

WP培地を用いたマルメロ冬芽からのシュートの誘導

青木 央, 大坪 雅史, 宮崎 俊一

Shoot Apex Growth of the Winter Bud of Quince (*Cydonia oblonga* Miller) on the Woody Plant Medium

Hiroshi Aoki, Masashi Otsubo and Syun-ichi Miyazaki

要 旨

マルメロ (*Cydonia oblonga* Miller) の冬芽から, WP培地を用いてシュートの誘導を行った。成長ホルモンとして6-ベンジルアミノプリンを用いたところ, 初期濃度は1.2mg/ℓがよく, 2週間後くらいに濃度0.4~0.8mg/ℓへ移植することが有効であった。さらに, 節部切片培養により増殖も可能であることが知れた。

マルメロは, バラ目ナシ科マルメロ属一属一種の樹木¹⁾で, カリン (*Chaenomeles sinensis* Koehne) と近縁種であり, そのため, 混同されることがあるが, 別の種である。カリンの果実の成分は, 喉によいなどとして民間療法や漢方でも用いられることがあり, マルメロもカリンと近縁であることから同様の機能性をもつ果実になることが期待できる。また, マルメロの木は, 現在は, その果実よりも台木としての利用がなされている樹木である。

道南地域に限って見れば, マルメロは写真1のように6月上旬に花を咲かせ, 10~11月ころに黄色の実をつける(写真2)。マルメロを用いたワイン²⁾や低酸味飲料³⁾などの開発を当センターでもおこなってきているが, 機能性素材としてより一層期待される研究素材である。そこで, 地域のバイオテクノロジーの基盤技術の育成をねらい, 植物組織培養の研究素材として, 成長点培養による大量増殖の対象品種に選択した。

樹木の組織培養としては, 冬芽から培養を試みる方法とプロトプラストが培養をする方法が研究手法としてある⁴⁾。マルメロの場合, プロトプラストからの増殖方法では R. Dolcet-Sanjuan ら



写真1 マルメロの花(6月)



写真2 マルメロの果実(11月)

の報告⁵⁾がある。一方, MS培地を用いた例としては R. Muleo らの報告⁶⁾がある。MS培地での追試をふまえ, WP培地(Woody Plant Medium)を用いたときの結果が良かったので報告する。

以下、冬芽の成長点からの増殖をWP培地を用いて試みた例を報告する。

マルメロは11月下旬から12月中旬に小枝を選び、葉は全て切り落とした。その小枝を歯ブラシで表面を水道水で洗浄後、4 cmくらいに切断し、冬芽が2つ付くぐらいに長さをそろえた(写真3)。

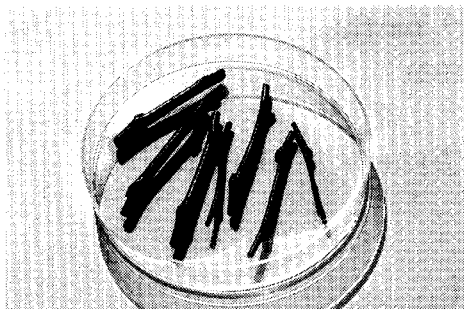


写真3 成長点の切出し用に準備した小枝

次に、50mlの試験管に用意したエタノールにピンセットで摘んで漬け、引き上げてから火をつける。火炎により表面を焼き払い、アルコールが燃焼した後、100mlの三角フラスコに用意した1%次亜塩素酸溶液に5~10分間漬けた。その後、滅菌水を張った三角フラスコ内で3回洗い、成長点を切り出した。切り出し方法は、クリーンベンチ内に実体顕微鏡を設置し、その下で、ディスポーザブルの医療用メスを用いて、まず冬芽の側面を削り、次に上面を削った。削り面から組織の内部を探り、削り増しをおこないながら、成長点を切り出した。成長点は、寒天濃度0.8%、ショ糖2%、pH5.7のWP培地を用いて27℃、湿度50%、16時間日長、約10000lx(蛍光灯40W、9本相当)で培養し、カイネチン(成長ホルモン)としてベンジルアミノプリン(BAP, 6-Benzylaminopurine)を0.4, 0.8, 1.2mg/lの濃度で、各4本を試した。その結果、1.2mg/lの4本は、14日後には全て新緑の組織が確認できた。0.8mg/lは新緑が観察されず、0.4mg/lは2本の新緑が観察された。また、コンタミによる汚染をおこしたのは、12本中1本であった。

マルメロの場合は、表面にある柔毛の発達により、界面活性剤を含む次亜塩素酸を用いる浸透殺菌法を基本とただけでは、無菌化の成功率は高くないという印象を得ており、このような焼き払い工程を導入することが、無菌化及び作業時間短縮に大いに貢献した。

切り出した成長点をBAP 1.2mg/lの濃度で培養を続けると20日前後で組織はカルス状塊となり褐変、枯死するので、BAP濃度0.8mg/lのWP培地に植え継ぐことにより成長を維持できた。さらに、そのまま放置するすると69日くらいで葉枯れが出現するので、シュートを節部切片の培養により増殖させた。節部切片の培養は、いわゆる一葉差しといわれる方法により行った。このときのBAP濃度は、0.4と0.8mg/lを用いた。7日~16日でシュートの新生が確認できた。例えば、1本のシュートを9本に節部切片培養した場合、6本から新しいシュートが伸長した。

節部切片培養から40日前後では、複数のシュートが伸長しているのが、観察された。たとえば、BAP濃度0.4mg/lの培地で植え継いだシュートに新たに4本のシュートの誘導が認められたものがあった。(写真4、節部切片培養から22日後) BAPの濃度の差によりこのマルチプルシュートの誘導に差異があるかどうかは、不明であった。ただし、追試の結果では、BAPの濃度が0.6mg/l以上であるとシュートの伸長が低めにできるようであった。節部切片の培養により、大量増殖について、道内では佐藤がエゾヤマザクラでの大量培養の成功⁷⁾を報告している。



写真4 WP培地でのマルチプルシュート
節部切片培養から22日後, BAP 0.4mg/l

以上、初代培養から継代培養でBAPの濃度を変更することにより、茎頂がカルス塊となるのを避け、シュートを誘導することが、WP培地でのマルメロの増殖をさせる場合にも有効であること

がわかった。このような手法が有効であることは、西川らが行ったオレオカンバでの培養実験⁸⁾で報告があり、大いに参考になった。さらに、この一連の実験観察から、メスによる切り出した成長点場所や切り離した節部の位置は、その後のシュートの伸長など実験経過に与える影響は極めて大きいと思われた。

参考文献

- 1) 松尾孝嶺：植物遺伝資源集成, 講談社 (東京) 第3巻, (1989) 1150-1151
- 2) 宮崎俊一, 馬渡幸則, 長谷川栄治, 青木 央, 澤谷拓治：北海道立工業技術センター研究報告, 2, (1992) 11-14
- 3) 大坪雅史, 宮崎俊一, 青木 央, 梅原泰男, 澤谷拓治：北海道立工業技術センター研究報告, 3, (1994) 12-15
- 4) 大山勝夫：植物バイオテクノロジー現代化学増刊5, 東京化学同人 (東京) (1986) 45-54
- 5) Ramon Dolcet-Sanjuan, David W. S. Mok and Machteld C. Mok : Plant Cell Reports, 10, (1991) 240-242
- 6) R. Muleo, F. Cinelli, and R. Viti : J. Plant Nutrition, 18, 1, (1995) 91-103
- 7) 佐藤孝夫：光珠内季報, No.106 (1997) 7-10
- 8) 西川浩己, 井出雄二：J. Jpn. For. Soc. 78, 1, (1996) 74-78