

ブドウ樹の生長点培養

山川祥秀・小池 肇*・神野康英

Meristem Tip Culture of Grapevines

YOSHIHIDE YAMAKAWA, HAJIME KOIKE, and YASUhide KAMINO

*The Experimental Vineyard, the Institute of Enology
and Viticulture, Yamanashi University, Kofu 400.*

A suitable method for the regeneration of intact grapevines was investigated using the meristem tip culture for obtaining virus-free grapevines.

Five cultivars used were 'Koshu', 'Koshu-sanjaku', 'Chardonnay', 'Riesling' and 'Cabernet Sauvignon'.

- 1) An optimum medium for meristem tip culture was tested using various modified Murashige and Skoog (MS) Media. The growth rate of inoculated meristem tips was the highest when the medium was composed of the MS diluted 2-fold, 0.1 mg NAA/l, 1.0 mg BA/l, 0.5 mg kinetin/l, 4.0 mg adenine/l, 30 g sucrose/l, and 6 g agar/l (pH 5.8).
- 2) For the greening and enlargement (stage A), and the monstrosus leaf formation (stage B) of the inoculated meristem tips, appropriate auxine was IAA for 'Koshu' and 'Koshu-sanjaku', IBA for 'Chardonnay', and NAA for 'Riesling' and 'Cabernet Sauvignon'.
- 3) For the formation of multishoot (stage C), the MS diluted 2-fold, 0.2 mg IAA/l, 1.0 mg BA/l, 0.5 mg kinetin/l, 4.0 mg adenine/l and 30 g sucrose/l were used, but for the opening of small leaves (stage D), the concentrations of BA and sucrose were half those described above.
- 4) For the rooting (stage E), the MS diluted 2-fold and 15 g sucrose/l were required for all the cultivars. Furthermore, the optimum concentration of NAA was 0.10 mg/l for 'Koshu' and 'Koshu-sanjaku', and 0.02 mg/l for 'Chardonnay', 'Riesling' and 'Cabernet Sauvignon'.
- 5) After the potting and habituation (stage F), those plants were easily established in soil.

植物の組織培養は「植物体の一部を母体から分離しこれを適当な条件下で、無菌的に培養し生育させる技術」と定義され、その手法については既に数多くの成書^{1~7)}で述べられている。

植物の組織培養の中の茎頂培養あるいは生長点培養

* 現在、カルピス食品工業株式会社
東京都渋谷区恵比寿西2-20-3

とされている技法は、特に野菜類、草花類において、新しい品種やクローンの急速な繁殖及びウイルスフリーの植物体再生を目的に実用化されているものが多い。

果樹、特にブドウにおける生長点培養は、ブドウなどの木本類は組織培養が比較的困難であること、栄養体繁殖が容易で組織培養による繁殖が必要ないこと、

またウイルスフリー化は古くは熱処理法によって行われていたことなどもあって、あまり研究も進んでおらず、1970年代に入り、その成功例が報告⁸⁻¹¹⁾されるようになった。

日本においては、笹原¹²⁾による‘善光寺ブドウ’、黒井¹³⁾による‘巨峰’の生長点培養の報告があるにすぎない。

本報告では、笹原¹²⁾の報告を参考に、日本古来のブドウである‘甲州’と‘甲州三尺’、それにワイン用ブドウの代表的品種である‘シャルドネ’、‘リースリング’、‘カベルネ・ソービニオン’の5品種を用い、ウイルスフリー化を目的に、生長点近傍組織から完全植物体の再生までの過程を検討した。特に植物ホルモン、その内のオーキシン類の培養におよぼす影響について品種別に検討したので、その結果について報告する。

実験材料と方法

供試ブドウ樹 リーフロールウイルス (leafroll virus) に汚染していることが確認できた‘甲州’、‘甲州三尺’、‘シャルドネ (Chardonnay)’、‘リースリング (Riesling)’それに‘カベルネ・ソービニオン (Cabernet Sauvignon)’の5品種、いずれも山梨大学発酵化学研究施設ブドウ育種試験地で植栽している7～10年生樹を用いた。

生長点の摘出 圃場から採取したそれぞれの品種の新梢を材料として、まず葉を除き、腋芽を中心に5cm程度の長さになり、水洗。表面殺菌のため次亜塩素酸ナトリウム液 ($\text{NaClO} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 有効塩素3%) 100mlに Tween 20 を数滴の割合で加えた液を用い、時々振盪しながら、10分間浸漬して殺菌した。これをクリーンベンチ内に入れ、滅菌水で3回洗浄したものを生長点近傍組織摘出に用いた。摘出は表面殺菌した腋芽を実体顕微鏡下に置き、メスで無菌的に、葉原基1～2枚を含む約0.2mmの大きさに摘出した。

培地の基本的組成とその殺菌 基本培地として Murashige and Skoog 培地¹⁴⁾ (以下MS培地と記す)を用いた (試薬はいずれも和光純薬・特級)。それにいわゆる植物ホルモン類のオーキシンとサイトカイニン、炭素源としてショ糖 (Sucrose) を加えた。pH を調整、粉末寒天を加え、寒天を溶解、棒ビンや三角フラスコ等の培養容器に分注、アルミホイルで二重に密閉して、114°C、15分間、オートクレーブで殺菌した。

使用水はいずれも再蒸留水を用いた。

培養条件 培養は人工気象器を用い、照明は白色蛍光灯及び植物育成用蛍光灯を併用、照度3,000～5,000 lx、18時間照明とし、培養温度25～28°Cで行った。

結果及び考察

ブドウ樹の生長点培養において、生長点近傍組織の培地上への置床から植物体の再生・鉢上げにいたるまでの生育過程をまとめてみると、笹原¹²⁾の報告とほぼ同様で、A期からF期までの6段階に表わすことができた。

すなわち、A期：生長点の置床から緑化肥大期、B期：奇型葉の形成期、C期：シュートの発生期 (多数の芽が形成される)、D期：小葉の展開期、E期：発根期と茎葉の伸長期、F期：鉢上げ期であった。以下必要に応じてA期、B期……と記す。

以下、生育過程の順を追って試験結果を報告する。

1. 基本培地の検討

まずはじめに、生長点近傍組織の摘出を習熟することも含めて、基本培地の検討を行った。

試験する基本培養として、MS培地そのもの、笹原¹²⁾が善光寺ブドウに用いたMS培地の1/2濃度の培地、それに黒井¹³⁾が巨峰に用いたMS培地の窒素源 (NH_4NO_3 及び KNO_3) を1/10濃度とした培地を用いて、生長点近傍組織 (約0.2mm) の置床から、緑化肥大 (約2.0mm) について、基本培地の影響について試験した。

基本培地への添加物として、植物ホルモンのオーキシンはNAA (α -naphthalene acetic acid) 0.1 mg/l、同じくサイトカイニンはBA (6-benzylaminopurine) 1.0 mg/l、カイネチン (Kinetin) 0.5 mg/l、アデニン (Adenine) 4.0 mg/l、それにショ糖 30 g/l、粉末寒天 6.0 g/l を添加し、pH 5.8とした。

培養容器は棒ビン (18×90mm) を用いた。

その結果を Table 1 に示した。

生育の結果は、いずれも置床後30日目、約0.2mmの生長点近傍組織が約2.0mm以上に緑化肥大した個体数で示した。また生育率 (2.0mm以上に生育した個体数/供試個体数) も合わせて示した。

ここで生長点近傍組織の摘出・置床後、約5日程度で黒く枯死した個体については、生長点摘出操作上のミス、例えば傷をつけたり、摘出・置床に時間がかかりすぎたなどによるものと判断し、供試個体数からこ

Table 1. Effect of basal media on the growth of the inoculated meristem tips.

Cultivars Media ^{a)}	Koshu	Koshu- sanjaku	Chardonnay	Riesling	Cabernet Sauvignon
MS ^{b)}	2/20 ^{e)} (10.0%)	3/18(16.7)	2/20(10.0)	3/19(15.8)	2/20(10.0)
1/2 MS ^{c)}	8/27 (29.6)	16/31(51.6)	4/16(25.0)	10/20(50.0)	8/20(40.0)
1/10N-MS ^{d)}	1/16 (6.2)	4/20(20.0)	1/17(5.9)	1/19(5.3)	1/18(5.6)

(cultivated for 30 days)

a) All the media used include : NAA 0.1 mg, BA 1.0 mg, Kinetin 0.5 mg, Adenine 4.0 mg, Sucrose 30 g, Agar 6 g/l (pH 5.8).

b) Murashige and Skoog medium.

c) Murashige and Skoog medium diluted 2-fold.

d) Containing one tenth amount of nitrogen of the MS medium.

e) Number of the greening and enlargement (above 2.0 mm)/

Total number of the inoculated meristem tips.

Table 2. Effect of Auxins on the greening and enlargement of the inoculated meristem tips (Stage A).

Cultivars Auxins	Koshu	Koshu- sanjaku	Chardonnay	Riesling	Cabernet Sauvignon
NAA	8/27 ^{a)} (29.6%)	16/31(51.6)	4/16(25.0)	10/20(50.0)	8/20(40.0)
IAA	5/25 (20.0)	13/29(44.8)	6/20(30.0)	2/20(10.0)	2/20(10.0)
IBA	7/29 (24.1)	11/28(39.3)	6/20(30.0)	4/20(20.0)	6/20(30.0)

(cultivated for 25 days)

Media ; MS medium diluted 2-fold, Auxin 0.1 mg (NAA or IAA or IBA), BA 1.0 mg, Kinetin 0.5 mg, Adenine 4.0 mg, Sucrose 30 g, and Agar 6 g/l (pH 5.8).

a) See Table 1.

れを除いた。

1/2 濃度 MS 培地での生育が最も良好で、甲州では 27 供試個体中 8 個体が 2.0 mm 以上に緑化肥大し、生育率は 29.6 %、続いて、甲州三尺は 31 個体中 16 個体の 51.6 %、シャルドネは 16 個体中 4 個体の 25.0 %、リースリングは 20 個体中 10 個体の 50.0 %、カベルネ・ソービニオンは 20 個体中 8 個体の 40.0 % で、品種間で生育率に差はあったが、他の 2 つの培地より良好であった。

1/10 窒素濃度 MS 培地での生育は、いずれの品種においても最低であったが、この培地を使用している黒井ら¹³⁾が報告しているように、この培地では生育が極めて緩慢で、培養 30 日程度では 2.0 mm 以上に生育する個体は少なかった。

MS 培地そのものでは、ブドウの生長点培養にはイオン濃度が高すぎるのではないかと推察される。

以上の結果から、以後の試験には、基本培地として 1/2 濃度 MS 培地を用いることとした。

2. 生長点近傍組織の置床から緑化肥大(A期)に及ぼすオーキシンの影響

ここでは、約 0.2 mm という微細な生長点近傍組織の培地上への置床から、約 2.0 mm 以上に緑化肥大させるための培地中のオーキシンの影響について、品種別に試験した。

培地は、基本培地として 1/2 濃度 MS 培地、それに BA 1.0 mg/l、カイネチン 0.5 mg/l、アデニン 4.0 mg/l、ショ糖 30 g/l、粉末寒天 6 g/l、pH 5.8 とし、オーキシン類として、NAA (α -naphthalene acetic acid)、IAA (indol-3-acetic acid)、IBA (indol-3-butyric acid) の 1 種を 0.1 mg/l 添加したものを用いた。

培養容器は棒ビン (18×90 mm) を用いた。

その結果を Table 2 に示した。また Fig. 1 に緑化

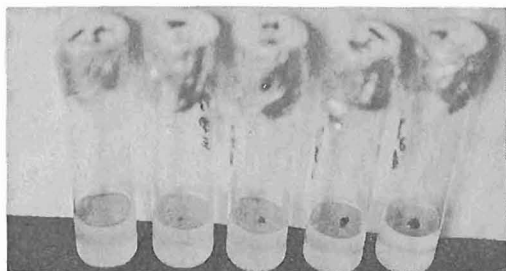


Fig. 1. Greening and enlargement (stage A) of the inoculated meristem tips.

肥大の経時的变化を示した。

生育の結果は、いずれも置床後25日目、約2.0 mm以上に緑化肥大した個体数と生育率(前記)を示した。

置床後約5日程度で黒く枯死した個体については、供試個体数からこれを除いた。20供試個体を確保する目的で、順次生長点の摘出と置床を追加していった。2.0 mm以上に緑化肥大した個体の他は、緑化肥大をはじめたが10日以後枯死する個体、緑化肥大が緩慢で25日までに2.0 mm以上とならなかった個体、それに一部カルス化する個体があった。

甲州、甲州三尺、シャルドネにおいては、いずれのオーキシシンにおいても生育率に大きな差はなく、甲州で20~30%、甲州三尺で40~50%、シャルドネで25~30%であった。甲州と甲州三尺とでは明らかに生育に差があり、甲州三尺の方が生育速度も早く、培養は容易であった。リースリングとカベルネ・ソービニオンにおいては、NAAにおいて最高で、それぞれ50%、40%であった。

表には示さなかったが、オーキシシン類である2,4-D (2,4-dichlorophenoxy acetic acid) とジベレリン酸 (gibberellic acid) を使用してみたが、いずれの品種

においても2.0 mm以上に緑化肥大する個体は見られず、カルス化する個体が多く、これらのオーキシシン類はA期の培養には適していないものと考えられた。また、黒井ら¹³⁾の巨峰の報告に基づき、オーキシシン類は使用せず、サイトカイニン類としてBA (1 mg/l) を使った培地についても試験してみたが、いずれの品種も緑化肥大は遅く、しかも生育率は10%以下で、やはりA期の培養には適当でないものと思われた。

A期の培養において、生長点の摘出は顕微鏡下でメスを使っての微動作など熟練を要する技術であり、また摘出から置床までの時間、置床の深さと向きなど肉眼的に確認できない置床状態によっても、生育率に違いが出るのが推察される。また0.2 mmという微細個体を育てることもあって、生育率は高いものでも50%程度であった。

3. 奇型葉形成(B期)に及ぼすオーキシシン類の影響

A期において2.0 mm以上に緑化肥大した個体も、植え継ぎをしないで、そのままにしておくと、奇型葉を形成せず、40~50日で完全に枯死してしまう。そのため新しい培地に植え継ぎ、次の生育段階である奇型葉形成を起こさせることが必要となる。

ここでは、再度A期と同じ培地に植え継ぎ、品種別にオーキシシン類の奇型葉形成に及ぼす影響について試験した。

植え継ぎする個体は2.0 mm以上に緑化肥大したもので、各試験20個体以上を準備し、A期と同種のオーキシシンを含んだ培地に植え継ぐこととした。

培養容器は少し大き目の棒ビン(25×120 mm)を用いた。

その結果をTable 3に示した。また、Fig. 2に奇型葉形成の状態を示した。

B期は組織が大きくなっていることもあって、A期

Table 3. Effect of Auxins on the monstrous leaf formation (stage B) from the greening and enlargement stage.

Cultivars Auxins	Koshu	Koshu-sanjaku	Chardonnay	Riesling	Cabernet Sauvignon
NAA	7/27 ^{a)} (25.9%)	6/30(20.0)	4/16(25.0)	20/20(100)	16/20(80.0)
IAA	24/28 (85.7)	25/29(86.2)	6/20(30.0)	12/20(60.0)	14/20(70.0)
IBA	15/28 (53.6)	13/28(46.4)	10/20(50.0)	20/20(100)	18/20(90.0)

(cultivated for 15 days)

Media ; see Table 2.
a) See Table 1.

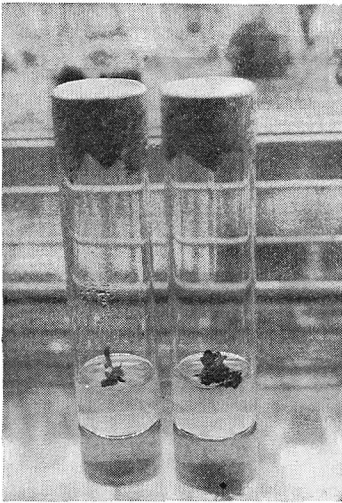


Fig. 2 Monstrous leaf formation (stage B).

こくらべ生育は順調で、植え継ぎ後15日以内に奇型葉を発生し、平均直径が10mm以上になった。その個体数と生育率(前出)を示した。

奇型葉形成個体の他は、枯死する個体、生育がほとんど止まっている個体、ある程度生育するが奇型葉を形成しない個体が見られた。

ここまでA期で25日、B期で15日、合計40日間を要していた。

甲州と甲州三尺においては、IAAが最適で、それぞれ28供試個体中24個体が奇型葉を形成し、生育率は35.7%、29個体中25個体の86.2%であった。シャルドネにおいては、他の品種にくらべて低い生育率であったが、IBAで20個体中10個体の50.0%であった。リースリングにおいては、NAAとIBAでいずれも100%であった。カベルネ・ソービニオンにおいては、NAAで20個体中16個体の80.0%、IBAで20個体中18

個体の90.0%であった。品種により最適オーキシンの種類に違いが見られた。

B期での培養は、A期と違い、個体そのものが2.0mm以上と大きく成長していることもあり、植え継ぎの置床の深さと向きも肉眼的に確認できるので、培養は比較的容易であった。

前記したように、A期の培養においてNAA、IAA、IBAのオーキシンの種類によって生育率にあまり差がなく、生育個体数がある程度確保できれば実用上に問題はない。A期とB期の培地が同一であれば、培養が簡略化できることもあるので、A期とB期の培養では、オーキシンとして、甲州と甲州三尺ではIAA、シャルドネではIBA、リースリングとカベルネ・ソービニオンではNAAが適当と考えた。

4. シュート発生(C期)のための培養

奇型葉を発生した個体もそのまま培養を続けると、次の段階のシュート発生は見られず、30日程度で枯死する個体が発生する。

ここでは、笹原¹²⁾が善光寺ブドウでシュートの発生に用いた培地、すなわち、1/2濃度MS培地にオーキシンとしてIAAを0.2mg/l、サイトカイニンとしてBA1.0mg/l、カイネチン0.5mg/l、アデニン4.0mg/lとし、これにショ糖30g/l、粉末寒天6g/l、pH5.8で5品種のシュート発生を試験した。

植え継ぎする供試個体は、B期の試験でオーキシンの種類が違っているものでも奇型葉を形成し、基部が10mm以上に生育したものは全て用いることとした。また、異常に大きく成長した奇型葉は植え継ぎ前に除去して、植え継ぐこととした。

培養容器は100ml容三角フラスコを用いた。

植え継ぎ後20日目の結果をTable 4に示した。また、Fig. 3にシュートの発生状態を示した。

目的とするシュートの発生個体の他には、枯死する

Table 4. Formation of the multishoots (stage C) from the monstrous leaf formation stage.

Koshu	Koshu-sanjaku	Chardonnay	Riesling	Cabernet Sauvignon
13/21 ^{a)} (61.9%)	19/22(86.4)	34/43(79.0)	62/70(89.0)	42/75(56.0)

(cultivated for 20 days)

Media; MS medium diluted 2-fold, IAA 0.2 mg, BA 1.0 mg, Kinetin 0.5 mg, Adenine 4.0 mg, Sucrose 30 g, Agar 6 g/l (pH 5.8).

a) See Table 1

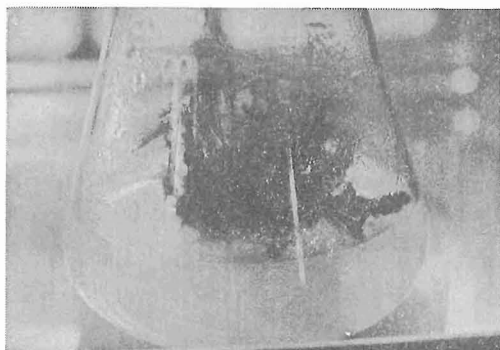


Fig. 3 Multishoots formation (stage C).

個体, シュートの発生が見られない個体があった。

甲州三尺, シャルドネ, リースリングにおいては, 80%程度あるいは80%以上の生育率が確保できた。カベルネ・ソービニオンにおいては, 75個体中42個体の56.0%でシュートの発生が見られたものの, 5品種中で一番低率であった。

カベルネ・ソービニオンと甲州において, 生育率を上げるため, IAA濃度, BA濃度及びシヨ糖濃度を変えて試験してみたが, いずれの培地においても, これ以上の生育率は得られなかった。

ここまでで, 生長点の置床からA期で25日, B期で15日, C期で20日, 合計60日間を要していた。

5. 小葉の展開 (D期) のための培養

C期においてシュートが多数形成された個体は, そのままにして置くと, シュートが枯れてくるため, 植え継ぎが必要となる。C期と同じ培地に植え継ぐと, 小葉の展開が見られず, 約30日程度で枯死する個体が多数あらわれる。新しい組成の培地に植え継ぎ, 小葉の展開をはかる必要があった。

ここでは, 笹原ら¹²⁾が善光寺ブドウの小葉の展開に

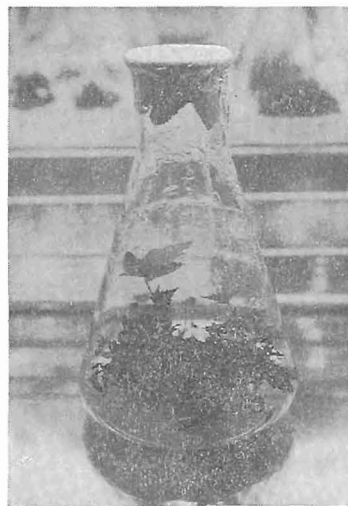


Fig. 4 Opening of small leaves (stage D).

用いた培地, すなわちサイトカイニンのBAをC期培地の半分の0.5 mg/lとし, 同じくシヨ糖濃度を30 g/lから15g/lとした培地 (1/2濃度MS培地にIAA 0.2 mg/l, BA 0.5 mg/l, カイネチン0.5 mg/l, アデニン4.0 mg/l, シヨ糖15g/l, 粉末寒天6 g/l, pH 5.8) で小葉の展開を試験した。

培養容器は100ml容三角フラスコを用いた。

その結果をTable 5に示した。あわせて小葉を展開し, 茎の高さが約2 cm, 葉が2~3枚になった平均シュート数も示した。また, Fig. 4に小葉の展開期の状態を示した。

甲州三尺は小葉の展開が順調であったので, 植え継ぎ後20日で, その他の品種は30日目の結果である。

シャルドネにおいては, 34供試個体中11個体の32.0%で, カベルネ・ソービニオンにおいては, 42個体中

Table 5. Opening of the small leaves (stage D) from the multishoot formation stage.

Koshu	Koshu-sanjaku	Chardonnay	Riesling	Cabernet Sauvignon
13/21(61.9%) 2.5 ^{a)}	24/30(80.0) 5.1	11/34(32.0) 6.8	48/62(77.0) 7.3	20/42(48.0) 6.6

(cultivated for 20 or 30 days)

Media; MS medium diluted 2-fold, IAA 0.2 mg, BA 0.5 mg, Kinetin 0.5 mg, Adenine 4.0 mg, Sucrose 15 g, and Agar 6 g/l (pH 5.8).

a) number of opening leaf shoots.

20個体の48.0%で小葉の展開が見られたものの、生育率は低かった。しかし、平均シュート数はそれぞれ6.8本、6.6本と多くなっていた。一方、甲州においては、21個体中13個体の61.9%で小葉の展開が見られたが、平均シュート数は2.5本と少なかった。

シャルドネ及びカベルネ・ソービニオンにおいて、生育率を上げるため、また、甲州において、平均シュート数を上げるために、IAA濃度を0, 0.2, 0.5, 1.0 mg/l, BA濃度を0, 0.5, 1.0 mg/l, ショ糖濃度を5, 15, 30 g/lとそれぞれ組み合わせて試験してみたが、Table 5に示した以上の良結果を得ることは出来なかった。しかし、D期の培養において、IAA濃度の影響は小さく、BA濃度は0.5 mg/lが良く、ショ糖濃度も15g/lが良かった。

ここまでで、生長点の置床からA期で25日、B期で15日、C期で20日、D期で甲州三尺は20日の合計80日を要しており、その他の供試4品種はD期で30日の合計90日を要していた。

6. 発根と茎葉の伸長 (E期) のための培養

小葉を展開 (D期) したシュートを完全植物体にするため、発根させる必要がある。また、発根と同時に茎葉の伸長を促進させ、より健全な植物体とする必要がある。

植物の組織培養において、発根は培地中のオーキシン/サイトカイニンの比が大きい時に分化・発達が促進されるとされている。ここでは、サイトカイニンを使用せず、1/2濃度MS培地に、オーキシンとしてNAA濃度を0, 0.02, 0.10 mg/lとし、それにショ糖15g/l, 粉末寒天を少し多めの8g/l, pH5.8の3種の培地で発根試験をすることとした。培養容器は棒ビン (25×120mm) を用いた。

D期で約2cmの高さに生育したシュート (葉数2～

3枚) を基部からカット、発根試験培地に茎を約5mmの深さに植え付けた。シュートのカット後、そのままD期の培養を続けると、小葉を展開するシュートがまた発生してくる現象が見られる。また、再度D期の植え継ぎを繰り返すと、多数の小葉を展開したシュートが得られた。

発根は植え継ぎ後5日程度ではじまるが、20日間で根の長さ約10mmに達し、しかもFig. 5に示したような太い根を発根した。その結果をTable 6に示し、Fig. 5に発根の状態を示した。

甲州及び甲州三尺においては、NAA 0.10 mg/l 培地が最適で、それぞれ19供試シュートから13シュートの68.4%が、30供試シュートから25シュートの83.3%に太い根の発根が見られた。シャルドネ、リースリング、カベルネ・ソービニオンにおいては、NAA 0.02

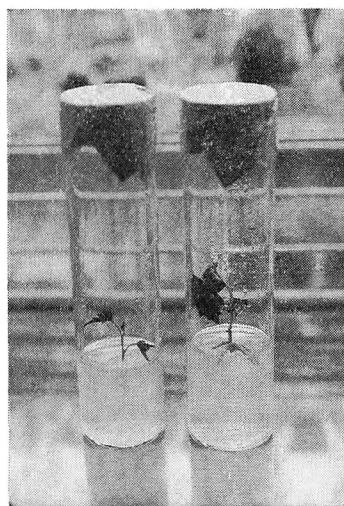


Fig. 5 Growth of shoots and roots (stage E).

Table 6. Effect of NAA concentrations on the growth of shoots and roots (stage E).

NAA	Cultivars	Koshu	Koshu-sanjaku	Chardonnay	Riesling	Cabernet Sauvignon
0.10		13/19(68.4%)	25/30(83.3)	2/8 (25.0)	14/27(52.0)	2/11(18.0)
0.02		3/14(21.4)	7/30(23.3)	11/11(100)	21/29(72.0)	6/12(50.0)
0		0/16(0)	0/30(0)	4/11(36.0)	5/30(17.0)	0/12(0)

(cultivated for 20 days)

Media ; MS medium diluted 2-fold, NAA 0.10, 0.02, or 0 mg, Sucrose 15 g, and Agar 8 g/l (pH5.8).

mg/l が最適で、それぞれ 100%, 72.0%, 50.0% のシュートに発根が見られた。

NAA 0 の培地においては、いずれの品種も細い根が誘導される傾向が見られた。

ここまでで、生長点の置床から発根した完全植物体を得るのに、甲州三尺で 80 日プラス 20 日の 100 日間、その他の供試 4 品種で 90 日プラス 20 日の 110 日間を要していた。

7. 鉢上げ期 (F 期) について

ここでは培養棒ビン内で発根した幼植物体を鉢上げすることとした。

第 1 段階の鉢上げとして、直径 7 cm の黒ビニール鉢を用い、用土としてパーミキュライトとパーライトを 1 : 1 に混合したものを用いた。

Fig. 6 と 7 に鉢上げ期の様子を示した。

約 5 cm に茎葉が伸長し、充分発根している幼植物体を、培養棒ビンから、培養基と共に、根を傷めないように取り出し、根部を水洗、培養基を完全に取り去り、用土に移植した。

移植後、水を張ったシャーレの中に鉢を置き、茎葉部にはトールピーカーをかぶせ、湿度を充分保つようにした。

自然の湿度に順化させるため、徐々にトールピーカーを持ち上げ、約 3 週間をかけて、完全にトールピーカーをはずした。

第 1 段階の鉢上げ後 30 日程で、直径 12 cm の素焼き鉢を用い、殺菌済み山かつら土に、第 2 段階の移植を行った。その後、適宜希釈ハイポネックスを与え、生長を促した。

Fig. 7 に示したように、樹高 50 cm になるまでに、第 1 段階の鉢上げから、温室内の隔離栽培できるまでに、おおそ 60 日を要した。

生長点の置床から、樹高 50 cm になるまでに、順調に生育したもので 160~170 日を要した。

引続き、指標植物によるウイルスの接ぎ木検定を行い、ウイルスフリーであるかどうか確認している。

要 約

ブドウ樹のウイルスフリー化を目的に、生長点培養により完全植物体の再生を試験した。

供試品種は甲州、甲州三尺、シャルドネ、リースリング、カベルネ・ソービニオン の 5 品種を用いた。

1) 基本培地の検討として、種々の修正 MS 培地で試

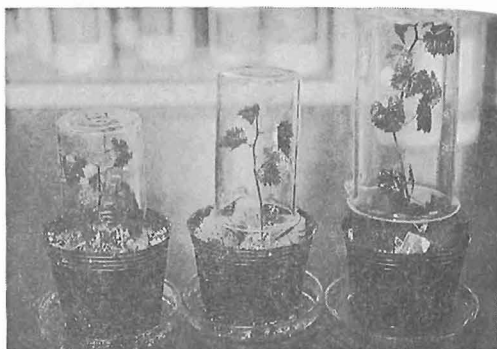


Fig. 6 Potting and habituation (stage F).

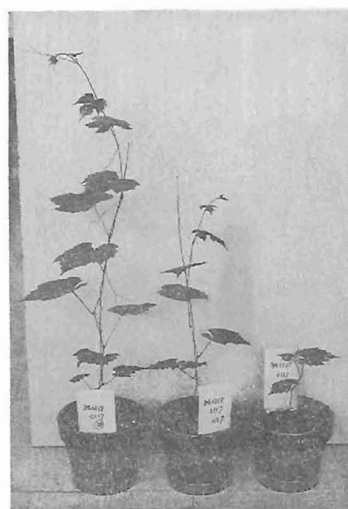


Fig. 7 Growth of shoots in soil.

験したところ、1/2 濃度 MS 培地、NAA 0.1 mg/l、BA 1.0 mg/l、カイネチン 0.5 mg/l、アデニン 4.0 mg/l、ショ糖 30 g/l、寒天 6 g/l、pH 5.8 が適当であった。

2) 緑化肥大期 (A 期) と奇型葉形成期 (B 期) において、最適オーキシンは、甲州と甲州三尺においては IAA、シャルドネにおいては IBA、リースリングとカベルネ・ソービニオンにおいては NAA であった。

3) シュートの発生期 (C 期) においては、1/2 濃度 MS、IAA 0.2 mg/l、BA 1.0 mg/l、カイネチン 0.5 mg/l、アデニン 4.0 mg/l、ショ糖 30 g/l を用い、小葉の展開期 (D 期) は BA とショ糖を半分にした培地を用いた。

- 4) 発根期 (E期) においては, 1/2 濃度MSとショ糖 15 g/l に, 甲州と甲州三尺では NAA 0.10mg/l, シャルドネ, リースリング, カベルネ・ソービニオンでは NAA 0.02mg/l が適当であった。
- 5) 鉢上げと順化 (F期) の後, 植物体は容易に土に植えることができた。
- 本研究は山梨県との共同研究「細胞培養及び細胞融合技術の確立」の一部であることを申し添えます。

文 献

- 1) 竹内, 石原, 古谷: 植物組織培養, 朝倉書店 (1972).
- 2) 加藤: 増補・植物組織培養法 (実際と応用), 誠文堂 新光社 (1976).
- 3) 原田, 駒嶺: 植物細胞組織培養, 理工学社 (1979).
- 4) 竹内, 中島, 古谷: 新植物組織培養, 朝倉書店 (1984).
- 5) 山田: 植物細胞培養マニュアル, 講談社 (1984).
- 6) 加古: 増補・園芸植物の器官と組織の培養, 誠文堂新光社 (1985).
- 7) 山田, 岡田: 植物バイオテクノロジー, 東京化学同人 (1986).
- 8) Hoeffert, L. L., Gifford, E. M. : *Amer. J. Bot.*, **51**, 677 (1964).
- 9) Barlass, M., Skene, K. G. M. : *Vitis*, **17** 335 (1978).
- 10) Barlass, M., Skene, K. G. M. : *J. Exp. Bot.*, **31**, 483 (1980).
- 11) Barlass, M., Skene, K. G. M. : *J. Exp. Bot.*, **31**, 489 (1980).
- 12) 笹原, 多田, 井理, 竹沢, 田崎: 園学雑, **50**, 169 (1981).
- 13) 黒井, 沢田: 園学雑, **54**, 1 (1985).
- 14) Murashige, T., Skoog, F. : *Physiol. Plant.*, **15**, 473 (1962)

(1986. 10. 15 受理)