昌彦, 杉浦 明, 苫名 孝: 核果類の耐水性の種間差異と台木の相違がモモの耐水性に及ぼす効果. 園芸学研究集録, 9, 28-35 (1979).
- (2) 水谷房雄, 山田昌彦, 谷口俊哉, 小泉京子, 杉浦明, 苫名 孝: ニワウメおよびユスラウメ台がモモ‘大久保’のわい化に及ぼす効果. 園学雑, 54: 327-335 (1985).
- (3) 村瀬昭治, 鈴木勝征, 山崎利彦: モモのわい性台木に関する研究 (第1報) 白鳳及び白桃の若木の生長及び果実の収量, 品質に及ぼす *Prunus japonica* THUNB., *Prunus tomentosa* THUNB., 及び *Prunus persica* BATSCH. 台木の影響. 果樹試報A, 13: 31-49 (1986).
- (4) 鈴木勝征, 村瀬昭治, 山崎利彦: モモ及びオウトウのわい性台木の探索. 果樹試報A, 13: 21-29 (1986).
- (5) 吉田雅夫: わい性台木の利用と課題. 河瀬憲次編著, 果樹台木の特性と利用. pp361-366. 農文協, 東京 (1995).
- (6) 尾形凡生, 片岡郁雄, 杉浦 明, 苫名 孝: モモ, ネクタリン及びスモモの無機養分吸収に及ぼす各種の台木の影響. 園学雑, 57: 608-614 (1989).
- (7) 片岡郁雄, 杉浦 明, 苫名 孝: *Microcerasus* を中心とする *Prunus* 属果樹の種間交雑. 園学雑, 56: 398-407 (1988).
- (8) 小崎 格: 果樹苗生産とバイオテクノロジー. 博友社, 東京 (1990).
- (9) 石田雅士, 中村好伸, 傍島善次: モモわい性台木の茎頂培養による大量増殖の可能性について. 園学要旨, 昭59秋: 122-123 (1984).
- (10) 石田雅士, 松山剛士, 北島 宣, 傍島善次: ニワウメ (*Prunus japonica* THUNB.) の茎頂培養について. 園学雑, 58: 49-54 (1989).
- (11) 増田哲男, 別所英男, 小森貞男, 土屋七郎: リンゴの細胞培養と個体の再分化に関する研究 (第2報) 幼植物の根からの不定芽形成. 果樹試報C, 15: 13-19 (1988).
- (12) 増田哲男, 吉田義雄, 別所英男: リンゴの細胞培養と個体の再分化に関する研究 (第1報) リンゴ葉外植片からの不定芽形成. 果樹試報C, 14: 1-10 (1989).
- (13) 西村浩一郎, 山田員人: 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

- (1992).
- (14) MATSUTA, N. and YAMAKI, S. : Callus induction from leaf disks of Stone fruits (*Prunus* spp.). *Bull. Fruit Tree Res. Stn. A.*, 15 : 19-30 (1988).
- (15) MAUREEN, M. and FITCH, M. : High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration from papaya hypocotyl callus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 32 : 205-212 (1993).
- (16) 鈴木 洋, 千葉ゆかり, 樋浦 巖 : 甘果オウトウの胚培養における培地条件の検討. 山形大学紀要 (農学), 11 : 683-690 (1993).

(2002年9月30日受理)