

組織培養法の植物検疫への導入に関する研究

1. 茎頂培養によるブドウ・LN33のシュート増殖試験

大門 輝男*・梅本 広寿・俣木 利昭
須之内恒久**・坂之内踐行・阿久根光明
門司植物防疫所

Studies on Introduction of Tissue Culture Technique for Plant Quarantine 1. Investigations of Mass production of Grapevine LN-33 by Stem Tip culture. TERUO DAIMON, HIROTOSHI UMEMOTO, TOSHIKI MATAKI, TSUNEHISA SUNOUCHI, FUMIYUKI SAKANOUCHI and MITSUAKI AKUNE (Moji Plant Protection Station). *Res. Bull. Pl. Prot. Japan.* 23 : 49-51 (1987).

Abstract: Stem tip culture has been investigated for mass propagation in the LN-33, which is an indicator plant for grapevine corky bark. Auxiliary buds from current shoots of a grapevine grown under clean room conditions were used as materials. Bud explants were cultured on MS medium containing Benzyle adenine (BA) (0.5–3mg/l) or BA (0.5–3mg/l) and α -Naphthaleneacetic Acid Potassium (NAA) (0.1mg/l) at 20°C, 25°C and 30°C in 16hr photoperiod (1,500 lux). Consequently, a number of shoots were induced on most buds, especially on mediums containing BA (1–2mg/l), although no influence of NAA on propagation was confirmed. Propagation rate was steadier and higher at 25°C than at 20°C or at 30°C. From these results, it is considered that mass propagation of LN-33 would be possible with MS medium containing BA (1mg/l) at about 25°C.

はじめに

輸入植物の隔離検疫及び国内の母樹検疫においては、ウイルス検定に多種類の木本の指標植物を用いているが、種類によっては、種子の入手が困難であったり、挿木等による増殖が不向きなものもあり、また、保存中にウイルス等に汚染される可能性も高い。一方、木本植物（果樹）についても、組織培養を利用して、無病のものを大量に繁殖させる技術が実用化されつつある（平林，1984）。

従って、これらの新技術を検疫に導入することにより、ウイルスフリーの木本指標植物の継続的な確保が容易となり、また、当該培養体を用いて室内で接木検定する技術の開発も期待される。

ブドウにおいても、茎頂培養等によるウイルスの無毒化および苗木の大量増殖技法（井理ら，1982；果樹試験場育種部，1986）が開発されつつあり、これらの技法の実用化に伴い、ウイルス病による被害は回避される方向にあるが、これまで対象とされてきたのは、主に生食または醸造用品種であった。

一方、植物検疫等において多数使用されるウイルス病検定の本指標植物については、茎頂培養に関する試験報告はほとんど見あたらない。このため、木本指標植物の中からブドウコーキーバークの検定に用いられているブドウ品種LN-33（TANAKA, 1976）を供試し、茎頂培養によるシュートの増殖試験を行ったので報告する。

試験を行うにあたり、貴重な御助言をいただいた果樹試験場安芸津支場、平林利郎主任研究官に厚く御礼申しあげる。

材料および方法

1. 供試材料

供試材料は、室内の清浄な環境下で育成したLN-33の新梢から採取した腋芽を用いた。

茎頂の摘出および表面殺菌は次の手順で行った。

- ① 腋芽のついた新梢を長さ約1～1.5cmに切断し、中性洗剤でよく洗浄する。
- ② 0.2%逆性石ケン水に浸し、実体顕微鏡下で茎頂を摘出する。
- ③ 茎頂を70%エタノールに10秒間浸漬する。
- ④ 10%過酸化水素水に3分間浸漬する。

* 現在、横浜植物防疫所国内課

** 現在、神戸植物防疫所業務部国際第三課

第1表 培地中のBA及びNAA濃度と植付50日後の生育状況 (25°C)

調査項目	BA mg/ℓ	0.5	1	2	3	0.5	1	2	3
	NAA mg/ℓ	0				0.1			
植物体の高さ (mm)		23	18	23	28	15	17	24	23
巾 (mm)		30	35	30	30	18	35	35	34
シュートの発生数	※	多	多	多	多	小~多	多	多	多
葉の色		緑	緑	黄緑~緑	黄緑~緑	淡緑~褐色	淡桃~淡緑	緑	緑
茎の色		淡桃~緑	緑	淡桃~淡緑	淡桃~淡緑	淡桃~褐色	淡桃~淡緑	淡桃~淡緑	淡桃~緑
茎・葉のカルス・奇形化		—	茎の一部 カルス化	茎の一部 カルス化	茎・葉の一部 カルス化	茎の一部 カルス化	茎・葉の一部 カルス化	茎・葉の一部 カルス化	茎・葉の一部 カルス化
総合判定	※※	○	◎	◎	○	○	◎	◎	○

※ 1~5本 (小) ※※ ◎ シュートの発生数が比較的多く、茎、葉のカルス、奇形化が少ない。
 6~10本 (中)
 11本以上 (多) ○ シュートの発生数が少いか、多くても若干茎、葉のカルス、奇形化がある。

⑤ 培地に無菌的に置床する。

なお、洗剤および葉剤による処理後は、滅菌水で2~3回洗浄した。

2. 供試培地

ブドウの組織培養に一般的に用いられているMURASHIGE & SKOOG培地 (MS培地) を基本培地とし、これに植物ホルモンのベンジルアデニン (BA) 0.5, 1, 2, 3mg/l をそれぞれ加えた区と、さらにそれらに0.1mg/l の α -ナフタリン酢酸カリウム (NAA) を添加した8種の培地を作製し用いた。

3. 培養条件および調査方法

1フラスコあたり茎頂を1個置床し、1試験区あたり2茎頂を供試した。これを20°C、25°Cおよび30°Cの各温度条件下で、1,500ルクス、16時間照明し50日間培養した。

培養開始後1週間ごとに、培養フラスコの外側から肉眼観察により、植物体の高さおよび幅、シュートの発生数、茎および葉の色、発根数ならびに茎・葉のカルス化および奇形化について調査した。

結果および考察

1. 植物生長ホルモンのシュートの増殖におよぼす影響

植付50日後には、ほとんどの試験区で、茎頂の頂芽

優勢性が打破され、多数のシュートが発生した。この傾向はBA高濃度区ほど顕著であり、また、培養温度が高くなるにつれて相乗効果が認められた。しかし、BA高濃度 (2~3 mg/l)、高温 (30°C) 区では、後期のシュートの発生は緩慢となり、茎葉のカルス化や奇形化が多く見られた。一方BA濃度が低くなるにつれて、シュートの発生数は若干減少したが、正常な茎葉の割合は高くなった。

なお、NAAは本試験の濃度 (0.1mg/l) でシュートの増殖に対して影響は認められなかった。

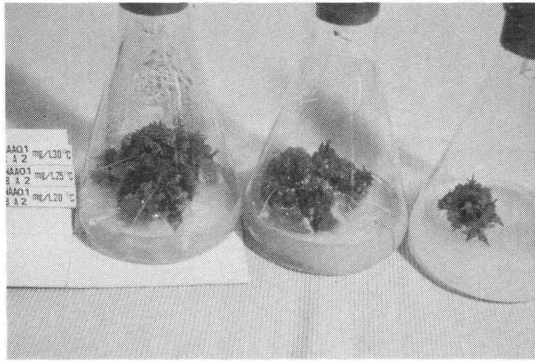
2. 各温度下でのシュートの増殖状況

20°C区では、他の温度区にくらべシュートの発生数は少く、茎の生長は緩慢であったが、茎葉のカルス化や奇形化はほとんどなかった。

25°C区での生育状況は表1のとおりで、シュートの発生数は比較的多く、茎葉も正常なものが多かった。なかでも、BA 1 mg/l および2 mg/l 区における正常茎葉の発生数は全試験区を通じて最大であった。

30°C区では、培養開始後2週間位まで生育はきわめて旺盛であったが、以後培養日数の経過とともに、茎葉のカルス化や奇形化が増加し、培養後半には茎葉の発育停止や枯死が多く見られた。高温 (30°C) は、発根を促進し根が糸状菌の気中菌糸のように培養フラスコ全体を満たすものも一部に見られた。なお、BA 0.5mg/l、同1.0mg/l、NAA 0.1mg/l 添加のBA 1.0mg/l および同2.0mg/l の各区では、多数の芽が発

育停止する中で、2～3の芽が大きく伸長し、根を伴った完全な植物体となるものが認められた。しかし、これらの区のシュートの発生数はきわめて悪かった。



第1図 温度による生育の違い
培地：BA 2mg/l , NAA 0.1 mg/l 添加
培養温度：右から20, 25及び30℃

3. 考 察

以上の結果から、LN-33はBA 1.0～2.0mg/l 添加のMS培地を用い約25℃でシュート増殖のための初期培養が可能と思われた。

BAのシュートの増殖に対する最適濃度については、マスカット・オブ・アレキサンドリアについて実施された試験結果とほぼ一致しているが、巨峰および5BBの試験結果（BAの最適濃度5mg/l）とはかなり異なる（果樹試験場育種部、1986）。このことは平林（1984）もすでに指摘しているが、ブドウの品種によってシュートの増殖におよぼす植物ホルモンの最適濃度が異なることを示している。

摘 要

ブドウコーキーバークの検定用指標植物であるLN-33苗木の大量増殖を目的として、茎頂培養によるシュートの増殖試験を行った。

LN-33の新梢の腋芽を表面殺菌した後、BA (0.5～3.0mg/l) およびNAA (0.1mg/l) を添加したMS培地に置床し、20℃、25℃および30℃、1500ルクス、16時間照射の条件下で培養した。

その結果、シュートはほとんどの試験区で発生したが、とりわけBAを1.0～2.0mg/l 添加した培地では発生数が多かった。

正常茎葉の発生数は25℃において最大であった。

以上の結果から、LN-33はBA 1.0～2.0mg/l 添加のMS培地を用い、25℃前後でシュートの大量増殖が可能と思われた。

引 用 文 献

- 平林利郎（1984）組織培養によるブドウの急速増殖法。今月の農業 12(12)：24-28。
- 井理正彦・志村富男・戸川英夫・上野雄靖（1982）醸造用ブドウの熱処理および生長点培養によるGrapevine leafroll virusの無毒化について。日植防報 48：685-687。
- 果樹試験場育種部（編）（1986）果樹におけるバイオテクノロジーの開発と利用。昭和60年度果樹課題別研究会資料 pp.11-52。
- TANAKA, S., (1976) Indexing grapes in Japan for viruses. Ann. Phytopath. Soc. Japan 42：192-196。