

一般報文

リンゴ台木マルバカイドウにおける胚珠培養を利用した効率的な実生育成

大宮 知*・石原愛也**

岩手大学農学部

(〒020 盛岡市上田 3-18-8)

* 現在: 北海道立滝川畜産試験場

(〒073 滝川市東滝川 735-1)

** 現在: (〒336 浦和市元町 3-25-8)

(1994 年 9 月 17 日受付)

(1995 年 4 月 1 日受理)

リンゴ台木マルバカイドウ‘盛岡セイシ’の胚珠培養を用いた効率的な実生育成について検討した。満開後 10, 17 および 24 日目に、放任受粉の果実から胎座と果心の一部を付けた胚珠を切り取り、種々の濃度 (12~25%) のショ糖を添加した修正 Nitsch (1969) 培地に置床した。暗黒下で約 110 日間培養後、生長した胚を培養胚珠から摘出し、発芽のために、BA 1 mg/l および GA₄ 2 mg/l を添加した 1/2 濃度の Linsmaier & Skoog 培地に移植して、照明下で培養した。培養胚珠中の生長胚率および実生獲得率は、より生育の進んだ果実の胚珠を材料に用いた場合ほど高かった。満開後 24 日目の胚珠 (初期球状胚を含む) をショ糖濃度 15% の培地で培養した場合に、実生獲得率は 50% で最も高かった。また、満開後 10 および 17 日目の胚珠 (前胚を含む) でも、高ショ糖濃度 (21, 25%) の培地で培養することにより、低率 (5~20%) ながら実生を得ることができた。

1. 緒 言

わが国のリンゴ栽培では、主として労働力不足に対応するために、1970 年代からわい性台木を用いるわい化栽培が普及した。わい化栽培は、現在ではリンゴ栽培面積の 20% 以上に導入されており、今後も増える傾向にある。一般的に、わい性台木としてはイギリスから導入された M. 26 や M. 9 など (*Malus pumila* Miller var. *paradisiaca* Schneider) が用いられているが、これらには挿し木繁殖が困難である、根張りが悪い、バーノットが発生して衰弱しやすいなどの問題点がある¹⁾。そこで、これらのわい性台木の改良のために、わが国の在来台木との交雑育種が始まっている²⁾。わが国在来の台木の中では、マルバカイドウ (*Malus prunifolia* Borkhausen var. *ringo* Asami) が、挿し木繁殖が容易である、根張りがよい、リンゴワタムシおよび根部疫病に抵抗性である、半わい性である、在来台木として広く用いられているなどの理由から、育種素材として極めて重要と考えられている。また実際に、マルバカイドウを母本として、

わい性台木との交雑育種が行われ、いくつかの有望な系統も育成されている²⁾。

交雑育種を行う際には、交配母本の実生獲得効率が高いことが望ましい。しかし、マルバカイドウは、果実収穫前に胚の退化が高頻度で起こり、また生理落果も多いために、実生獲得効率が低いという問題がある。著者らは、マルバカイドウ‘盛岡セイシ’を材料として、果実収穫前に失われる胚を組織培養の技術を利用して救済する研究を行っており、これまでに、マルバカイドウ‘盛岡セイシ’はジューンドロップが多く、胚の救済のためには、5 月下旬から 6 月上旬 (満開後 20~30 日目) に胚培養を行うことが必要であることが明らかになった³⁾。また、この時期の胚は極めて小さく、胚のみを摘出して培養することが困難であるが、胚を含んだ胚珠や胚嚢の培養を試みた結果、比較的高濃度のショ糖 (8~15%) を含む培地で胚珠を培養することにより、この問題を解決できる可能性が示された⁴⁾。

本研究はこれらの結果に基づき、満開後 10~24 日目

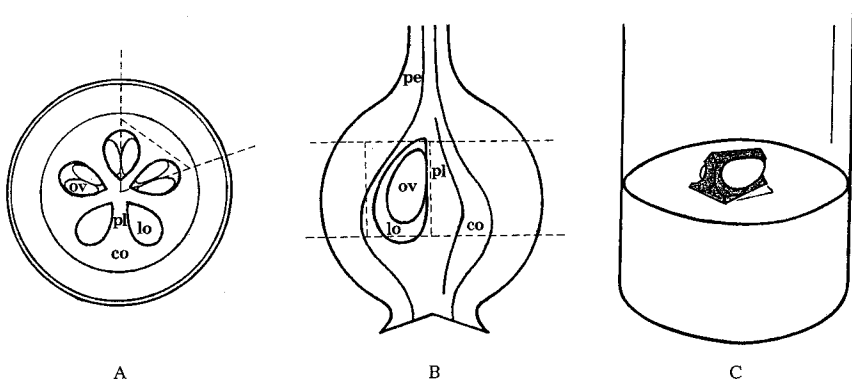


Fig. 1 Procedures for excising ovules from fruits of the apple rootstock Marubakaidou 'Mor-ioka-seishi'.

Dashed lines indicate the positions at which fruit was cut prior to explanting. A; cross section of fruit, B; vertical section of fruit, C; excised tissue on culture medium consisted of two ovules with placenta and core tissue segment. ov; ovule, pl; placenta, co; core, lo; locule, pe; peduncle.

の胚珠をさらに高濃度(12~25%)のショ糖を含む培地で培養し、生長した胚を培養器内で発芽させることによる実生の育成を試みた。また、この手法による実生獲得効率を樹上に放任した場合の効率と比較するために、供試樹の生理落果の様相および収穫された種子の発芽率の調査も並行して行った。

2. 材料および方法

材料には、岩手大学農学部果樹園のリンゴ台木マルバカイドウ(*Malus prunifolia* Borkhausen var. *ringo* Asami) '盛岡セイシ' 1 樹を用い、放任受粉により得られた果実を供試した。実験は 1991 年に行った。

(1) 生理落果および種子発芽調査

供試樹の 100 花叢(500 花)にラベルし、満開日(5 月 12 日)から果実収穫日(10 月 14 日)までの間、3~14 日毎に着花(果)数を調査するとともに、収穫果実中の種子数を調べた。またこれとは別に、満開後 140 日目に果実を収穫して種子を取り出し、3°C の暗黒下で 70 日間貯蔵後、表面殺菌した種子から胚を摘出して発芽用培地に置床した。表面殺菌は、種子を中性洗剤で洗浄後、70% エタノールに 3 分間、次いで Tween 20(0.1%) を添加した次亜塩素酸ナトリウム溶液(有効塩素 0.5%) に 3 分間浸漬し、その後滅菌水で 5 回洗浄して行った。発芽用培地としては、無機塩類を 1/2 濃度にした Linsmaier & Skoog 培地⁵⁾に、benzyladenine(BA) 1 mg/l, gibberellic acid(GA₄) 2 mg/l, ショ糖 2% を添加し、寒天(0.8%)で固化させたものを用いた⁴⁾。培地の pH はオートクレーブ滅菌前に 5.6 に調整した。培養は 25°C, 白色蛍光灯連続照明下(約 40 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$)で行った。胚を置床して 50 日後に、幼芽が伸長して本葉が展開した

ものを発芽とみなし、発芽率を算出した。

(2) 胚发育の組織学的観察

(1) の調査と並行して、供試樹から定期的に果実を採取し、果実または胚珠をホルマリン・酢酸・アルコール(FAA)液で固定した。その後パラフィン包埋法により連続切片(厚さ約 10 μm)を作成して、Haidenhein 鉄明ばんへマトキシリンおよびサフランニンの二重染色を行って、光学顕微鏡下で観察した。

(3) 胚珠培養による実生育成

満開後 10, 17 および 24 日目(5 月 22 日, 29 日および 6 月 5 日)に果実を採取し、(1)と同様の方法で表面殺菌を行った。殺菌した果実から、胚座と果心の一部を付けた胚珠を切り取り(Fig. 1), 胚珠培養用培地に置床した。胚珠培養用培地としては、Nitsch(1969)⁶⁾の無機塩類に Maheschwari & Lal(1961)⁷⁾のビタミン類を添加した培地に、ショ糖を 12, 15, 18, 21 あるいは 25% 加えたものを用いた。培地は寒天(0.8%)で固化させ、オートクレーブ滅菌前に pH を 5.6 に調整した。培養は 25°C, 暗黒下で行った。

約 110 日間培養後、胚珠および胚珠から摘出した胚の長さを測定し、生長した胚の数および培養した胚珠数に対する生長胚数の割合(生長胚率とする)を調査した。なお、ここでは、長さが 0.5 mm 以上のものを生長胚とみなした。これらの胚は、(1)と同様の方法で発芽用培地で培養して 50 日後に発芽率を調査し、実生獲得率(生長胚率×胚発芽率)を算出した。

3. 結果

(1) 生理落果および種子発芽調査

供試樹の生理落果は満開後 16 日目から 26 日目(5 月

Table 1. Effects of ovule age and sucrose concentration of ovule culture medium on embryo development and subsequent germination of the apple rootstock Marubakaidou 'Morioka-seishi'.

Ovule age (Days after full-bloom)	Sucrose conc. (%)	No. of cultured ovules	No. of developing ^{*1} embryos (%)	No. of germinating ^{*2} embryos (%)	Percentage of ^{*3} seedlings obtained
10	12	20	0 (0)	0 (—)	0
	15	20	1 (5)	0 (0)	0
	18	20	2 (10)	0 (0)	0
	21	20	3 (15)	1 (33)	5
	25	20	3 (15)	1 (33)	5
17	12	20	5 (25)	1 (20)	5
	15	20	4 (20)	1 (25)	5
	18	20	9 (45)	2 (22)	10
	21	20	13 (65)	3 (23)	15
	25	20	14 (70)	4 (29)	20
24	12	20	12 (60)	7 (58)	35
	15	20	17 (85)	10 (59)	50
	18	20	16 (80)	9 (56)	45
	21	20	15 (75)	9 (60)	45
	25	19	14 (74)	9 (64)	47

Excised ovules were cultured on modified Nitsh's (1969) media containing various concentrations of sucrose for 110 days. Developing embryos obtained by ovule culture were then placed on half-strength LS medium containing 1 mg/l BA and 2 mg/l GA₃ for germination.

^{*1} Embryos with over 0.5 mm long were recorded.

^{*2} Embryos which germinated and expanded some leaves after 50 days on the germination medium were recorded.

^{*3} (No. of germinating embryos/No. of cultured ovules) × 100.

28日から6月7日)までに多く、調査した500花(果)の約40%が落果した。また、8月末に通過した台風による落果および収穫前落果によりさらに着果数は減少し、調査終了時(10月14日)には、果実数は112個、その中の種子数は263個であり、したがって、平均種子数は2.35個となった。台風の影響を除くために、台風の直前である満開後107日目(8月27日)の着果数257個を最終的な果実数と仮定すると、収穫果率は51.4%(257/500)であると推測された。したがって、果実1個あたり10個の胚珠が形成されるとして、収穫種子率は12.1%(51.4×0.235)と算出された。一方、これとは別に収穫した果実から取り出した種子中の胚を用いて行った発芽試験の結果、発芽率は約67%であった。以上の結果から、供試樹の実生獲得率は8.1%(12.1×0.67)と算出された。

(2) 胚发育の組織学的観察

組織学的観察により、胚珠中の胚の发育ステージは、満開後10および17日目では接合子が1回あるいは数回分裂した前胚期であり、満開後25日目の切片の観察

により、満開後24日目では初期球状胚になっていることが明らかとなった(Fig. 2)。

(3) 胚珠培養による実生育成

満開後10, 17および24日目の胚珠培養における生長胚率はそれぞれ0~10%, 20~70%および60~85%であり(Table 1), いずれのシヨ糖濃度の培地でも、より生育の進んだ果実の胚珠を材料に用いた場合ほど生長胚率は有意に高かった(Table 2)。培地のシヨ糖濃度と生長胚率の関係については(Table 1, 2), 満開後10および17日目の胚珠を培養した場合は、シヨ糖濃度が高いほど生長胚率は高い傾向がみられた。しかし、満開後24日目の胚珠培養ではこの関係は認められず、シヨ糖濃度15%の培地で培養した場合に生長胚率が最も高く(85%), これより高シヨ糖濃度の培地では、生長胚率はやや低くなった(74~80%)。

胚珠培養による胚珠と胚の生長(長さ)について、その平均値をTable 3に示したが、いずれの時期の胚珠培養においても、培地のシヨ糖濃度が高いほど培養後の胚珠の長さは小さい傾向が認められた。しかし、胚の生長に

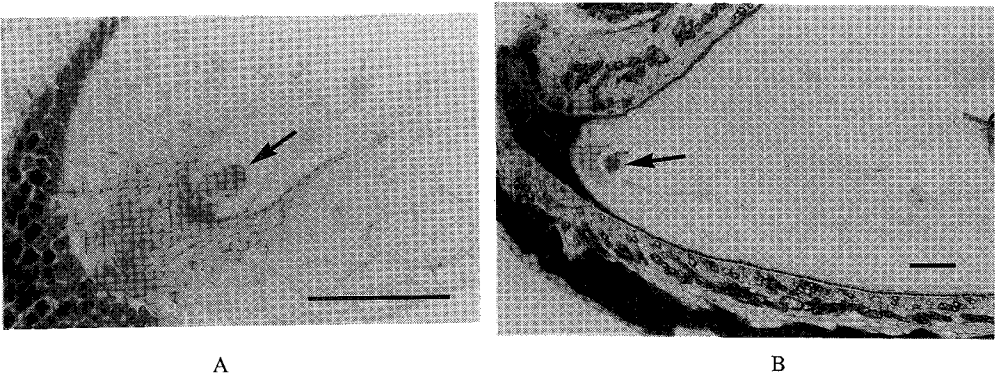


Fig. 2 Sections of ovules taken from fruits 17-(A) and 25-(B) days after full-bloom. Arrows indicate pro-embryo consisting of several cells-(A) and early globular embryo -(B). Bar=100 μm.

Table 2. Correlation coefficients of the data in Table 1.

Correlation between	Sucrose concentration(%)				
	12	15	18	21	25
Ovule age and percentage of developing embryos	+0.996**	+0.941*	+0.999**	+0.933*	+0.895*
Ovule age and percentage of germination	+0.984**	+0.996**	+0.992**	+0.705	+0.809
Ovule age and percentage of seedlings obtained	+0.924*	+0.908*	+0.952*	0.961**	+0.987**

Correlation between	Ovule age(Days after full-bloom)		
	10	17	24
Sucrose concentration and percentage of developing embryos	+0.953*	+0.937*	+0.280
Sucrose concentration and percentage of germination	+0.878	+0.767	+0.725
Sucrose concentration and percentage of seedlings obtained	+0.864	+0.976**	+0.521

* significant at 5 % level, ** significant at 1 % level.

Table 3. Effects of ovule age and sucrose concentration of ovule culture medium on the average length of cultured ovules and embryos therein of the apple rootstock Marubakaidou ‘Morioka-seishi’.

Ovule age (Days after full-bloom)	Sucrose concetration(%)				
	12	15	18	21	25
ovule length(mm)					
10	2.66 ^a	2.35 ^{ab}	2.38 ^{ab}	2.08 ^b	1.92 ^b
17	3.42 ^a	3.31 ^{ab}	3.07 ^b	3.06 ^b	2.97 ^b
24	4.43 ^a	4.26 ^a	4.21 ^{ab}	4.03 ^b	4.01 ^b
embryo length(mm)					
10	—	0.70 ^a	1.30 ^{ab}	1.00 ^a	0.90 ^a
17	2.42 ^a	1.45 ^{ab}	1.72 ^{ab}	1.59 ^{ab}	1.28 ^{ab}
24	2.54 ^a	2.69 ^a	2.05 ^{ab}	2.40 ^a	2.07 ^{ab}

Ovule length was recorded after 110 days of culture. Values in the same row that and not sharing the same letter are significantly different(Duncan’s multiple range test).

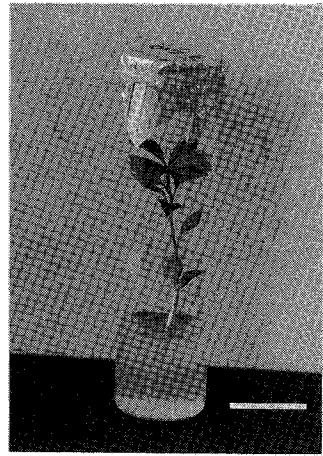


Fig. 3 A seedling of the apple rootstock Marubakaidou ‘Morioka-seishi’ established *in vitro* after 50 days on germination medium. Bar=2 cm.

についてはこの関係は明らかでなかった。

胚珠培養により生長した胚は、発芽用培地に移植して、約30日後には発芽し、50日後には培養器内で小植物体に生長した(Fig. 3)。材料に用いた胚珠の生育時期と胚の発芽率の関係をみると(Table 1)、胚珠培養用培地のシヨ糖濃度が12~18%の場合においては、満開後10、17および24日目の胚珠培養によって得られた胚の発芽率はそれぞれ0%、20~25%および56~59%であり、材料に用いた胚珠の生育が進んでいるほど生長胚の発芽率が有意に高かった(Table 2)。しかし、胚珠培養用培地のシヨ糖濃度が21%および25%の場合には、満開後10日目の胚珠からも発芽する胚が得られ、材料の生育との関係は明らかでなかった(Table 1, 2)。

胚珠培養およびその後の胚培養を通しての実生獲得率は、満開後10、17および24日目の場合において、そ

れぞれ0~5%、5~20% および35~50%であり(Table 1)、胚珠培養用培地のシヨ糖濃度がいずれの場合でも、材料に用いた胚珠の生長が進んでいるほど実生獲得率が有意に高かった(Table 2)。また、胚珠培養用培地のシヨ糖濃度と実生獲得率の関係をみると、満開後17日目の胚珠培養ではシヨ糖濃度が高いほど実生獲得率も高まる傾向が明らかであったが、満開後10および24日目の培養ではこのような関係は明らかでなかった(Table 1, 2)。しかし、満開後10日目の胚珠培養では、シヨ糖濃度21%および25%の培地を用いた場合にのみ、低率(5%)ながら実生が得られた。一方、満開後24日目の培養では、シヨ糖濃度15%の培地を用いた場合の実生獲得率が最も高く(50%)、これより高シヨ糖濃度の培地を用いても、実生獲得率は高まらず、やや低下する傾向がみられた(45~47%)。

以上のように、本実験では満開後24日目の胚珠培養によって、最も高い実生獲得率(50%)が得られた。また、それより早い、満開後10および17日目の胚珠でも、胚珠培養に高シヨ糖濃度(21, 25%)の培地を用いることによって、低率ながら(5~20%)実生を獲得できることが明らかとなった。

4. 考 察

供試樹として用いたマルバカイドウ‘盛岡セイシ’における、胚珠培養を行わない際の実生獲得率は、台風の影響および収穫前落果を除いた場合でも8.1%であった。また、同様の落果数調査を翌年(1992年)にも行ったところ、台風や収穫前落果がほとんど観察されなかったにもかかわらず、実生獲得率は7.2%であった(データ非掲載)。このようにマルバカイドウ‘盛岡セイシ’の実生獲得率が低い原因としては、以上のことがあげられる。すなわち、生理落果が多いこと(着果率51.4%)、

収穫果実中の種子が少ないこと(平均種子数 2.35 個)および収穫種子の発芽率が高くないこと(67%)である。

本研究では、満開後 24 日目の果実からの胚珠(初期球状胚期)を 15~25% のショ糖を添加した培地で培養し、生長した胚をさらに発芽用培地で発芽させることによって、培養した胚珠中の胚の 45~50% から実生を得ることができた。満開後 24 日目は早期落果(ジュンドロップ)がほぼ終了する時期であり、すでに約 40% が落果している。したがって、約 60% の果実が残っている時期に胚珠培養を行って 45~50% の実生を獲得したことになる。真の実生獲得率は 27~30% であると考えられる。この値は、胚珠培養を行わない場合の実生獲得率である 8.1% と比較して明らかに高く、胚珠培養によって効率的に実生を育成できることが示された。

生理落果によって失われる胚を事前に救済するためには、生理落果初期に胚珠培養を行うことが望ましいが、本研究では、生理落果初期である満開後 10 および 17 日目に行った胚珠培養では、生長胚率およびその後の胚発芽率が低く、実生を効率的に育成することができなかった。しかし、満開後 10 および 17 日目の胚珠(前胚を含む)でも、高ショ糖濃度(21, 25%)の培地を用いることにより生長胚率が高まり、それを発芽させることによって、低率ながら実生の育成が可能であることが示された。

これまでに、胚培養では未熟な胚を材料に用いた場合ほど高浸透圧の培地を要求することが知られており⁸⁾、また、胚珠内の浸透価が胚発生初期には高く、胚の生長に伴い浸透価が低下することも報告されている⁹⁾。本実験で観察された高ショ糖濃度の効果も、おそらくショ糖による培地の浸透圧の上昇によるものであると考えられる。今後はこの点を明らかにするために、ショ糖以外の浸透圧調節剤(マンニトールなど)を用いた実験を行う必要がある。一方、培地の高浸透圧が胚の生長を促進する効果は、植物生長調節物質の添加により代替できること

も示されており、胚の生長に関する植物生長調節物質の重要性が指摘されている¹⁰⁾。初期球状胚以前の未熟な胚を含む胚珠培養を効率よく行うためには、今後さらに、培地の浸透圧のみならず植物生長調節物質の添加などを検討する必要がある。

本研究では、マルバカイドウの胚珠を培養することにより、効率的に実生を育成できることが示された。胚珠培養は、胚培養と比較して受精後の早い時期からの培養が可能であり、また、操作および培養条件も比較的簡便であるなどの利点を持つ¹¹⁾。本研究で確立された方法は、マルバカイドウ‘盛岡セイシ’を母本とした交雑育種をより効率的に行うために、容易に応用できるものと思われる。

謝 辞

本論文をまとめるにあたって、ご指導およびご助言をいただきました、新潟大学大学院自然科学研究科 中野優博士に感謝の意を表します。

文 献

- 1) 吉田義雄, 1986. 農業および園芸, **61**: 1233-1238.
- 2) 吉田義雄, 1986. 農業および園芸, **61**: 1335-1341.
- 3) 石原愛也, 梶山 努, 福山 勉, 富山和香子, 1989. 園学要旨, 平 1 東北支部: p. 53-54.
- 4) 石原愛也, 大宮 知, 1991. 園学要旨, 平 3 東北支部: p. 73-74.
- 5) Linsmaier, E. M., F. Skoog, 1965. *Physiol. Plant.*, **18**: 100-127.
- 6) Nitsch, J. P., 1969. *Phytomorph.*, **19**: 389-404.
- 7) Maheschwari, N., M. Lal, 1961. *Phytomorph.*, **11**: 307-314.
- 8) Rietsema, J., S. Satina, A. F. Blakeslee, 1953. *Amer. J. Botany.*, **40**: 538-545.
- 9) Ryczkowski, M., 1969. *Z. Pflanzenphysiol. Bd.*, **61**: 422-429.
- 10) Raghavan, V., J. G. Torrey, 1963. *Amer. J. Botany.*, **50**: 540-551.
- 11) Rangan, T. S., 1984. *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants.*, **1**: 227-231.

Summary

Efficient Acquisition of Apple Rootstock Seedlings by *In Vitro* Ovule Culture

Tomo OOMIYA* and Aiya ISHIHARA**

Faculty of Agriculture, Iwate University, 3-18-8 Ueda, Morioka, Iwate 020, Japan

* Current address: *Takikawa Animal Husbandry Experiment Station of Hokkaido, 735-1 Higashi-Takikawa, Takikawa, Hokkaido 073, Japan*

** Current address: 3-25-8 Motomachi, Urawa, Saitama 336, Japan

Seedlings of the apple rootstock Marubakaidou 'Morioka-seishi' (*Malus prunifolia* Bork. var. *ringo* Asami) were efficiently obtained by *in vitro* ovule culture. Ovules with placenta and core tissue segment were taken from open-pollinated fruits of various mature stages (10, 17 or 24 days after full-bloom) and cultured on modified Nitsch's (1969) media containing various concentrations of sucrose (12 to 25%) in the dark. After 110 days, developing embryos were excised from the cultured ovule and transferred to half-strength LS medium containing 1 mg/l BA and 2 mg/l GA₄ under continuous illumination for germination. Frequencies of both embryo development in the cultured ovule and seedling formation increased as more mature fruits were used. Seedlings were obtained most efficiently (50%) when ovules containing early globular embryo (24 days after full-bloom) were cultured on the medium with 15% sucrose. However, few seedlings were obtained from immature ovules containing proembryo when cultured on the media with 21 or 25% sucrose.