

[研究報文]

日本原産野生種クマガワブドウ (*Vitis kiusiana* Momiyama) の挿し木発根の困難性と枝梢内フェノール物質との関係望岡亮介¹・小田容子²・椿本美也子²¹香川大学農学部附属農場 〒769-2304 さぬき市昭和字谷乙300-2²大阪府立大学農学部 〒599-8531 堺市学園町1-1Relationship between Rooting Difficulty of Cuttings and Content of Phenolic Compounds in Shoots of the Japanese Wild Grape *Vitis kiusiana* MomiyamaRyosuke MOCHIOKA¹, Yoko ODA² and Miyako TSUBAKIMOTO²¹University Farm, Faculty of Agriculture, Kagawa University, Showa, Sanuki, Kagawa 769-2304, Japan²College of Agriculture, Osaka Prefecture University, Gakuen-cho, Sakai, Osaka 599-8531, Japan

The rooting ability of cuttings of *Vitis kiusiana* Momiyama, a Japanese wild grape species, was investigated. Both hardwood and softwood cuttings were difficult to root, and even indolebutyric acid treatment could not improve the rooting of hardwood cuttings. Ethanol extracts from dormant shoots of both *V. kiusiana* and 'Muscat of Alexandria' inhibited the root growth of rice seedlings, but the *V. kiusiana* extract had stronger inhibition. These solutions seemed to contain phenolic compounds because rice root growth was improved when polyvinylpyrrolidone (PVPP), a phenolics absorbent, was added. The seasonal endogenous phenolic compound content per dry weight of *V. kiusiana* shoots exceeded that of 'Campbell Early'. The results show that the rooting ability of *V. kiusiana* cuttings is very poor because of excess endogenous phenolics in the shoots.

Key words: *Vitis kiusiana* Momiyama, wild grape, rooting ability, phenolic compounds, genetic resources

緒 論

わが国に自生する野生ブドウのうち、クマガワブドウ (*Vitis kiusiana* Momiyama) は熊本県球磨川流域で発見された野生種であり、枝梢上に短い腺毛を有することが知られている (17, 18)。このクマガワブドウは、日本自然保護協会刊行の「我が国における保護上重要な植物種」(通称「日本版レッドデータブック植物編」)において危急種に挙げられており、今すぐ絶滅の危機に瀕することはないが、現状では確実に絶滅の方向に向かっていると判断されている (20)。

本種は、接ぎ木用の台木として掘り取られるとの報告もあるが (20)、ほとんど利用されていない。しかし、本種の果皮に含まれるアントシアニンの種類 (15) および含量 (19) は栽培ブドウよりも多く、同種 (20) またはその変種 (10) ではないかと考えられている中国の毛葡萄 (*V. quinquangularis*

Rehder) はすでに中国広東省永福県および山東省博山県などの地域で栽培、利用されており、その果実で醸造したワインはチョウセンヤマブドウ (*V. amurensis* Rupr.) のものより良好で、ワインの原料としては中国原産野生ブドウ中、最優秀の評価を得ている (8, 11)。しかし、毛葡萄は挿し木発根が極めて困難であり (9, 12)、さらに、オーキシン処理による挿し木発根率の向上も見られないため、繁殖は取り木および毛葡萄実生への接ぎ木が一般的に行われている (12)。クマガワブドウも極めて挿し木発根が困難であると考えられ、本種の個体再生および増殖は、遺伝資源の保護の面から、あるいは野生種を原料とした加工品などへの利用の面から重要な課題である。

そこで本研究は、クマガワブドウの挿し木発根に関していくつかの知見を得たので報告する。

2002年3月2日受理

本報告の一部は、園芸学会平成7年度春季大会および園芸学会中四国支部平成13年度大会において発表した。

材料と方法

実験 1. 挿し木実験

(1) 休眠枝挿し

休眠期である12月上旬に、大阪府立大学実験圃場栽植のクマガワブドウ成木および比較的挿し木発根の容易な栽培品種の‘マスカット・オブ・アレキサンドリア’（以下、‘アレキ’）成木（大阪府立大学農学部附属農場無加温ガラス室内栽植）より採取した休眠枝を1芽に調製した後、45℃の温湯に6時間浸漬処理して休眠打破し、一部を休眠打破直後にバーミキュライト床に挿し、残りをさらにインドール酪酸（IBA）1000mg/L（50%エタノール水溶液）に5秒間基部浸漬処理した後、バーミキュライト床に挿し木した。各処理区には挿し穂を20本供試し、25℃の恒温室内に入れて1か月後の発根率を調査した。

(2) 底熱処理

休眠期に採取したクマガワブドウと‘アレキ’の枝を乾燥しないように4月まで低温貯蔵しておき、4月に1芽に調製した20本の挿し穂を、底にニクロム線が引かれている川砂床に挿し木し（地温20℃）、1日15分間ミスト灌水して、1か月後の発根率を調査した。なお、IBA処理は行わなかった。

(3) 緑枝挿し

新梢伸長が盛んな時期である8月にクマガワブドウと‘アレキ’の緑枝を採取し、1芽に調製（葉は1/2に切除）した後、20本の挿し穂をバーミキュライト床に挿し木し、寒冷紗で遮光したミスト室に搬入した。灌水のためのミスト処理は日中30分ごとに30秒間行った。1か月後の発根率を調査した。なお、IBA処理は行わなかった。

実験 2. 枝梢内フェノール物質の発根抑制作用の検定

休眠期である1月に、クマガワブドウ（枝梢の直径7～9mm）と‘アレキ’（枝梢の直径10～12mm）の枝梢100gを採取し、剪定鋏で細かく裁断した後、茶珍（1）の方法を参考にして熱エタノール抽出を行った。抽出液はエバポレータ（45℃以下、減圧下）でエタノールを除去後、100mLに定容した。定容液は、以下のフェノール物質含量の測定およびイネによる生物検定に用いた。

フェノール物質含量の測定は、定容液の500倍希釈液5mLに酸度が1Nのフェノール試薬5mLを加

えて混合し、3分後に10%炭酸ナトリウム水溶液5mLを加えてさらに混合し、1時間後に分光光度計により530nmの吸光度を測定した。検量線はクロロゲン酸について作成した（1）。

発根抑制作用の生物検定には、大阪府立大学農学部附属農場で収穫されたイネ‘日本晴’の実生を用いた。すなわち、イネ種子を1%次亜塩素酸ナトリウム水溶液に15分間浸漬して滅菌した後、水洗して脱イオン水を入れたビーカー中に播種した。ハト胸期に達した種子を、試料液2mLを入れた管びんに20粒ずつ置床し、蛍光灯下、25℃で1週間培養した後、地上部（第2葉鞘長）および地下部（最大根長）を測定した。試料液として、前述のクマガワブドウおよび‘アレキ’の定容液を、1（原液）、1/10、1/100および1/1000にそれぞれ脱イオン水で希釈したものを用いた。なお、対照区は脱イオン水とした。さらに、各試料液にフェノール物質吸着剤である不溶性のポリビニルピロリドン（PVPP）を2%（W/V）添加・振とうした後のろ液についても同様の検定を行った。

実験 3. 枝梢内フェノール物質含量の季節的变化

大阪府立大学農学部実験圃場栽植のクマガワブドウおよび‘キャンベル・アーリー’（以下、‘キャンベル’。枝梢の直径7～10mm）を用い、萌芽直前（クマガワブドウ：4月12日、‘キャンベル’：4月7日）、萌芽直後（クマガワブドウ：4月15日、‘キャンベル’：4月15日）、新梢伸長最盛期（クマガワブドウ：6月25日および9月3日、‘キャンベル’：6月25日）、新梢伸長停止期（クマガワブドウ：10月9日、‘キャンベル’：9月3日）、落葉期（クマガワブドウ：11月9日、‘キャンベル’：10月9日）および休眠期（クマガワブドウ：12月17日、‘キャンベル’：12月13日）にそれぞれ枝梢を採取し、抽出時まで-20℃の冷凍庫に保存した。フェノール物質の定量では、各20gの枝梢に99%エタノールを加えて抽出し、続いて酢酸エチルで分配、グリシン塩NaOH分配し、精製した（Fig. 1）。このグリシン塩NaOH可溶性画分は強アルカリ性なので、1MのHClでpHを6.5に調整し、20mLに定容した。その後、定容液を200倍に希釈し、実験2.の方法でフェノール物質を分光光度計により比色定量した。その際、吸光波長は750nmとし、フェノール物質含量は

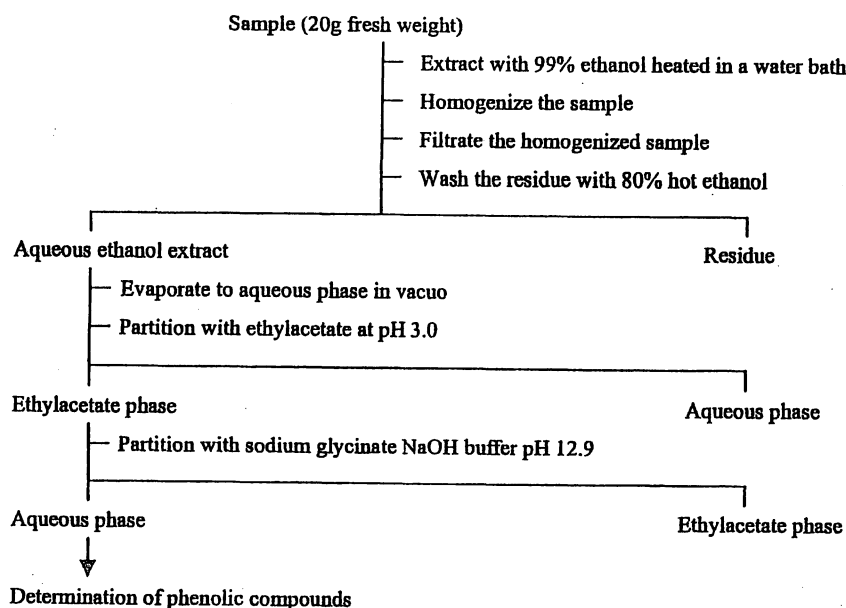


Fig. 1. Flow diagram showing procedure for extraction and purification of phenolic compounds.

没食子酸で換算した。

結果

実験 1.

挿し木実験の結果をTable 1に示した。‘アレキ’はいずれの処理区においても高い発根率を示したのに対して、クマガワブドウは、温湯により休眠打破した枝梢で、IBA処理の有無に関わらず萌芽個体は認められるものの、葉が2～3枚展開するまでに新梢は枯死し、発根は全く認められなかった。一方、底熱処理区では15%、緑枝挿し区では20%の発根が認められるにとどまり、クマガワブドウは挿し木発

根の困難なことが確認された。また、クマガワブドウの緑枝挿し区の生存個体のうちで発根が認められなかった個体の多くは、挿し木基部にカルスが形成されていた (Fig.2)。

実験 2.

イネ‘日本晴’を用いた生物検定の結果をFig.3に示した。イネ地上部 (第2葉鞘長) では、クマガワブドウ、‘アレキ’の抽出液の1倍液 (原液)を除いて、PVPP添加、無添加にかかわらず、両者の生育に差異は見られず、対照区と大差はなかったが、抽出液の濃度が濃いほど根の生長は抑制された。すなわち、挿し木発根が容易な‘アレキ’では1/100

Table 1. Rooting rates of *Vitis kiusiana* and ‘Muscat of Alexandria’ cuttings.

Grape	Cutting	Treatment	Rooting rate (%)
<i>Vitis kiusiana</i>	Hardwood	Hot water ^z	0
		Hot water+IBA ^y	0
	Softwood	Bottom heat ^x	15
		Mist irrigation	20
‘Muscat of Alexandria’	Hardwood	Hot water	60
		Hot water+IBA	50
	Softwood	Bottom heat	80
		Mist irrigation	75

^z Cuttings were soaked in 45°C water for 6 h to break their bud dormancy.

^y Cuttings were soaked in 45°C water for 6 h, and the basal parts of the cuttings were then immersed in 50% aqueous ethanol with 1,000mg/L IBA for 5 seconds.

^x The temperature was 20°C.

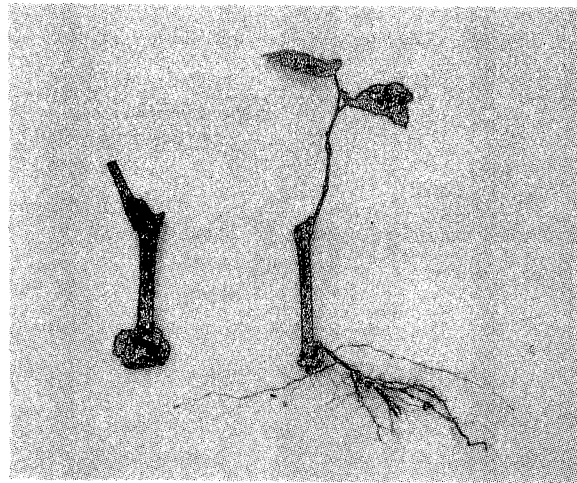


Fig. 2. Features of surviving *Vitis kiusiana* softwood cuttings. Left: cutting with a callus on its base without root formation or shoot elongation. Right: cutting exhibiting root formation and shoot elongation.

希釈液で根の生長抑制が見られなくなったのに対して、挿し木発根が困難なクマガワブドウでは同倍率の希釈液でも著しい根の生長抑制が認められ、1/1000希釈液で根の生育抑制が見られなくなった。しかし、PVPP添加区では1/100希釈ですでに根の生育抑制は見られなくなった。また、PVPP無添加区で1/1000希釈液は根の生長を促進する傾向が見られた。

なお、この時期のクマガワブドウの枝梢内フェ

ノール物質含量は‘アレキ’の約2.5倍であった (Table 2)。

実験 3.

枝梢内フェノール物質含量の季節的变化をFig.4に示した。新鮮重当たりのフェノール物質含量では、‘キャンベル’では新梢伸長最盛期 (6月下旬) に急減したが、その他の時期はほぼ一定の値であった。それに対して、クマガワブドウでは萌芽に伴いフェノール物質含量は減少し、9月上旬に最低値を示し

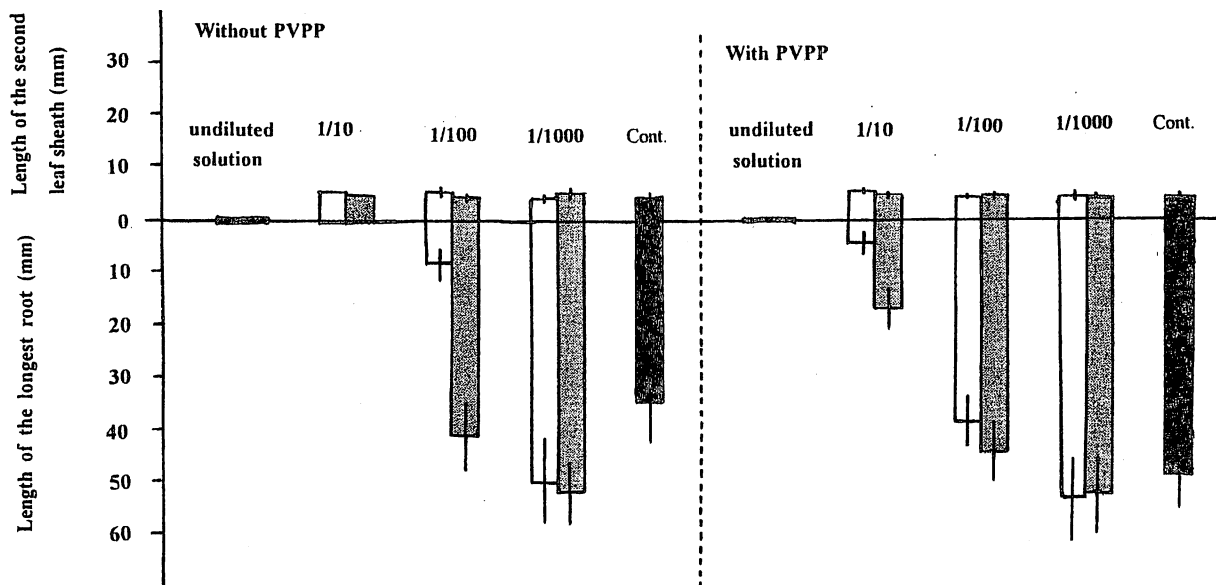


Fig. 3. Influence of ethanol extracts from shoots of *Vitis kiusiana* and ‘Muscat of Alexandria’ on growth of ‘Nipponbare’ rice seedlings. Bars indicate standard error.

□ : *Vitis kiusiana*, ■ : ‘Muscat of Alexandria’, ■ : Control (deionized water)

Table 2. Phenolic compound contents extracted from dormant shoots of *Vitis kiusiana* and 'Muscat of Alexandria'.

	Phenolic compound contents ^z (g/100 g fresh weight)
<i>Vitis kiusiana</i>	0.68±0.09 ^y
'Muscat of Alexandria'	0.30±0.07

^z Phenolic compounds were converted into chlorogenic acid.

^y Means ± standard error.

たが、休眠期に向かって増大していった。また、乾物重当たりのフェノール物質含量で見ると、'キャンベル'では調査期間中0.6~0.8mg/100gDWと変動は小さかったが、クマガワブドウは全期間を通じて'キャンベル'より高い値を示した。

休眠期(12月)におけるフェノール物質含量は、新鮮重および乾物重のどちらの場合でも、クマガワブドウは'キャンベル'の約2倍の値を示した。

考 察

一般に、挿し木発根の容易な植物では、フェノール物質であるタンニンが挿し穂中に少なく、デンプン含量の高い傾向が見られるのに対して、発根困難

な樹種ではタンニン含量が高く、デンプン含量の低い傾向にあることが指摘されている(13)。さらに、フェノール物質が植物の発根を阻害するという報告もいくつか知られている(4、5、6、7)。本研究において、供試した休眠枝の抽出液では根の生育抑制が見られたが、抽出液にPVPPを添加し、フェノール物質を除去してイネ生育テストにかけたところ、根の生育抑制が軽減されたことから、イネの根の生育を抑制していたのはフェノール物質であることが示唆された。

ヤナギ(*Salix atrocinerea*)やクリ(*Castanea sativa*)の枝梢内にはフェノール物質であるパラオキシ安息香酸あるいはバニリン酸の存在が確認されているが、これらのフェノール酸は、低濃度では発根促進、高濃度では発根抑制作用があるとされている(3)。本研究の結果、クマガワブドウの休眠枝は、挿し木発根容易な'アレキ'や'キャンベル'の2倍程度のフェノール物質を含むことが明らかとなり、また、PVPP無添加の生物検定において、低濃度である1/1000希釈液でイネの根の生長が促進されたことから、ブドウの挿し木における発根の難易も、この枝梢内フェノール物質含量により影響されるものと推察された。なお、ブドウの枝梢中に含まれるフェノール物質の種類について報告が見当たらなかったため、今回クロロゲン酸と没食子酸で換算した。

ブドウの茎頂培養において、茎頂中の全フェノール含量と茎頂の生存率の間に負の相関関係のあることが認められている(23)。さらに、筆者ら(16)はクマガワブドウの茎頂培養において、茎頂をフェノール物質吸着剤のポリビニルピロリドン(PVP)

添加滅菌水中で摘出し、PVPPを添加した固形培地で培養すると生存率が向上することも認めている。

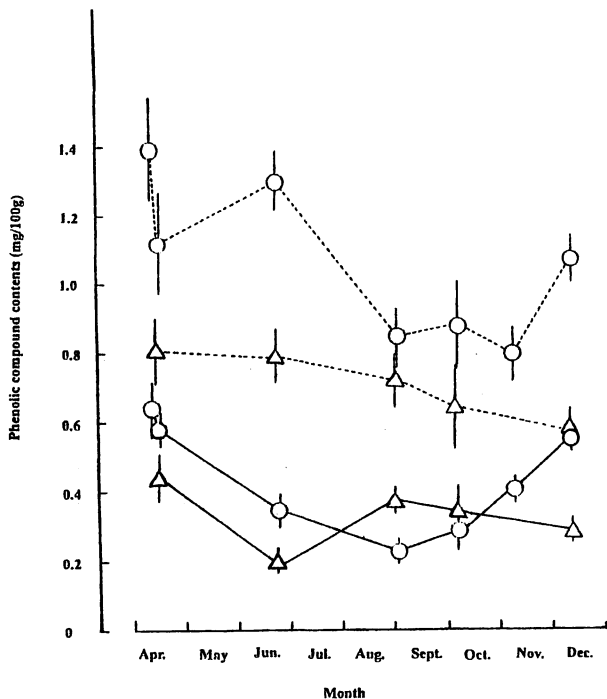


Fig. 4. Seasonal changes in contents of phenolic compounds extracted from shoots of *Vitis kiusiana* (○) and 'Campbell Early'(△). Phenolic compounds were converted into gallic acid. Broken and unbroken lines indicate content per dry weight and fresh weight, respectively. Bars indicate standard error.

クマガワブドウと同じく、休眠枝の挿し木発根が極めて困難であるマスカディン・ブドウ (*Vitis rotundifolia*) の繁殖は主に取り木あるいは緑枝のミスト挿しが行われ成功をおさめているが、7月中旬以降は発根率が低下し、IBA処理による発根率の向上効果は劣るとされている(2)。マスカディン・ブドウの挿し木発根困難性の原因についての研究報告は見当たらないが、あるいはクマガワブドウと同様、挿し穂中に発根阻害物質が多く含まれているのかもしれない。

フェノール物質は植物にとって病虫害からの生体防御物質でもあり、栽培グリ(21)やシバグリ(14)では、クリタマバチの被害を受けていない樹はカテコールタンニン、ロイコシアニジンなどのポリフェノール含量が高いことが報告されている。クマガワブドウの圃場観察では、ブドウスカシバやブドウトラカミキリの幼虫の食害は現在認められておらず(未発表)、本野生種が樹幹害虫に対して抵抗性を持つことをうかがわせている。また、毛葡萄も病虫害があまり認められず(12)、黒痘病には抵抗性を示すとされている(22)。

以上の結果から、クマガワブドウの挿し木発根の困難な原因は枝梢内にフェノール物質が多く含まれるためではないかと思われる。なお、‘キャンベル’の9、10月の新鮮重当たりのフェノール物質含量はクマガワブドウより多かったが、これは‘キャンベル’がこの時期に新梢伸長停止期および落葉期に当たるのに対し、クマガワブドウはまだ新梢伸長を続けていたためと思われる。

要 約

日本原産野生種クマガワブドウ (*Vitis kiusiana* Momiyama) の挿し木発根能について調査した。

- クマガワブドウは、休眠枝挿し、緑枝挿しとも発根率は低く、休眠枝挿しではIBA処理による発根促進効果が認められなかった。
- クマガワブドウおよび‘マスカット・オブ・アレキサンドリア’の休眠枝のエタノール粗抽出液中にはイネ実生の根の生長を阻害する物質が含まれていたが、クマガワブドウの方が阻害の程度は強かった。その粗抽出液に、フェノール物質吸着剤であるポリビニルピロリドン

添加すると、イネの根の生長抑制は軽減されたので、この生長阻害物質はフェノール物質であると考えられた。

- クマガワブドウおよび‘キャンベル・アーリー’の枝梢中フェノール物質含量の季節的变化を調査したところ、乾物重当たりのフェノール物質含量はいずれの時期でもクマガワブドウが上回った。

以上のことから、クマガワブドウの挿し木発根困難性が確認され、枝梢中に含まれるフェノール物質が多いことがその原因の一つであると考えられた。

文 献

- 茶珍和雄. 園芸学実験・実習. pp.155-177. 大阪府立大学農学部園芸学教室編. 養賢堂, 東京 (1981).
- Goode, D. Z., Jr. and R. P. Lane. Rooting leafy muscadine grape cuttings. HortScience 18: 944-946 (1983).
- 畑野健一・佐々木恵彦. 樹木の生長と環境. pp.25-26. 養賢堂, 東京 (1987).
- 石井孝昭・門屋一臣. 鶏ふんおがくず堆肥施用がカンキツ樹の生育に及ぼす影響. 愛媛大学教育学部紀要(自然) 6: 45-58 (1985).
- 石井孝昭・門屋一臣. カラタチおよびイネの生長に及ぼすスギならびにヒノキ材中の生育阻害物質について. 園学雑. 62: 285-294 (1993).
- 石井孝昭・門屋一臣. カンキツ園の土壌改良資材としてのスギ樹皮およびヒノキ樹皮の利用に関する研究. 園学雑. 62: 295-303 (1993).
- 河合義隆・一井隆夫・W. M. Kliewer. ブドウのさし木の発根に関する研究 第1報. 摘芽とフェノール物質処理が発根に及ぼす影響. 園学雑. 60(別1): 146-147 (1991).
- 胡若冰・王發明. 山東野生葡萄資源及其利用. 落葉果樹1: 24-28 (1987).
- Li, S., P. Jin and H. Li. Studies on the germplasm of *Vitis* species native to the southern parts of China. I. A high sugar content wild species *V. pseudoreticulata*. Proceedings of Intr. Symp. Hort. Germ. 234-241. Academy Press. Beijing (1989).

10. 李世誠・堀内昭作・望岡亮介・山澤通子・松井弘之. 日本及び中国原産野生ブドウの比較検討 第2報. クマガワブドウと毛葡萄の形態学的特性について. 園学雑. 60 (別1) : 132-133 (1991) .
11. 李世誠・堀内昭作・望岡亮介・松井弘之. 東アジア原産野生ブドウに関する諸問題 (2). 農業および園芸. 67 : 1277-1280 (1992).
12. 馬守信・黄汝豊・李建台・尚広興・郇政永. 野生資源—毛葡萄的開発利用研究. 落葉果樹4 : 15-18 (1986).
13. 町田英夫. さし木のすべて. pp.14-17. 誠文堂新光社, 東京 (1974).
14. 松井鑄一郎・鳥潟博高. クリのクリタマバチ抵抗性に関する研究 (第1報) シバグリ新梢樹皮中のポリフェノール性物質の季節的变化. 園学雑. 37 : 95-101 (1968).
15. 望岡亮介・山口雅篤・堀内昭作・松井弘之・黒岡浩. 日本原産野生ブドウの果皮中アントシアニン色素による化学的分類. 園学雑. 64 : 463-470 (1995).
16. 望岡亮介・濱路資治・堀内昭作・黒岡浩. 挿し木発根困難な日本原産野生種クマガワブドウ (*Vitis kiusiana* Momiyama) の茎頂培養による個体再生. 植物組織培養13 : 139-145 (1996).
17. 初山泰一. 葡萄二種. 植物研究雑誌11 : 525-529 (1935).
18. 初山泰一. 日本には *Vitis lanata*, ROXBURGH はない. 日本生物地理学会会報5 (3) : 199-207 (1935).
19. 中川昌一・湯田英二・堀内昭作・松井弘之. 日本原産野生ブドウの栽培利用に関する研究. 昭和59年度科学研究費研究成果報告書 (1986).
20. 日本植物分類学会. レッド・データ・ブック. 日本の絶滅危惧植物. p.95. 農村文化社, 東京 (1993) .
21. 鳥潟博高・松井鑄一郎. クリの種および品種におけるポリフェノール性物質、ならびにその含量とクリタマバチ抵抗性との関係. 園学雑. 35 : 89-97 (1966).
22. 王躍進・賀普超. 中国葡萄属野生種抗黒痘病的鑑定研究. 果樹科学4 : 1-8 (1987).
23. Yu, D. and C. P. Meredith. The influence of ex-

plant origin on tissue browning and shoot production in shoot tip cultures of grapevine. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 111: 972-975 (1986).