

北限地帯のイチゴ生産における
組織培養技術の利用に関する研究

1997

岩手大学大学院
連合農学研究科

我妻尚広

①

北限地帯のイチゴ生産における
組織培養技術の利用に関する研究

1997

岩手大学大学院
連合農学研究科

我妻尚広

目 次

緒 論	-----	1
第 1 章 イチゴの組織培養に関する基礎的研究	-----	5
第 1 節 茎頂培養および大量増殖におよぼす培 地組成と培養条件の影響	-----	6
第 2 節 茎頂培養由来の幼植物の生長におよぼ すランナー採取日の影響	-----	21
第 2 章 イチゴにおけるウイルスフリー苗生産の 効率化に関する研究	-----	32
第 1 節 茎頂生長におよぼすランナーの低温貯 蔵の影響	-----	33
第 2 節 茎頂生長におよぼすランナーの前処理 と低温貯蔵期間の影響	-----	41
第 3 節 組織培養作業の簡略化	-----	51
第 3 章 イチゴの四季成り性系統育成に関する研究	--	63
第 4 章 総合考察	-----	76
摘 要	-----	81
謝 辞	-----	84
引用文献	-----	85
Summary	-----	95

結 論

わが国ヘイチゴ (*Fragaria ananassa* Duchesne) の栽培種が伝来したのは1830年代(天保年間)であつたらしい。開港地であつた長崎へオランダ人によつて伝えられた。その伝来経路からオランダイチゴという別名もあつたが栽培には至らなかつた²⁾。イチゴの営利栽培は1896年に静岡県久能地区へ‘ピクトリア’が導入され、石垣イチゴとして定着したことに始まる⁸⁵⁾。それ以降、生産量がしだいに増加し、戦後の高度経済成長期には大衆果実として一般消費者に浸透した。また、この頃から生食中心であつた消費形態が新たに洋生菓子のトッピングフルーツなど業務用としての需要が生じ、消費期間も通年化していった。

世界のイチゴ生産はこの40年間で約6倍に増加した⁸⁰⁾。わが国のイチゴ生産量は1994年には20.7万tとなり、アメリカ、スペインに次ぎ世界第3位であつた¹³⁾。国内の主要産地は関東周辺と西南暖地であり、その作型は収穫期を12月から3月とした促成栽培が中心で、一部には2月から5月に収穫する半促成栽培も見られる。そのため、国内生産は12月から5月に集中し^{76, 77)}、この期間に全体のおよそ95%を生産している。近年、通年化した需要に対応するため、国内生産の端境期(7月から10月)を中心に業務用としてカリフォルニアなどから約5,000tが輸入されている^{30, 36, 78, 79)}。しかし、輸入イチゴは果実品質とくに食味や安全性の問題が指摘され、端境期に安定供給ができる国内産地の形成が望まれている。これに対し、主要産地では電照、夜冷および高冷地育苗などの技術を利用し、促成栽培の収穫期をさらに前進させる検討がなされている^{15, 94, 143)}。この他、高冷地での抑制栽培も試みられているものの^{46, 47)}、十分な成果は上がっていない。また、北海道における融雪の地域差によつて生じる多様な収穫期や冷涼な気象条件を利用した夏秋どり栽培が国

内生産の端境期の供給源として注目されている。すなわち、6月に収穫する早熟栽培、6月中旬から7月上旬に収穫する露地栽培、9月上旬から10月中旬に収穫する抑制栽培（夏秋どり栽培）である^{28, 31, 33, 45, 110}。また、本研究が対象としているわが国で最も融雪の遅い北空知地区には7月上旬から8月上旬に収穫する露地栽培がある。これらの収穫期は主要産地の端境期にあたり、望まれる国内産地として十分な可能性を備えている。しかし、大消費地に移出できるほどの産地形成には至らず、北海道のイチゴ生産量は2,700tにとどまっている。

イチゴ栽培は全国的に労働集約的で手作業が多く、機械化や大幅な省力化が進みにくく、生産者の高齢化や後継者不足といった問題を抱えている。これらに加えて、北海道には、降雪や晩霜により栽培期間が短いこと、各種農作業が一時期に集中すること、6月以降の高温期に収穫・流通されることなど特有の栽培条件や流通環境がある⁹¹⁾。北海道で産地形成が進まない理由には全国的な問題以外に北海道特有の要因がある。

北海道特有の要因によって生ずる問題として、第1に育苗効率があげられる。一般に、主要産地における育苗は3月下旬の増殖苗定植に始まり、9月中旬の本圃への生産苗の定植まで続くが、この作業は12月から3月までの収穫作業とはほとんど重ならない。しかし、北海道の育苗では、秋の増殖苗定植が生産苗の本圃定植と重なり、融雪後の育苗管理が本圃での収穫作業と重なる。また、主要産地では育苗期間が長いので、増殖苗1株から100～150株の生産苗が得られるのに対し、北海道では育苗期間が短いため、生産苗は20～30株しか得られない。つまり、北海道では主要産地に比べ、作業の重複や苗の増殖効率が低いという問題がある。とくに作業の重複は労働力確保の点からも問題であり、産地形成の大きな障害となっている。

近年，主要産地ではイチゴの苗生産を専門とする企業や農業者と果実生産を専門にする農業者とに分業化が進み，作付面積の確保に貢献している．これらの分業化に際し，まん延しつつあるウイルス病^{18,44,109)}の対策を含めて組織培養技術の導入がなされ，一層効率的なものになっている^{22,34,123,144)}．しかし，北海道では主要産地にくらべ必要性が高いにもかかわらず，分業化が十分に進んでいない．

第2に適応品種および収量に関する問題がある．現在，北海道の主要品種は1957年に種苗登録された地域適応性および作型適応性の高い‘宝交早生’である．他に春どりでは‘盛岡16号’や‘ベルルージュ’が，夏秋どりは‘夏秋77号’がわずかに栽培されている．‘宝交早生’は高温期に果実が小玉になりやすく，果実品質も軟化する欠点を持ち，6月以降の収穫・流通に耐えうる品種ではない．

一方，北海道では長日条件の時期に収穫期を迎えるため，花芽分化が連続的に起こらず，収穫期間が1ヶ月程度と短い．その結果，10aあたりの収量は全道平均で約0.8tと全国平均の2.4tに比較し1/3程度と少なく，主要産地ほどの収益が得られない⁹¹⁾．そこで，1株あたりの収量を増加させるため，夏秋期と春期の2回収穫する二季どりが検討されている^{26,83)}．また，夏秋どりには短日処理に多くの労力を必要とするため，省力化を目的に四季成り性品種の導入も試みられている．しかし，現在ある四季成り性品種は収量や果実硬度が一季成り性品種に劣るために，普及には至っていない．このように，北海道にはその環境条件に十分適応した品種がいまだ育成されておらず，大果，多収で，日持ち性と輸送性の高い，短日処理による花芽誘導の可能な品種や四季成り性品種の育成が望まれている¹⁴⁷⁾．

以上のように，北海道のイチゴ生産には主要産地と異

なる育苗，適応品種および収量などの問題をかかえ，作付面積の増加や産地形成の障害となっている。

そこで，現行の苗生産体制を改善し，育苗と果実生産の分業化を進めるため，組織培養技術を利用し，寒冷地に適応したウイルスフリー苗の生産体制を検討した。第2章ではこれまでに実用化されたイチゴの組織培養技術を追試する意味も含め，1989年に種苗登録された寒冷地向け品種‘ベルルージュ’⁶³⁾を用いて組織培養の基礎技術を検討した。また，第3章では第2章の結果をふまえ，寒冷地に適応した，より効率的なウイルスフリー苗の生産体制を確立するための研究を行った。

さらに，第4章では寒冷地における作型の拡大と省力化を目指し，組織培養技術を利用して‘ベルルージュ’並の果実硬度を持つ四季成り性品種の作出を試みた。

最後に第5章で第2章から第4章までの結果を基に実用的な面から総合的な考察を加えた。

第1章 イチゴの組織培養に関する基礎的研究

近年，栄養繁殖を行う作物ではウイルス汚染がまん延し，大きな問題となっている⁴⁴⁾。イチゴでもウイルスのまん延は深刻な問題で，収量の減少にとどまらず，品種や系統の維持さえ困難となる場合がある^{18, 109)}。

一方，組織培養技術を応用してウイルスフリー化やクローン植物の大量増殖がユリ類^{40, 72, 112, 125, 126, 127)}，ブドウ³²⁾，ニンニク⁹⁶⁾，ニラ⁹⁶⁾やワサビ¹⁴²⁾など多くの作物で可能となった。

イチゴのウイルスフリー化は Miller らによって1963年に初めて成功している⁵⁹⁾。イチゴは栄養繁殖作物の中でも圃場での増殖率が高いものの1つに数えられ，増殖率の低いニンニク^{16, 100)}，コンニャク⁴⁾やヤマイモ⁵¹⁾などとは大量増殖技術の意義が異なる。すなわち，イチゴでは増殖率を高めるよりも隔離網室やガラス室内でのランナー増殖による多大な労力や経費の軽減のため，組織培養による大量増殖法が検討されてきた。

現在ではイチゴのウイルス検定法も確立し^{12, 29)}，これらの組織培養技術を利用したウイルスフリー苗の生産が実用化している^{22, 34, 99, 123, 144)}。しかし，これらはイチゴの主要産地である関東周辺や西南暖地が中心で促成栽培用品種が多い。

そこで，これまでに実用化されたイチゴの組織培養技術を北限地帯に拡大する目的で，第1節では寒冷地向け品種‘ベルルージュ’の茎頂培養や大量増殖のための適正培地と培養条件を検討した。また，第2節ではイチゴの茎頂培養由来の幼植物の生長におよぼすランナー採取日の影響を検討した。

第1節 茎頂培養および大量増殖におよぼす培地組成と培養条件の影響

イチゴの組織培養は Miller らがウイルスフリー個体の作出を目的として茎頂培養を行った報告に始まっている⁵⁹⁾。わが国でも森ら⁶⁴⁾や高井ら¹⁰⁹⁾が茎頂培養によるウイルスフリー個体の作出について報告している。森らは摘出する茎頂の大きさによってウイルスフリーとなる個体の割合や生存率に差があること、茎頂培養の難易に品種間に差があることを述べている⁶⁴⁾。また、Bolton⁹⁾はイチゴを熱処理することでウイルスフリー化することを報告し、高井ら¹⁰⁹⁾や矢部ら¹⁴¹⁾は茎頂培養と熱処理を組み合わせることでウイルスフリー個体の作出効率を高めた。

一方、Nishi ら⁷¹⁾、Badawi ら⁸⁾、Boxus^{10, 11)}、Waithaka ら¹²⁸⁾、Anderson ら⁵⁾および宮崎ら⁶²⁾が茎頂から、大澤⁸⁴⁾と宮崎ら⁶¹⁾が葯から、浅平ら⁶⁾と Hong²⁴⁾が果実から、李ら⁴⁹⁾が葉柄と葉身から、玉置ら¹¹⁶⁾が未熟胚からイチゴの大量増殖を行っている。大澤ら⁸⁵⁾は植物の大量増殖には茎頂、葯、果実、葉柄、葉身および花弁など多くの組織が利用されるものの、茎頂組織が最も効率の良い部位であると結論した。茎頂を供試した Boxus¹⁰⁾は、MS(Murasige & Skoog)基本培地^{66, 67)}に BAP(6-benzylaminopurine) 1 mg/ℓ を添加することで多数のえき芽を誘導したが、カルスの形成は認められなかったと報じた。しかし、Nishi ら⁷¹⁾は MS 基本培地に BAP 2 mg/ℓ を添加することでカルスから大量の不定芽を誘導したと報告している。これらの結果は培養に同じ部位を用いても、培地や培養条件でその反応が異なることを示している。

以上のように、イチゴでは品種間に茎頂培養および大量増殖の難易に大きな差があり、適正培地の種類や生長調節物質濃度も異なっている。また、これまでの報告では‘宝交早生’、‘ダナー’および‘福羽’などが供試され、‘ベルルージュ’を用いた報告はない。

そこで，寒冷地向け品種‘ベルルージュ’の茎頂培養と大量増殖における適正な培地と培養条件を検討した。

【材料および方法】

茎頂培養に供試したランナーは，幌加内町農業研究センター試験圃場で栽培した‘ベルルージュ’株から20～30 cmに伸長し，先端の子葉が展開していないものを採取した。ランナーは先端から約3 cmを切断し，水洗後粗調整を行い，アンチホルミン（次亜塩素酸ナトリウム12% w/v液）の100倍液で10分間表面を浸漬殺菌した³²⁾。滅菌水で3回洗浄した後，実体顕微鏡下で葉原基1枚含む茎頂組織を0.2～0.5 mmの大きさを摘出し培地に置床した。とくに述べなければ，培地はHyponex（2.5 g/l）³³⁾にMS基本培地の鉄およびビタミン類を添加したHyponex修正培地を用いた。シヨ糖濃度を30 g/lとし，ゲランガム濃度を2 g/lとした。培地のpHを5.8に調節後，直径25 mmの試験管に分注し， 1.2 kg/cm^2 ， 120°C で12分間高压蒸気滅菌した。培養は 25°C ，2,000 lux，16時間照明を基本条件として行った。各試験区50本のランナーを供試した。汚染個体数，生存数，草丈および展開葉数を培養12週目に調査した。

大量増殖では前述の茎頂培養で得られた幼植物のうち，草丈約10 mm，展開葉数3～4枚の個体を供試した。とくに述べなければ，幼植物を断根し，前述と同じ条件で培養した。試験管あたりの増殖個体数，幼植物の草丈および展開葉数を培養6週目に調査した。

一方，増殖個体からの発根試験では前述の方法で増殖した幼植物を断根し供試した。基本培地の比較以外の試験では主要無機塩類濃度を1/2としたMS培地（1/2MS培地）に置床した。培養の温度，照明および供試数は前述と同じである。調査は発根個体数と発根数を培養3週目に行った。

【結 果】

1. 茎頂培養における基本培地の影響

前述した Hyponex 修正培地の他に Hyponex 基本培地，MS 基本培地，1/2MS 培地および White 培地¹⁴⁰⁾の5種類を用い，幼植物の生存率，展開葉数および草丈を比較した。

生存率は74～86%で培地の種類によって大きな差はなかった。展開葉数はMS基本培地，1/2MS培地および Hyponex 基本培地では3.8～4.5枚であったのに対し，Hyponex 修正培地と White 培地はそれぞれ5.3枚と5.5枚で有意に多かった。一方，草丈はMS基本培地，1/2MS培地および Hyponex 基本培地では7.2～8.8mmであったが，Hyponex 修正培地では10.7mm，White 培地では9.8mmと有意に高くなった (Table 1)。

以上の結果から，ランナーからの茎頂は Hyponex 修正培地と White 培地で良好な生育をすることが示された。

2. 茎頂培養における生長調節物質の影響

生長調節物質として IAA(indole-3-acetic acid)，NAA(1-naphtleneacetic acid)，Kin(kinetin)および BAPの4種類を用いた。濃度は0，0.01および0.1mg/lの3段階とし，オーキシニン類とサイトカイニン類とに分けて組み合わせた。

幼植物の生存率は72～88%で，添加した生長調節物質によりばらつきが見られたものの有意な差ではなかった。一方，展開葉数と草丈は，生長調節物質の添加によって有意に促進されたが，それらには幼植物のガラス化やえき芽の生長が認められ，正常な茎頂生長とはいえなかった。これらの異常はサイトカイニン類の添加量の増加とともに増加する傾向があった (Table 2)。

以上の結果から，生長調節物質の添加，とくにサイトカイニン類の添加は幼植物の生長を促進するものの，ガラス化やえき芽が生長して，正常な茎頂生長を阻害することが示された。

Table 1. Survival rate and the plantlet growth after shoot apex culture for 12 weeks under different mediums.

Mediums	Survival rate (%)	No. of leaves	Plant height (mm)
Hyponex modified medium ^z	82a ^y	5.3b	10.7b
Hyponex basal medium	78a	4.5a	8.8a
MS medium	74a	3.8a	7.2a
1/2MS medium	80a	4.2a	8.0a
White medium	86a	5.5b	9.8b

^z Hyponex basal medium supplemented with organic components of MS medium.

^y Values with the same letter in a column are not significantly different at 5% level according to Duncan's multiple range test.

Table 2. Survival rate and the plantlet growth after shoot apex culture for 12 weeks under different growth regulators and concentration.

Growth regulators				Survival rate (%)	No. of leaves	Plant height (mm)
Auxin concentration (mg/l)		Cytokinin concentration (mg/l)				
Control				82a ²	5.4a	10.6a
IAA	0	Kin	0.01	74a	5.0a	8.2a
	0		0.1	72a	6.5b*	13.6b
	0.01		0	88a	5.6a	9.5a
	0.01		0.01	86a	5.8a	8.2a
	0.01		0.1	80a	6.5b*	14.6b
	0.1		0	86a	5.8a	8.7a
	0.1		0.01	76a	6.2ab*	13.2b
	0.1		0.1	78a	6.4b*	12.8b
IAA	0	BAP	0.01	78a	5.5a	9.2a
	0		0.1	82a	6.9b*	14.2b
	0.01		0.01	88a	6.0a	8.5a
	0.01		0.1	76a	6.8b*	12.0ab
	0.1		0.01	78a	5.5a	12.0ab
	0.1		0.1	72a	6.8b*	13.5b
NAA	0.01	Kin	0	76a	5.0a	8.5a
	0.01		0.01	74a	5.8a	9.3a
	0.01		0.1	88a	6.6b*	14.9b
	0.1		0	80a	5.5a	9.3a
	0.1		0.01	72a	5.7a	10.8a
	0.1		0.1	72a	6.8b*	14.3b
NAA	0.01	BAP	0.01	88a	5.8a	10.0a
	0.01		0.1	74a	6.7b*	13.2b
	0.1		0.01	78a	5.2a*	10.7a
	0.1		0.1	72a	7.2b*	11.9ab

² Values with the same letter in a column are not significantly different at 5% level according to Duncan's multiple range test.

* Vitrification plants.

3. 茎頂培養における培養条件の影響

培養温度を20℃, 25℃および30℃, 照明時間を8, 16および24時間のそれぞれ3段階として, その影響を検討した.

3段階の培養温度における生存率は80~82%で温度による差はなかった. 展開葉数は, 25℃が5.5枚で20℃の4.1枚, 30℃の4.5枚より有意に多かった. 20℃と25℃の草丈は10.1mmと10.4mmで30℃の8.2mmより有意に高かった (Table 3).

一方, 照明時間の影響は, 8時間照明の生存率が90%と16および24時間照明より高かった. 展開葉数は16時間照明と24時間照明が, それぞれ5.3枚と5.0枚で8時間照明の4.2枚より多かった. 一方, 草丈は, 16時間照明と24時間照明が10.2mmと11.9mmで8時間照明の7.1mmより高かった (Table 4).

以上の結果, 生存率が8時間照明の90%に至らなかったものの, 25℃で16または24時間照明下で培養すると幼植物の生育が良好となることが明らかとなった.

4. 大量増殖における生長調節物質の影響

前述の基本培地に生長調節物質を添加し, 増殖個体数と幼植物の草丈や展開葉数を比較した. 生長調節物質には IAA, NAA, Kin および BAP の4種類を用い, 0, 0.1 および 0.5 mg/l の3段階の濃度を設定して, オーキシン類とサイトカイニン類を分けて組み合わせた. また, 横田ら¹⁴⁸⁾や大澤ら⁸⁵⁾は2種類のサイトカイニン類を組み合わせることで良い結果を得ているため, BAP と Kin を組み合わせた試験区も設けた.

生長調節物質を添加しない対照区では増殖個体が得られなかったが, 生長調節物質を添加することにより増殖個体が得られた. 増殖個体数は生長調節物質の種類や濃度によって差があった. IAA と Kin を組み合わせた場

Table 3. Survival rate and the plantlet growth after shoot apex culture for 12 weeks under different temperature.

Temperature	Survival rate(%)	No. of leaves	Plant height(mm)
20°C	82a ^z	4. 1a	10. 1b
25°C	80a	5. 5b	10. 4b
30°C	82a	4. 5a	8. 2a

^z Values with the same letter in a column are not significantly different at 5% level according to Duncan's multiple range test.

Table 4. Survival rate and the plantlet growth after shoot apex culture for 12 weeks under different day-length.

Day-length	Survival rate(%)	No. of leaves	Plant height(mm)
8 hr	90b ^z	4. 2a	7. 1a
16 hr	82a	5. 3b	10. 2b
24 hr	76a	5. 0b	11. 9b

^z Values with the same letter in a column are not significantly different at 5% level according to Duncan's multiple range test.

合の増殖個体数は2.9~9.3で、Kinの添加量が多くなるほど個体数は増加した。増殖個体の展開葉数は、IAAを0.5 mg/ℓ 添加した区では3.5~4.2枚と他に比べて多く、草丈も7.8~8.2 mmと高かった。IAAとBAPの組み合わせでは、増殖個体数は7.9~18.4で、BAPの添加量が多くなるほど増加した。IAAを0.1 mg/ℓ、BAPを0.1 mg/ℓ 添加した区の展開葉数は4.2枚で他と比べて増加したが、草丈には濃度間で差がなかった。NAAとKinを組み合わせた場合、増殖個体数は3.8~7.8でKinが多くなるほど増加する傾向を示した。展開葉数はNAAを0.5 mg/ℓ、Kinを0.5 mg/ℓ 添加した区が3.8枚で他区の2.7~3.4枚より多かった。草丈はNAAの単独区で高かった。NAAとBAPの組み合わせでは、NAA 0.1 mg/ℓ、BAP 0.5 mg/ℓ の区で増殖個体数が20.4となり、他区の7.2~12.3に比べて多かった。NAAを0.1 mg/ℓ、BAPを0.1 mg/ℓ 添加した区では展開葉数が3.8枚、草丈が8.9 mmと他に比べて促進された (Table 5)。

一方、2種類のサイトカイニンを組み合わせた場合、BAPとKinの添加量が増加すると個体数は増加し、BAPを0.5 mg/ℓ、Kinを0.1 mg/ℓ 添加した区は22.6とすべての試験区の中で最も高い増殖率を示した。しかし、増殖個体が増えるにつれて展開葉数が減少し、草丈も低くなる傾向があった (Table 6)。

以上の結果、サイトカイニンの添加はオーキシンにくらべて増殖個体数に大きく影響し、その濃度が高まるほど増殖を促進した。また、同じサイトカイニンでもKinに比較しBAPは増殖をより促進した。また、増殖された個体が多いほど展開葉数が少なく、草丈も低くなった。

Table 5. Effects of growth regulators and concentration on shoot development in meristem plantlet culture.

Growth regulators				No. of shoots per plantlet	Developing shoots	
Auxin concentration (mg/l)		Cytokinin concentration (mg/l)	No. of leaves		Shoot height (mm)	
	Control			1.0a [*]	-	-
IAA	0	Kin	0.1	2.9a	3.0a	7.2a
	0		0.5	8.2b	3.2a	8.1b
	0.1		0	3.1a	3.1a	7.7ab
	0.1		0.1	3.9a	2.8a	7.4a
	0.1		0.5	9.3b	2.5a	6.6a
	0.5		0	5.2ab	3.8b	7.9b
	0.5		0.1	4.8ab	4.2b	8.2b
	0.5		0.5	8.2b	3.5a	7.8a
IAA	0	BAP	0.1	10.4b	3.5a	5.9a
	0		0.5	17.2c	2.6a	6.2a
	0.1		0.1	7.9b	4.2b	6.7a
	0.1		0.5	12.8b	2.8a	7.2a
	0.5		0.1	18.4c	2.6a	6.0a
	0.5		0.5	8.4b	2.8a	7.5a
NAA	0.1	Kin	0	3.8a	3.1a	8.1b
	0.1		0.1	4.2a	2.8a	6.4a
	0.1		0.5	7.8b	2.7a	7.5a
	0.5		0	4.6ab	3.4a	7.9b
	0.5		0.1	5.9b	2.9a	6.8a
	0.5		0.5	4.4a	3.8b	7.2a
NAA	0.1	BAP	0.1	12.3b	3.8b	8.9b
	0.1		0.5	20.4c	2.5a	6.2a
	0.5		0.1	9.6b	2.4a	7.7ab
	0.5		0.5	7.2b	3.2a	7.8ab

Meristem plantlets were cultured for six weeks on Hyponex modified medium.

* Values with the same letter in a column are not significantly different at 5% level according to Duncan's multiple range test.

Table 6. Effects of cytokinin and concentration on shoot development in meristem plantlet culture.

Concentration (mg/ℓ)				No. of shoots per plantlet	Developing shoots	
					No. of leaves	Shoot height (mm)
	Control			1.0a ²	-	-
BAP	0	Kin	0.1	3.9a	2.8b	7.9b
	0		0.5	8.3b	3.2b	7.1a
	0.1		0	9.2b	2.5ab	7.8b
	0.1		0.1	9.6b	2.3a	7.5ab
	0.1		0.5	14.3bc	2.5ab	6.3a
	0.5		0	18.2c	2.1a	5.9a
	0.5		0.1	22.6c	2.2a	5.6a
	0.5		0.5	18.7c	2.4a	6.2a

Meristem plantlets were cultured for six weeks on Hyponex modified medium.

² Values with the same letter in a column are not significantly different at 5% level according to Duncan's multiple range test.

5. 大量増殖における培養条件の影響

茎頂培養と同じく培養温度を20℃，25℃および30℃の3段階，照明時間を8，16および24時間の3段階を設定してその影響を検討した。

25℃と30℃での増殖個体数はそれぞれ18.9と17.8で差はなかったが，20℃では10.2と著しく減少した。しかし，増殖個体の展開葉数と草丈で培養温度間に差はなかった（Table 7）。

一方，照明時間が長くなるほど増殖個体数は増加した。増殖個体の展開葉数は16時間照明で8時間および24時間照明より増加したが，草丈には照明時間で差がなかった（Table 8）。

以上の結果は，25℃，16時間照明で培養すると良好な幼植物が大量に増殖されることを示した。

6. 発根に対する基本培地の影響

発根に対する培地の影響を明らかにするため，Hyponex修正培地に加えてHyponex基本培地，MS基本培地，1/2MS培地およびWhite培地の5種類を用いて検討した。

MS基本培地の発根率は78%で他の4種類の培地の88～96%より低かった。発根数では，1/2MS培地が5.2本と他区の2.6～3.9本に比べ最も多かった（Table 9）。

以上の結果から，1/2MS培地で良好な発根を示すことが明らかとなった。

7. 発根に対する培養条件の影響

培養温度を20℃，25℃および30℃の3段階，照明時間を8，16および24時間の3段階に設定して，発根に対する影響を検討した。

培養温度により発根率には差がなかった。しかし，発根数には温度間で有意な差があり，20℃が3.9本と25℃の4.8本および30℃の4.9本より少なかった（Table 10）。

一方，照明時間3処理区の発根率は90～96%で長短による差はなかったが，16時間照明の発根数は5.7本と他区にくらべ増加した（Table 11）。

以上の結果から，25℃，16時間照明で培養すると良好な発根が得られることが明らかとなった。

【考 察】

イチゴの茎頂培養では一般に White 培地が用いられているが，高野・赤木¹¹¹⁾は Hyponex 培地（Hyponex 1g/l，Fe-EDTA 30mg/l，酵母抽出物 30mg/l，シヨ糖 30g/l，寒天 6g/l）で，横田・藤重¹⁴⁸⁾は 1/2 MS 培地を用いてそれぞれ良好な結果を得ている。本試験の結果は培地組成に違いがあるものの，主要無機成分が低濃度である点で，これらの結果と一致した。すなわち，‘ベルルージュ’における茎頂培養では生長調節物質を添加しない Hyponex 修正培地または White 培地を用い，25℃，16または24時間照明下で培養すると優良な幼植物が得られた（Table 1, 2, 3および4）。

茎頂培養における生長調節物質の影響について，大澤ら⁸⁴⁾はそれらの添加がカルス形成を促進すると報じ，一方，高野・赤木¹¹¹⁾，横田・藤重¹⁴⁸⁾および庄子ら⁹⁹⁾は少量の IAA（0.01～0.1mg/l）や NAA と BAP を添加することで茎頂の生長が促進されると報じている。本試験の結果，少量の生長調節物質の添加は生長が促進される傾向にあるものの，有意な差は認められず，添加の必要性が認められなかった。

種苗生産を目的に茎頂培養を行う場合，培養時の幼植物の生長が良好であることが重要である。さらに，大量の茎頂摘出を必要とするため，培地の調整が簡単であること，単価が安いことも重要である。本試験で幼植物の生長が良好であった Hyponex 修正培地と White 培地をこれらの条件に照らし合わせて考えてみると，Hyponex 修正培

Table 7. Effects of temperature on shoot development in meristem plantlet culture.

Temperature	No. of shoots per plantlet	Developing shoots	
		No. of leaves	Shoot height (mm)
20°C	10. 2a ²	2. 9a	7. 5a
25°C	18. 9b	3. 5a	8. 9a
30°C	17. 8b	3. 1a	9. 2a

Meristem plantlets were cultured for six weeks on Hyponex modified medium.

² Values with the same letter in a column are not significantly different at 5% level according to Duncan's multiple range test.

Table 8. Effects of day-length on shoot development in meristem plantlet culture.

Day-length	No. of shoots per plantlet	Developing shoots	
		No. of leaves	Shoot height (mm)
8 hr	12. 5a ²	2. 8a	7. 2a
16 hr	17. 5b	3. 5b	7. 4a
24 hr	21. 8b	3. 1a	6. 6a

Meristem plantlets were cultured for six weeks on Hyponex modified medium.

² Values with the same letter in a column are not significantly different at 5% level according to Duncan's multiple range test.

Table 9. Effects of medium on rooting rate and number of roots in plantlet culture.

Medium	Rooting rate(%)	No. of roots per plantlet
Hyponex modified medium ^z	94b ^y	3.8ab
Hyponex basal medium	90b	2.6a
MS medium	78a	3.1a
1/2MS medium	96b	5.2b
White medium	88b	3.9ab

Meristem plantlets were cultured for four weeks.

^z Hyponex basal medium supplemented with organic components of MS medium.

^y Values with the same letter in a column are not significantly different at 5% level according to Duncan's multiple range test.

Table 10. Effects of temperature on rooting rate and number of roots in plantlet culture.

Temperature	Rooting rate(%)	No. of roots per plantlet
20°C	92a ^z	3.9a
25°C	90a	4.8b
30°C	86a	4.9b

Meristem plantlets were cultured for four weeks on 1/2MS medium.

^z Values with the same letter in a column are not significantly different at 5% level according to Duncan's multiple range test.

Table 11. Effects of day-length on rooting rate and number of roots in plantlet culture.

Day-length	Rooting rate(%)	No. of roots per plantlet
8 hr	96a ^z	4.4a
16 hr	90a	5.7b
24 hr	92a	3.9a

Meristem plantlets were cultured for four weeks on 1/2MS medium.

^z Values with the same letter in a column are not significantly different at 5% level according to Duncan's multiple range test.

地の方が適当であると考えられた。

また、茎頂培養における培養条件に関して、明確な比較試験を行った報告は少なく、慣行的に25℃、12～24時間照明で培養が行われている場合が多いが、本試験の結果もこれと一致した。

大量増殖で優良な幼植物を得るには NAA を0.1 mg/ℓ、BAP を0.5 mg/ℓ または BAP を0.5 mg/ℓ、Kin を0.1 mg/ℓ 添加した Hyponex 修正培地を用い、25℃、16時間照明で培養すると良いことが示された (Table 5, 6, 7 および 8)。

イチゴの大量増殖について、Boxus¹¹⁾は Knop 液にニコチン酸 0.5 mg/ℓ、塩酸ピリドキシン 0.5 mg/ℓ、グリシン 2 mg/ℓ、塩酸チアミン 0.1 mg/ℓ、ミオイノシトール 100 mg/ℓ、グルコース 40 g/ℓ、寒天 8 g/ℓ、BAP 0.1 mg/ℓ、IBA 1 mg/ℓ を添加した培地で、藤本ら¹²⁾は LS(Linsmaier & Skoog) 培地に BAP 0.5 mg/ℓ、Kin 1.0 mg/ℓ を添加した培地で高野ら¹³⁾は Hyponex 1 g/ℓ に Fe-EDTA 30 mg/ℓ、酵母抽出液 1 g/ℓ、シヨ糖 30 g/ℓ、寒天 6 g/ℓ、BAP 0.4 mg/ℓ、Kin 0.1 mg/ℓ を添加した培地で良好な結果を得ている。本試験の結果も基本培地の主要無機成分が低濃度であることや生長調節物質の量について、これらとほぼ一致した。

また、大量増殖における培養条件に関しても茎頂培養と同様に明確な比較試験を行った報告は少なく、慣行的に25℃、12～24時間照明で培養が行われているが、本試験で生育が良好となった条件もこれらと一致した。

発根に用いる培地や培養条件に関しても明確に比較試験を行った報告は少なく、慣行的に生長調節物質を除いた増殖培地を発根培地として用いている。また、培養は25℃、12～24時間照明で行われている場合が多い。本試験で得られた発根の適正条件、すなわち1/2 MS 培地を用い、25℃、16時間照明での培養もこれらと一致した (Table 9, 10 および 11)。

第2節 茎頂培養由来の幼植物の生長におよぼすランナー採取日の影響

イチゴの茎頂培養に用いる生長点はランナーと呼ばれる栄養繁殖器官から摘出する。ランナーが発生する時期（ランナー発生期）は母株の環境条件が変化するとともに母株のオーキシンやジベレリン活性等の生理状態も変動している^{25, 42, 117)}。

浅平ら⁶⁾はイチゴの果実を用い大量増殖を行った場合、果実の齢や種子の有無によって幼植物の生長が異なっていることを明らかにし、その原因を内生オーキシンレベルの差によると考えた。大澤ら⁸⁵⁾は培養部位によって培地に対する反応が異なる要因として、各部位の内生オーキシンレベルやサイトカイニンレベルの差をあげている。このように供試材料の内生生長調節物質のレベルは培養時の植物体の反応を左右している。

一方、木本類のハイブッシュブルーベリー¹⁴⁾やエゾヤマザクラ⁹²⁾では摘出材料の採取日によって生理状態が異なり、茎頂の生存率や幼植物の生長に影響をおよぼすことが報告されている。このことはイチゴにおいても母株の生理状態の変動が茎頂の生存率や幼植物の生長に影響をあたえる可能性を示唆している。しかし、これまでのイチゴの茎頂培養に関する報告^{53, 74, 82, 97, 98, 99)}ではランナーの採取時期に関する記述が少なく、採取時期と幼植物の生長の関係を論じた報告はない。

そこで、本節ではイチゴの茎頂培養由来の幼植物の生長におよぼすランナー採取日の影響を検討した。

【材料および方法】

1993年と1995年に、‘ベルルージュ’を用いて幌加内町農業研究センター試験圃場で試験を行った。ランナーは先端の子葉が展開していないものを定植1年目の株から採取した。1993年のランナー採取は、発生が始まった

6月23日から発生が認められなくなった9月21日までにほぼ2週間間隔で計7回行った。ランナー数は各採取日とも50本とした。1995年はランナーの採取を1993年と同じ日に行い、20本のランナーを採取した。茎頂の摘出は実体顕微鏡下で行い、葉原基1枚を含む0.2~0.5mmの大きさに調整した。培地は Hyponex (2.5g/l) を基本培地とし、これにキレート鉄 (硫酸第一鉄 27.8mg/l, エチレンジアミン四酢酸ナトリウム 37.8mg/l) およびビタミン類 (塩酸チアミン 0.1mg/l, 塩酸ピリドキシン 0.5mg/l, ニコチン酸 0.5mg/l, グリシン 2.0mg/l, ミオイノシトール 100mg/l) を添加した。シヨ糖濃度は30g/lとし、ゲランガム濃度は2g/lとした。培地の pHは5.8に調整した。培養は25℃, 2,000lux, 16時間照明で行った。

汚染個体数と生存数の調査を両年とも培養4週目に、草丈の調査を培養12週目に行った。展開葉数を1993年には2週間間隔で6回調査し、1995年は培養12週目に1回だけ行った。また、1993年には摘出時における茎頂の形態と培養12週目における葉柄の表皮細胞を観察した。1995年には各採取日における母株の若い展開葉の葉柄長、ランナー長、ランナー数およびオーキシン活性を調査した。オーキシン活性の調査はアベナテスト (25℃, 20時間インキュベイト) ^{48, 118)}で行った。サンプルとしては各採取日に同一圃場の調査株以外の10株からクラウン部の生長点とその下約7mmの部分を取り取って用いた。サンプルは採取後、直ちに乳鉢ですりつぶし80%メタノールで抽出を行った。その後、Fig. 1の手順に従って精製を行い、酸性酢酸エチル可溶画分をペーパークロマトグラフィーにより分離し、インドール酢酸 (Rf0.25) に相当する Rf0.1-0.4の部分を蒸留水で抽出しオーキシン活性の試験に供した。

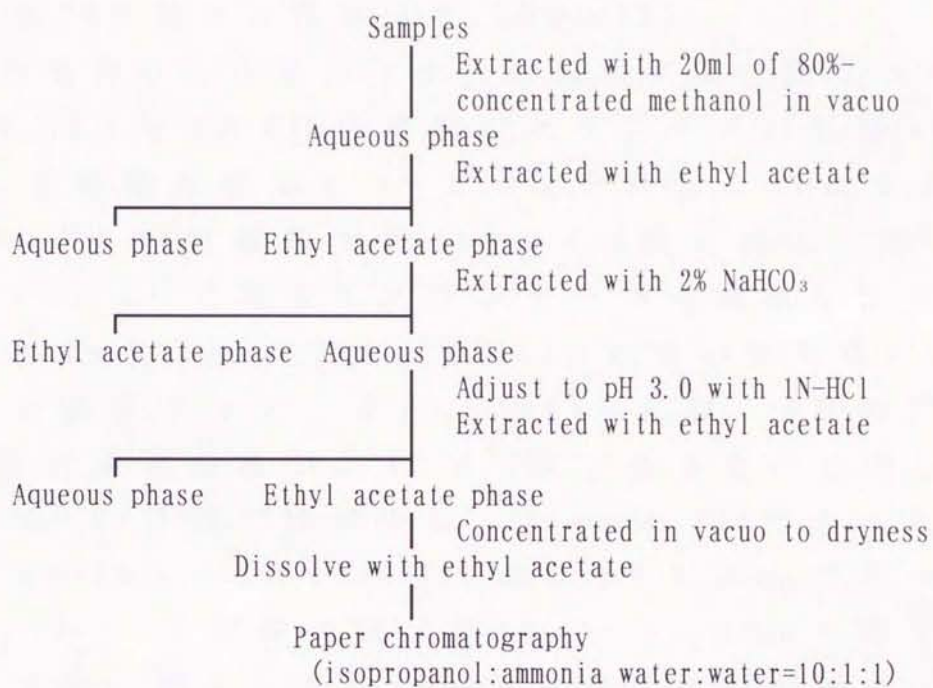


Fig. 1. Flow chart of auxin extraction.

【結果および考察】

1993年の茎頂生存率はいずれの試験区も80%以上と高く、ランナーの採取日による差はなかった。1995年の茎頂生存率も75%以上と高かった (Table 12)。

一方、幼植物の生長はランナー採取日により異なった。1993年6月23日～8月4日に採取したランナーの培養12週目における展開葉数は4.9～5.3枚を示したのに対し、8月18日～9月21日採取では3.7～4.0枚に減少した。6月23日～8月4日に採取したランナーから摘出した茎頂の草丈は7.3～7.7mmに対し、8月18日以降の区では8.2～11.3mmと高くなった。また、1995年には、6月23日～7月20日区の展開葉数が5.4～6.0枚であったのに対し、8月4日～9月21日区では減少し、3.5～4.2枚であった。草丈は、6月23日～7月20日区では8.2～8.6mmであったのに対し、8月4日以降の区では10.7～13.4mmと高くなり、展開葉数、草丈ともに1993年と同じ傾向が認められた (Table 13)。このように、1993年と1995年では多少前後するものの、ランナー採取時期の前半と後半で幼植物の生長に有意な差が認められた。そこで、これらの期間を前期および後期と定め、それらの形態を比較した。前期では展開葉数が多く葉柄が短いのに対し (Fig. 2-A)、後期では展開葉数が少なく葉柄が長く (Fig. 2-B)、前期と後期で異なった形態を示した。また、培養12週目における幼植物の葉柄の表皮細胞には細胞の長径が短いタイプ (Fig. 3-A) と長いタイプ (Fig. 3-B) が観察された。これらのタイプはランナー採取日によって観察される割合が異なり、6月23日～8月4日に採取したランナーからの幼植物には短いタイプが多く、8月18日～9月21日では長いタイプが多かった。8月18日以降のランナーからの幼植物で草丈が高くなった原因として、この期間に長いタイプの細胞が多く観察されたことから、葉柄が徒長したと考えられた。

Table 12. Influence of sampling date of runners on survival rate in shoot apex culture.

	No. of runners examined	Sampling date of runners (Day/Month)						
		23/6	7/7	20/7	4/8	18/8	1/9	21/9
		Survival rate (%)						
1993	50	80	86	84	86	82	86	82
1995	20	85	80	90	80	85	85	75

Shoot apices were cultured for four weeks on Hyponex modified medium.

Table 13. Influence of sampling date of runners on growth of plantlet in shoot apex culture.

		Sampling date of runners (Day/Month)						
		23/6	7/7	20/7	4/8	18/8	1/9	21/9
1993	No. of plantlets examined	40	43	42	43	41	43	41
	No. of leaves developed	5.3a ²	5.2a	5.3a	4.9a	3.7b	4.0b	3.8b
	Plant height (mm)	7.5a	7.3a	7.7a	7.3a	8.4b	8.2b	11.3b
1995	No. of plantlets examined	17	16	18	16	17	17	15
	No. of leaves developed	5.5a	6.0a	5.4a	3.7b	4.2b	3.9b	3.5b
	Plant height (mm)	8.2a	8.5a	8.6a	10.7ab	13.4b	12.2b	12.6b

Shoot apices were cultured for 12 weeks on Hyponex modified medium.

² Values with the same letter in a column are not significantly different at 5% level according to Duncan's multiple range test.

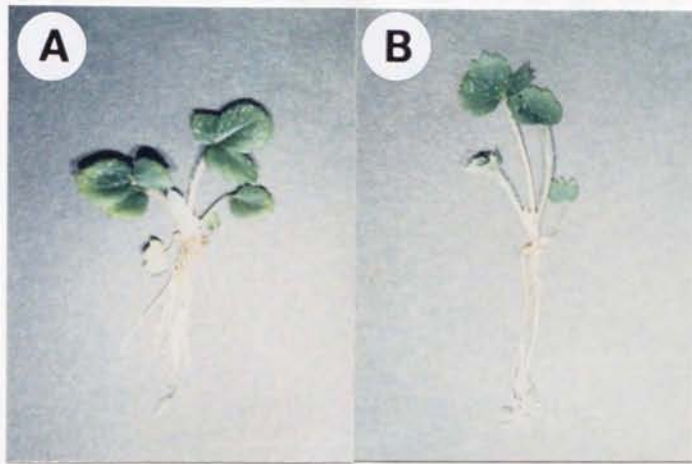


Fig. 2. Two types of plantlets.
A: The early term, B: The late term

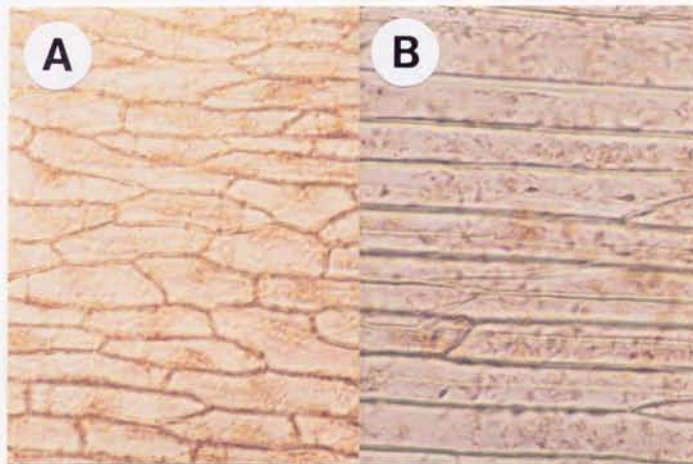


Fig. 3. Two types of cells.
A: Short cell type of the early term
B: Long cell type of the late term

一方，前期と後期の展開葉数には培養4週目から有意な差が生じ，前期では展開葉数が多かった（Table 14）．さらに，摘出時の茎頂の形態に違いが認められ，葉原基の分化が顕著でないAタイプ（Fig. 4-A）と葉原基の生長が進み3葉に分化したBタイプ（Fig. 4-B）に大別された．両タイプの違いを明らかにするため，ドーム状組織の直径を測定した結果，大きな差は認められず（Table 15），両タイプの差は葉原基の形態の違いによるものであった．この違いは葉原基の分化速度の差によって生じたものと考えられ，BタイプはAタイプに比較し，ドーム状組織から葉原基の分化する速度が遅いため，先に分化した葉原基の生長が進んだものと推測された．また，Aタイプはすべての採取日のランナーで観察されたが，Bタイプは8月4日～9月21日に採取されたものに限られ，茎頂の形態は採取日で異なっていた．Bタイプが観察された時期は培養時の幼植物の生長が抑制された時期，すなわち後期に一致し，幼植物の生長と茎頂の形態に密接な関係のあることが推察された．これらのことは前期と後期で生じた幼植物の生長差が生育初期の段階から，さらには摘出前の茎頂の段階から生じていたことを示している．

母株の形質では，葉柄長が6月23日～8月18日までは17.0～20.9 cmと大きな差は見られず，9月1日以降は8.8～13.9 mmと伸長が抑制された．ランナー長は6月23日～9月1日までは39.9～46.8 cmと差は見られなかったが，9月21日には25.4 cmと伸長が抑制された．また，ランナーの発生は6月23日～9月1日までは5.3～6.5本と差はなかったが，9月21日には3.0本に減少した（Table 16）．9月21日には母株の葉柄長の伸長などが抑制されたものの，それ以前には形態的变化は認められなかった．しかし，アベナテストの結果，母株のオーキシン活性は6月23日に+31%の値を示した後低下し，8月4日以降は活性

がほとんど認められなくなった (Fig. 5)。このことは、内生生長物質の季節変動を調査した施山ら⁹³⁾の報告に一致し、外見的には同一と考えられるランナー発生期でも、生理的には変動のあることが認められた。母株のオーキシン活性が低下した時期と幼植物の生長が抑制された時期がほぼ一致したことから、摘出材料を採取する母株の生理状態が茎頂培養由来の幼植物の生長に影響をおよぼすことが明らかとなった。

本試験の結果は茎頂培養を効率的に行うためには母株のオーキシン活性の高い前期のランナーを使用することが好ましいことを示した。しかし、ウイルスフリー苗の生産で大量の茎頂培養を行う場合、培養効率の向上は非常に重要であるが、茎頂の摘出期間が限定されることは作業員の確保などの問題を残している。

Table 14. Comparison of the number of leaves developed on plantlets between two sampling terms of runner.

	Culture period (weeks)					
	2	4	6	8	10	12
	No. of leaves developed (average±s. d.)					
The early term	0	0.5±0.9	0.9±1.2	2.0±1.9	3.4±1.6	5.2±1.1
The late term	0	0.3±0.7	0.6±1.7	1.4±2.2	2.5±2.0	3.8±1.6
Difference of No. of leaves between two terms (by t-test)	-	*	*	**	***	***

*, ** and ***: Significant at 5, 1 and 0.1% levels, respectively.

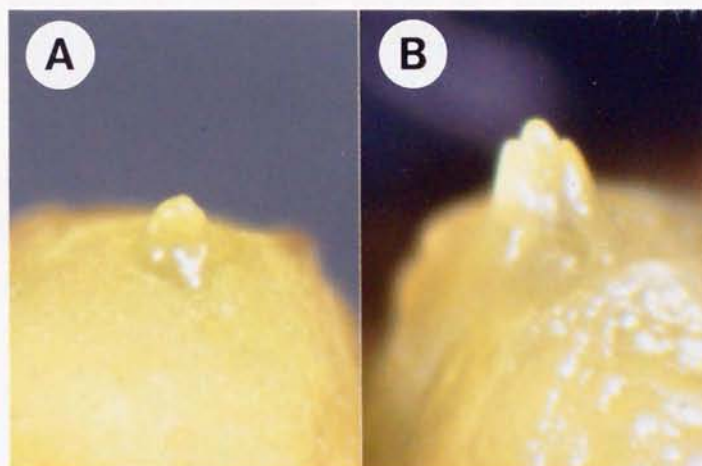


Fig. 4. Two types of shoot apex.
 A: June 23 - September 21
 B: August 4 - September 21

Table 15. Comparison of two types of shoot apices.

	No. of shoot apices examined	Diameter of shoot apices (mm)
Type A ^z	10	0.26 ± 0.051 ^x
Type B ^y	10	0.27 ± 0.048

See Fig. 4.

^z Slow progress type of differentiation of leaf primordium.

^y Rapid progress type of differentiation of leaf primordium.

^x Standard deviation.

Table 16. Petiole length, runner length and number of runners at the seven developing terms.

	Examining date (Day/Month)						
	23/6	7/7	20/7	4/8	18/8	1/9	21/9
Petiole length (cm)	20.9a ^z	19.4a	19.1a	18.4a	17.0a	13.9ab	8.8b
Runner length (cm)	45.9a	46.5a	42.7a	39.9a	40.4a	46.8a	25.4b
No. of runners	5.9a	5.3a	6.5a	5.3a	6.3a	5.9a	3.0b

^z Values with the same letter in a column are not significantly different at 5% level according to Duncan's multiple range test.

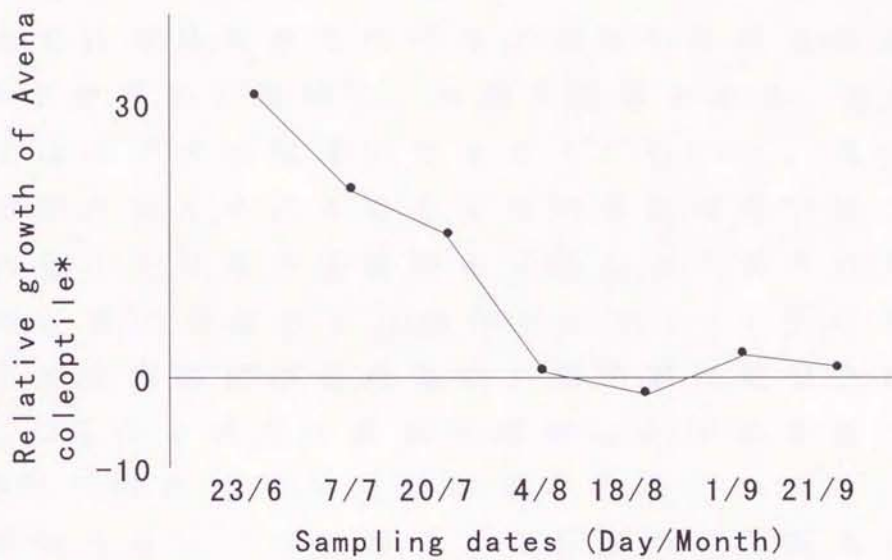


Fig. 5. Seasonal changes of Auxin activities measured by Avena bioassay in strawberry meristems excised from developing term of runners. *Relative growth of Avena coleoptile was presented as the percentage of growth deviation of the sample from the control.