

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

一般的にウイルスフリー苗の生産では、茎頂培養によって得られたウイルスフリー苗を圃場でランナー増殖して配布している。したがって、主要産地におけるウイルスフリー苗の生産では春に採取されたランナーから1年後の春までに茎頂培養でウイルスフリーの原種苗が生産され、秋まで圃場で増殖し、本圃に定植される。そして、その冬にはイチゴの収穫ができる¹²³⁾。しかし、北海道では増殖苗が秋植えされることや積雪期に育苗することが困難であることなど主要産地とは異なった条件にある。そのため、春に採取されたランナーから1年後の春ではなく秋までに原種苗が生産され、増殖圃に定植される。そして、2年後の秋まで圃場で増殖した後に本圃に定植され、3年目の春にイチゴが収穫される。つまり、ランナーの採取からイチゴ収穫までの日数が主要産地にくらべ1年以上余計にかかっている。

そこで、組織培養を利用して大量増殖を繰り返し行い、春に選抜された収量や品質の高い株のランナーから翌年の秋までに生産苗ができるように、寒冷地に適応した効率的なウイルスフリー苗の生産体制を確立する必要がある。これには均一な生育を示す茎頂を確保するため、ランナーの貯蔵法を確立すること、大量増殖の方法を簡略にすることが必要である。

そこで、第1節では茎頂生長におよぼすランナーの低温貯蔵の影響を、第2節では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を、第3節では大量増殖の簡略化を検討した。

第1節 茎頂生長におよぼすランナーの低温貯蔵の影響

イチゴのウイルスフリー個体の作出を目的とした茎頂培養については古くから研究が行われ、すでに実用化されている。これらの報告では、培地組成、培養条件および摘出体の大きさなどについての研究が多くなされている^{10, 82, 97, 111, 141, 148}。また、遺伝資源を簡便かつ安全に保存するという視点から、茎頂培養由来の植物体を低温培養した報告もある^{19, 65, 73, 74, 89}。

一方、茎頂培養の材料となるランナーの発生は、通常の栽培条件下においては同一品種では同調的なことや、親株から分離した直後のランナーを用いるなど、茎頂摘出の時期は限られている。このことは、ウイルスフリー苗の配布事業で大量の茎頂摘出を行う場合には作業員の確保などの問題がある。もし、ランナーの貯蔵が可能となれば、茎頂摘出作業の分散が図られ、この問題は解決される。しかし、茎頂摘出作業の分散を目的としてランナー貯蔵の可能性を論じた報告は見当たらない。

そこで、本節では茎頂培養の材料となるランナーの低温貯蔵が培養時の茎頂の生育にあたえる影響について調査し、ランナーの低温貯蔵の可能性を検討した。

【材料および方法】

‘ベルルージュ’を用い、低温（4℃）貯蔵期間を0から14日間とした15試験区を設け、貯蔵期間の長短が茎頂の生長にあたえる影響を検討した。また、Table 17に示す休眠性の異なる7品種を用い、低温貯蔵しない対照区と7日間低温貯蔵した低温区を設け、低温貯蔵の品種間差異を検討した。

ランナーは北海道幌加内高等学校試験農場で栽培した株から、20～30 cmに伸長し、先端の子葉が展開していないものを用いた。ただし、圃場での越冬が困難な暖地型（休眠が浅い）品種は直径24 cmのポリポットに鉢上げ

Table 17. Cultivars used and their dormancy.

Cultivar	Dormancy
Toyonoka	Shallow
Reikou	Shallow
Nyohou	Shallow
Houkouwase	Mid
Belle-rouge	Deep
Morioka16	Deep
Danner	Deep

し、温室内で越冬させた。融雪後、これらの株は圃場にもどし、他の品種と同様に栽培した。ランナーは収穫終了後の7月5日より随時採取し、各試験区とも20本を供試した。採取したランナーは前述の処理を加え、粗調整を行った。これより以降の操作はクリーンベンチ内で行い、殺菌は次亜塩素酸ナトリウム溶液（有効塩素 0.5%）に8~10分浸漬後、滅菌水で洗浄した。茎頂の摘出は実体顕微鏡下で行い、葉原基1~3枚を含む0.2~0.5mmの大きさに調整した。

培地は Hyponex (2.5 g/l) を基本培地とし、これにキレート鉄（硫酸第一鉄 27.8 mg/l, エチレンジアミン四酢酸ナトリウム 37.8 mg/l）およびビタミン類（塩酸チアミン 0.1 mg/l, 塩酸ピリドキシン 0.5 mg/l, ニコチン酸 0.5 mg/l, グリシン 2.0 mg/l, ミオイノシトール 100 mg/l）を添加した。生長調節物質は BAP を 0.1 mg/l, Kin を 0.1 mg/l 添加した。ショ糖濃度は 30 g/l とし、ゲランガム濃度は 2 g/l とした。培地の pH を 5.8 に調節した。培養は 25℃, 2,000 lux, 16時間照明で行った。

培養10週目に汚染個体数、生存数および展開葉数を調査した。

【結果および考察】

低温貯蔵期間が茎頂の生育にあたる影響を Table 18 に示す。貯蔵日数が11日までは茎頂の生存率は80~100%と非常に高く、いずれも対照区を上回った。貯蔵日数が12日以上になると生存率は50~60%に低下した。また、対照区の展開葉数が2.3枚に対し、すべての低温貯蔵区で対照区と同じかそれを上まわった。とくに7~8日間貯蔵すると3.4枚と対照区の1.5倍に増加した (Fig. 6)。

Table 18. Influence of low-temperature storage(4°C) of runners on shoot apex growth in culture.

	No. of days of low-temperature storage														
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Survival rate (%)	80	90	90	80	90	88	90	100	90	90	80	90	50	60	60
No. of leaves	2.3	2.5	2.8	2.8	3.1	2.9	2.8	3.4	3.4	2.8	2.5	2.6	2.8	2.6	2.3

20 runners of Belle-rouge were used in each treatment.

Shoot apices were cultured for 10 weeks in Hyponex modified medium.

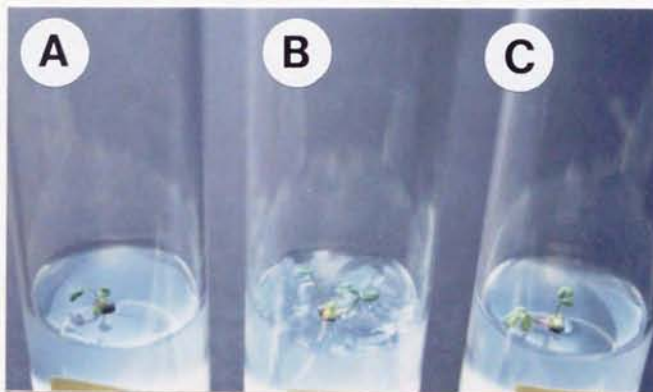


Fig. 6. The effects of length of low-temperature storage of runners on plantlets growth in shoot apex culture at 10 weeks.

A: Control

B: 7 days low-temperature storage

C: 14 days low-temperature storage

以上のように，11日間までの低温貯蔵では生存率の低下は認められず，逆に展開葉数が増加して生育が速まった。

これらの結果は，4℃前後の低温貯蔵が茎頂培養の生育に悪影響をおよぼさないことを意味し，低温貯蔵が可能であることを示した。さらに，生育が速まったことは培養期間の短縮につながると思われ，ランナーの低温貯蔵は単に茎頂摘出作業を分散させるだけではなく，茎頂培養がより効率的になると考えられた。しかし，11日間程度の貯蔵では実用的といえず，この点については次節で検討する。

Takayamaら¹¹⁵⁾はスカシユリを低温処理することで内生生長調節物質の量が変わったと報告している。また，イチゴの休眠はきわめて緩慢に早くから始まり，ランナー発生期でも徐々に休眠に向かっている¹²⁾。つまり，ランナーが休眠状態にある可能性が高く，低温貯蔵で内生生長調節物質の量が変わり，休眠が打破されたと考えることもできる。本試験ではランナーの休眠状態について検討していないので，このことを明確にすることはできない。今後はこの点について詳しい検討が必要である。

7品種の茎頂の生育状況を Table 19 に示す。品種により生長パターンが異なるため，以下の式で生存率および展開葉数の指数を求めた。

$$\text{指数} = \frac{\text{低温区の生存率 (展開葉数)}}{\text{対照区の生存率 (展開葉数)}} \times 100$$

低温貯蔵したときの生存率は‘とよのか’が対照区の63%に低下し，‘女峰’と‘宝交早生’では20~25%の低下がみられた。一方，休眠の深い‘ベルルージュ’，‘盛岡16号’および‘ダナー’では高まった。また，展開葉数は‘とよのか’，‘麗紅’および‘女峰’の休眠の浅い品種では減少を示したが (Fig. 7)，休眠が中程度の‘宝交早生’ (Fig. 8) や‘ベルルージュ’ (Fig. 9)

Table 19. Varietal differences in growth of shoot apex cultured after low-temperature storage (4°C, 7 days) of runners.

Cultivar	Survival rate (%)			No. of leaves		
	Cont.	Low	Index	Cont.	Low	Index
Toyonoka	80	50	63	1.8	0.9	50
Reikou	60	63	105	2.8	2.1	75
Nyohou	80	60	75	2.6	2.1	81
Houkouwase	100	80	80	3.0	3.8	126
Belle-rouge	70	90	129	1.7	2.6	153
Moriokal6	60	90	150	2.0	2.5	125
Danner	70	90	129	3.1	4.6	148

Shoot apices were cultured for 10 weeks in Hyponex modified medium.

Low : Low-temperature storage

Cont. : Control without low-temperature storage

Index: Low / Cont. \times 100

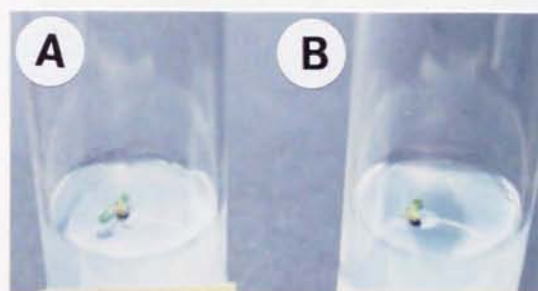


Fig. 7. Plantlet growth in shoot apex culture of control and low-temperature storage for cv. Toyonoka.
A: Control
B: 7 days low-temperature storage

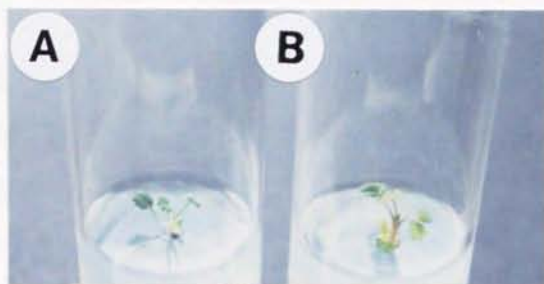


Fig. 8. Plantlet growth in shoot apex culture of control and low-temperature storage for cv. Houkouwase.
A: Control
B: 7 days low-temperature storage

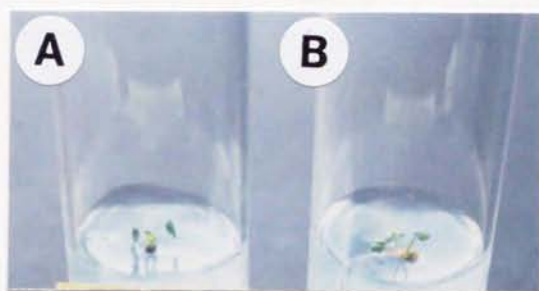


Fig. 9. Plantlet growth in shoot apex culture of control and low-temperature storage for cv. Belle-rouge.
A: Control
B: 7 days low-temperature storage

などの休眠の深い品種では対照区の1.2~1.5倍に増加した。したがって、低温貯蔵の影響は品種によって異なり、遺伝的要因が関与することがうかがわれた。休眠の深い品種では生存率と生育速度が向上するが、休眠の浅い品種はどちらも低下した。このことは、ランナーの低温貯蔵性は品種の休眠性と関連があることを示唆している。イチゴでは、休眠が深いほど休眠覚せいに長い低温期間を必要とし、浅いほど短いとされている¹²⁾。このことは、休眠の深い品種ほど長期貯蔵が可能であることを示している。

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

近年，栄養繁殖を行う作物ではウイルスの汚染がまん延し，減収にとどまらず品種や系統の維持さえ困難となっている場合があり，大きな問題になっている．イチゴでは Strawberry mottle virus (SMoV)， Strawberry crinkle virus (SCrV)， Strawberry mild yellow edge virus (SMYEV) および Strawberry veinbanding virus (SVbV) などの病原ウイルスによる生長不良や減収などの被害が著しい^{18, 44, 109}．これらのウイルス病の対策として茎頂培養によるウイルスフリー化が有効とされ，多くの作物で研究がなされている⁶⁴．イチゴでも茎頂培養や増殖に関し，多くの報告がある^{82, 97, 98, 99, 111}．茎頂培養を利用してウイルスフリー苗生産を行う場合，大量の茎頂の摘出が必要となる．これらの作業を効率的に行うには一年を通して茎頂の摘出材料が供給され，かつ幼植物の生長が均一になることが望まれる．イチゴの場合，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．そのため，茎頂の摘出期間はランナー発生期（自然条件では6月下旬から9月下旬の約3ヶ月間）に限られる．茎頂摘出の期間が限られることはその間に各種作業が集中して，作業員の確保などの問題を引き起こす．これらの対策として冷蔵苗^{54, 55, 56, 57, 58}などの手法を用いてランナーの発生を制御する方法が考えられているが，これには多くの労力と経費を必要とする．前節で簡便な作業の分散法の確立を目的にランナーの低温貯蔵の可能性を検討した^{129, 130, 131, 133}．しかし，幼植物の生長に悪影響をあたえずにランナーを貯蔵できる日数は11日間と短く，実用的とはいえなかった．また，茎頂培養における茎頂生長の季節的变化を調査したところ，茎頂生長は季節的に変化するので，均質な幼植物を得るためには茎頂の摘出時期がこれまで以上に限られ，培養作業が一層集中することになる^{134, 138}．

一方、アスパラガスの凍結貯蔵では事前に糖類を含む培地で培養することにより凍結・融解後の生存率を高めている³⁷⁾。また、イチゴの茎頂の超低温(-196℃)貯蔵では5% DMSO(dimethylsulfoxide)を含むMS培地で前培養することで高い生存率を得ている^{39, 88)}。これらの報告から、組織内に無機塩類や糖類を吸収させることでランナーの低温貯蔵の期間を長くできるのではないかと考えた。

そこで、ランナーの低温貯蔵期間を長くすることを目的とし、無機塩類や糖類をランナーに吸収させる前処理を加え、茎頂培養における幼植物の生長におよぼす低温貯蔵の影響を検討した。

【材料および方法】

実験1. ランナーのMS液体培地での前処理効果

試験には20~30cmに伸長し、先端の子葉が展開していない‘ベルルージュ’のランナーを用いた。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母株から、1993年7月15日に試験区あたり50本を採取した。前処理はランナーに蒸留水あるいはMS液体培地^{66, 67)}を常温で24時間吸収させた。それぞれを蒸留水区とMS液体培地区とした。前処理後、蒸留水を吸水させながら暗所で低温(4℃)貯蔵した。比較のため、ランナーに低温貯蔵を加えない無貯蔵区を設けた。貯蔵期間は前処理の効果を明確にするため、前節で低温貯蔵が可能とされた10日間より長い2週間とした。貯蔵時に蒸留水がランナーに吸収され、減少したので随時補給した。貯蔵後、茎頂を摘出した。茎頂の摘出は実体顕微鏡下で行い、摘出する茎頂は葉原基1枚を含む0.2~0.5mmの大きさに調整した。培地はHyponex修正培地¹³³⁾を用い、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を5.8に調節した。茎頂培養は25℃、2,000lux、16時間照明で行った。

汚染個体数，生存数，再生した幼植物の展開葉数および草丈を培養12週目に調査した．生存率は処理の影響を明確にするため，以下の式で算出した．

$$\text{生存率} = \frac{\text{生存数}}{\text{供試数} - \text{汚染個体数}} \times 100$$

各測定値について Duncan の範囲検定を行い，低温貯蔵期間ごとに前処理間の差を検定した．

実験2. ランナーの前処理に用いる溶液の種類

前処理では蒸留水（対照）と実験1で得られた MS 液体培地による効果が無機塩類と糖類のいずれに起因するかを明確にするため，MS 液体培地を無機塩類と糖類（30 g/l ショ糖溶液）に分けた．さらに，イチゴは低濃度培地を好むため塩類濃度を1/10にした MS 液体培地（ショ糖含まず）と糖の種類による影響を検討するため30 g/l ブドウ糖溶液のあわせて5種類を常温で24時間，ランナーに吸収させた．前処理後の低温貯蔵期間は0～6週間の7段階とし，貯蔵終了後，速やかに茎頂を摘出した．

供試材料および前述以外の培地および培養条件は実験1と同様で，ランナーは1994年7月21日に試験区あたり20本を採取した．

培養4週目に実験1と同様の調査を行い，生存率を算出した．再生した幼植物の展開葉数，草丈および展開葉の表皮細胞長を培養12週目に調査した．表皮細胞長は各試験区4個体の幼植物の最も新しい展開葉の葉柄の表皮から5細胞を選び，その長径をミクロメータで測定した．

また，1995年7月22日に試験区あたり50本のランナーを採取し，低温貯蔵期間を5週間として1994年と同様の試験を実施した．

各測定値について Duncan の範囲検定を行い，低温貯蔵期間ごとに前処理間の差を検定した．

【結 果】

実験1. ランナーのMS液体培地での前処理効果

茎頂の生存率は無貯蔵区の80%にくらべ、蒸留水区では60%と低下し、MS液体培地では86%と無貯蔵区と有意な差はなかった。幼植物の展開葉数は無貯蔵区と蒸留水区ではそれぞれ5.8枚と5.5枚で両者に差はなかったが、MS液体培地では7.7枚と増加し、前二者とは有意な差を示した。草丈は、無貯蔵区が5.2mmで、これに対し蒸留水区とMS液体培地はそれぞれ7.0mmと7.9mmで有意に高かった (Table 20)。

実験2. ランナーの前処理に用いる溶液の種類

低温貯蔵後のランナーの形態には前処理による差は認められなかった。しかし、貯蔵期間が4~6週目のランナーには二次ランナーの伸長、葉柄の伸長およびランナーの先端の褐変が認められるものもあった (Fig. 10)。

茎頂の生存率はいずれの前処理でも、貯蔵期間が長くなるにしたがって低下した。低下の程度は前処理で異なり、対照区の2週間低温貯蔵の生存率は60%であったが、それ以外の区では4週間の低温貯蔵を行っても60%以上の生存率であった。とくに1/10MS区では5週間低温貯蔵をしても75%の生存率を示し、他区と有意な差を示した。

幼植物の展開葉数は対照区とそれ以外の区で貯蔵期間の影響が異なった。対照区では貯蔵期間が長くなるにしたがい、展開葉数は減少する傾向を示したが、それ以外の区では貯蔵期間の長短にかかわらず、6.5~7.8枚と対照区にくらべ増加した。

低温貯蔵は幼植物の草丈に影響をおよぼし、貯蔵期間が長くなるにしたがって高くなった。また、対照区で3週間目、前処理のMS区、ショ糖区およびブドウ糖区で5週間目、1/10MS区で6週間目に急に草丈が高くなり、それ以前の1.6~1.9倍になった。

Table 20. Survival rate and the plantlet growth after shoot apex culture for 12 weeks under different treatments.

Treatment	Survival rate(%)	No. of leaves	Plant height(mm)
No storage ^z	80a ^w	5.8b	5.2b
Distilled water ^y	60b	5.5b	7.0a
MS liquid medium ^x	86a	7.7a	7.9a

^zNo low-temperature storage of runners.

^yDistilled water was absorbed by runners for 24 hr at 20 °C, after the 2 weeks low-temperature storage.

^xMS liquid medium was absorbed by runners for 24 hr at 20 °C, after the 2 weeks low-temperature storage.

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



Fig. 10. The effects of low-temperature storage during four-six weeks on the morphology of runners.

A: Elongation growth of second runner

B: Elongation growth petiole of young leaf

C: Browning of tip of runner

葉柄の細胞長は，すべての区で貯蔵期間が長くなるにしたがって長くなる傾向を示した．また，対照区で3週間目，MS区および1/10MS区で6週間目，ショ糖区およびブドウ糖区で5週間目に急に細胞が長くなり，それ以前の1.5～1.7倍になった．MS区を除いてこれらの期間は草丈が急に高くなった貯蔵期間とほぼ一致した（Table 21）．

1995年の試験では，茎頂の生存率は低温貯蔵しない区の82%に対し，前処理をした区は低下し，対照区が34%，MS区，ショ糖区およびブドウ糖区が40～46%，1/10MS区では68%と試験区間に有意な差があった．再生した幼植物の展開葉数は，低温貯蔵しない場合の5.2枚に対し，対照区が3.9枚と減少したものの，他区では6.0～7.0枚と増加し，対照区とそれ以外の区との間に有意な差がみられた．草丈は低温貯蔵しない場合の4.8mmに対し，前処理することで高くなり，1/10MS区では8.3mm，他区では14.5～17.0mmと試験区間に有意な差があった（Table 22）．

このように，1994年と1995年の試験は茎頂の生存率や再生した幼植物の生長について同じ結果を示した．

【 考 察 】

本試験では，ランナーに塩類濃度を1/10にしたMS培地の前処理を加えることで，ランナーの低温貯蔵の期間をこれまでの11日間から¹³³⁾，35日間に延長することができた．この方法は茎頂の摘出などの作業分散を図る上で非常に有効である．

一般にイチゴの草丈が高くなるのは，展開葉数の増加，葉柄の徒長，または両方によると考えられている．本試験において，草丈の伸長は展開葉数が増加していないこと，一方葉柄の細胞が伸長していることなどから，葉柄の徒長に起因すると考えられた．葉柄の徒長による草丈

Table 21. Survival rate(%) and plantlet growth under different pretreatments and duration of the storage periods.

		Storage periods (weeks)						
Pretreatment ^z		0	1	2	3	4	5	6
Survival rate (%)	Control ^y	80a ¹	80a	60ab	40b	40b	45b	20b
	MS ^x	80a	70a	70a	75a	60ab	40b	30b
	1/10 MS ^w	80a	90a	75a	85a	75a	75a	50a
	Sucrose ^v	90a	90a	90a	70a	60ab	30b	35ab
	Glucose ^u	90a	100a	90a	75a	65a	40b	25b
Number of leaves	Control	5.6b	5.7b	5.4b	4.3b	4.4b	4.7b	4.5b
	MS	6.8a	7.1a	7.1a	7.0a	6.8a	6.6a	6.9a
	1/10 MS	7.0a	6.8a	6.9a	7.6a	7.4a	7.8a	7.5a
	Sucrose	6.5a	6.9a	7.1a	7.0a	6.6a	7.2a	6.9a
	Glucose	6.6a	6.6a	6.7a	7.0a	7.6a	7.3a	7.5a
Plant height (mm)	Control	5.5a	5.8a	6.7a	11.4a	10.7a	12.0a	12.2a
	MS	7.2a	7.6a	8.0a	8.0b	7.6ab	14.3a	18.6a
	1/10 MS	7.5a	8.3a	9.0a	8.6b	8.8ab	9.0b	14.8a
	Sucrose	7.0a	7.7a	7.0a	7.6b	8.5ab	15.5a	16.9a
	Glucose	6.6a	6.9a	7.1a	8.2b	9.2ab	17.4a	15.0a
Cell length of petiole (μ m)	Control	52a	58a	67a	115a	129a	144a	121a
	MS	61a	74a	65a	81b	62b	98ab	164a
	1/10MS	53a	48a	76a	82b	87b	73b	127a
	Sucrose	72a	79a	74a	80b	95b	138a	118a
	Glucose	51a	60a	88a	75b	76b	125a	132a

^z The solutions were absorbed by runners for 24 hr at 20 °C.

^y Distilled water as a control pretreatment.

^x MS liquid medium without sucrose.

^w 1/10 MS liquid medium without sucrose.

^v 30g/l sucrose solution.

^u 30g/l glucose solution.

¹ Values with the same letter in a column are not significantly different at 5% level according to Duncan's multiple range test.

Table 22. Survival rate and the plantlet growth after shoot apex culture for 12 weeks under different pretreatments.

Pretreatment ^z	Survival rate(%)	No. of leaves	Plant height(mm)
No storage ^y	82a ^s	5.2ab	4.8c
Control ^x	34b	3.9b	14.5a
MS ^w	42b	7.0a	17.0a
1/10MS ^v	68ab	6.4a	8.3b
Sucrose ^u	40b	6.0a	16.2a
Glucose ^t	46b	6.2a	15.4a

^z The solutions were absorbed by runners for 24 hr at 20 °C, after the 5 weeks low-temperature storage.

^y No low-temperature storage of runners.

^x Distilled water as a control pretreatment.

^w MS liquid medium without sucrose.

^v 1/10 MS liquid medium without sucrose.

^u 30g/ℓ sucrose solution.

^t 30g/ℓ glucose solution.

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

の増加は順化段階やその後の生長にとって好ましいことではない。

茎頂培養において、生存率の低下や幼植物の徒長は作業効率を低下させ、各種作業労賃や培地試薬等の生産資材のロスが多くなり、生産コスト上から問題となる。本試験の結果から、作業効率を下げる生存率低下や幼植物の徒長はランナーの低温貯蔵により引き起こされたと考えられた。生存率の低下や徒長は低温貯蔵が一定期間を越えると顕著となり、これらを引き起こさない期間がランナーの最長低温貯蔵期間と考えられる。この期間は対照区では2週間と前処理を行った区より短く、糖類を吸収させたショ糖区とブドウ糖区ではいずれも4週間であった。一方、無機塩類を吸収させたMS区と1/10MS区ではそれぞれ4週間と5週間で、無機塩類の濃度による差がみられ、1/10MS区で長くなった。

また、MS区、ショ糖区およびブドウ糖区では最大低温貯蔵可能期間が4週間と差がなかった。しかし、糖類を前処理に用い、低温貯蔵期間が0~2週間と短い場合、生存率は無機塩類を用いた場合に比べ高くなる傾向を示し、無機塩類と糖類は、茎頂の生存率や再生した幼植物の生長に有意とはいえないものの、異なった影響を示した。

前処理でランナーに吸収させたMS液体培地の無機塩類は植物体を構成する元素や代謝など生体活動にかかわる重要な成分であり、糖類は植物体のエネルギー源として重要な働きがある²¹⁾。これらの無機塩類や糖類は単に栄養源やエネルギー源であるだけでなく、培地の水ポテンシャルにも影響をあたえる²³⁾。この水ポテンシャルは培養時の幼植物の生長を制御する重要な要因である^{20, 27, 75, 145)}。本試験で認められた茎頂の生存率や再生した幼植物の生長の違いは前処理で吸収させた無機塩類や糖類溶液に含まれる成分や濃度の違いにより生じたものと推

測された。しかし、それがランナーに吸収させた成分の働きの差なのか、水ポテンシャルの差によるものかは明らかでなく、今後検討する必要がある。

一方、ランナーを低温貯蔵しない場合、無機塩類や糖類を吸収させることで茎頂の生存率が向上し、幼植物の展開葉数が増加した。このことはランナーへの前処理が単に低温貯蔵期間の延長を可能にするだけでなく、培養時の茎頂の生存率を向上させ、幼植物の生長を促進することを示している。前処理により茎頂培養の作業効率を高め、培養期間を短くする可能性が示された。

第3節 組織培養作業の簡略化

現在、組織培養を利用したウイルスフリー苗の生産は茎頂培養、大量増殖、発根培養、順化・鉢上げ、育苗の順に行われ、必要に応じて大量増殖を繰り返したり、圃場でのランナー増殖が行われている^{22, 34, 99, 144}。急速に個体増殖を行う場合、圃場でランナー増殖を行うより、組織培養で大量増殖を繰り返し、必要な苗数を確保する方が有利である。また、組織培養による増殖はランナー増殖とは異なり、生産地の気象条件や栽培期間の影響を受けず、北海道であっても主要産地と同様な増殖効率が得られ、寒冷地における苗生産効率を高めることができる。しかし、組織培養では培地の褐変、養分の枯渇、生育段階や培養目的に応じた培地の変更など多くの作業が必要である。移植作業には培地の作成や無菌操作など技術をとまなう作業があるので、組織培養の作業を複雑なものとしている。

そこで、組織培養作業の簡略化を目的に、茎頂培養で得られた幼植物のクラウン部に生長調節物質の溶液を直接滴下し、多芽体の誘導を試みた。また、分割や発根作業を有菌条件で試みた。

一方、大量増殖の方法が圃場での生産力に影響をおよぼすとの報告^{50, 60, 70, 98}がある。そこで、本試験で検討した増殖方法が実用化できるかを確認するため、これらの増殖方法で得られた苗と慣行法で得られた苗の生産力を比較した。

【材料および方法】

茎頂培養で得られた‘ベルルージュ’の幼植物（草丈10 mm，葉数3～4枚）を供試した。多芽体は生長調節物質（BAP 0.5 mg/ℓ，Kin 0.1 mg/ℓ）を添加した培地に幼植物を断根して移植する慣行法（Transplanting method）と幼植物の断根・移植を行わず、生長調節物質溶液を幼植物の

クラウン部に直接滴下する滴下法 (Dropping method) で誘導した (Fig. 11)。滴下法で用いた生長調節物質の量は慣行法の量 (BAP 0.02 mg, Kin 0.004 mg) を基準に 1/4, 1/2, 3/4, 1 および 2 倍とした。各量の生長調節物質が 0.1 ml 中に含まれる濃度の溶液を 5 種類用意し, 供試材料のクラウン部に 0.1 ml ずつ滴下した。滴下した生長調節物質の溶液はセルロースアセテートタイプのメンブランフィルター (0.20 μ m) でろ過滅菌した。

これらの処理で得た幼植物を分割して発根培地に移植し, 発根後 6 cm ポリポットに移植し順化した。順化した苗は 1994 年 8 月 30 日に定植した。栽植密度は 90 cm \times 25 cm の高畝 1 条植えとし, 白黒ダブルマルチを使用した。定植の 10 日前にホウ素入り燐硝安加里 NS262 を 30 kg/10 a, 有機化成 S708 を 120 kg/10 a 施与した。越冬前の 1994 年 10 月 15 日に展開葉数, 草丈, クラウン径およびえき芽数について調査した。また, 収穫終了後の 1995 年 8 月 20 日に展開葉数, 草丈, 花房長および花房数を調べた。収量については収穫時期, 一果重および一株収量を調査した。

順化作業の簡略化に関する試験では前述の茎頂培養で得られた幼植物を断根し, BAP 0.5 mg/l と Kin 0.1 mg/l を添加した Hyponex 修正培地に移植し, 増殖させた多芽体を供試した。Fig. 12 に示すように供試材料からシュートを 1 本ずつ分割し発根培地に移植し, 発根後 6 cm ポリポットに移植・順化した慣行区 (Control), シュートの分割を行わず, 発根培地に多芽体を直接移植し, 発根後 6 cm ポリポットに分割移植・順化した無分割区 (No-divide) と多芽体の分割や発根培地への移植を行わず, 直接パーミキュライト (深さ約 5 cm) の入った育苗箱 (36 \times 45 \times 10 cm) に移植・順化し, 順化後 1 本ずつに分割して 6 cm ポリポットに移植した無発根区 (No-rooting) を設け, 苗の生長を比較した。順化には密閉棚を使用し, 培土にはパーミキュライトを用いた。発根率, 発根数および順化

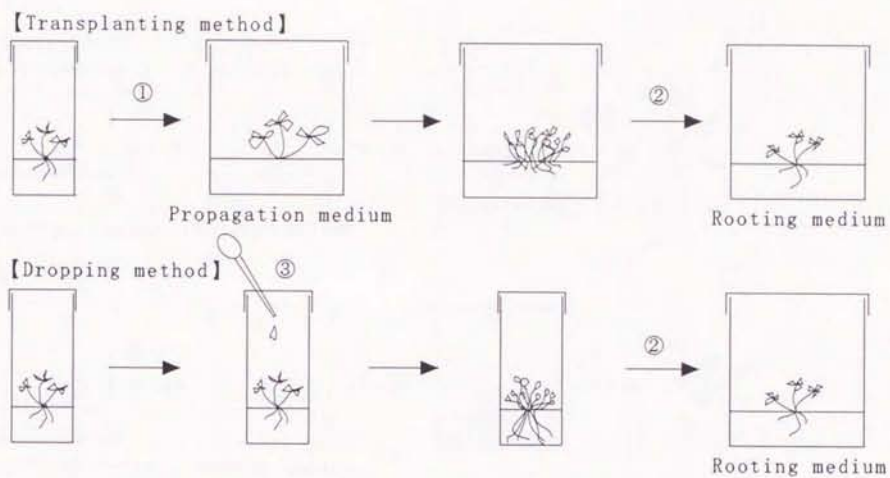


Fig. 11. Comparison of mass-propagation methods
 ① Root pruning and transplanting
 ② Dividing and transplanting
 ③ Dropping of growth regulators on crown

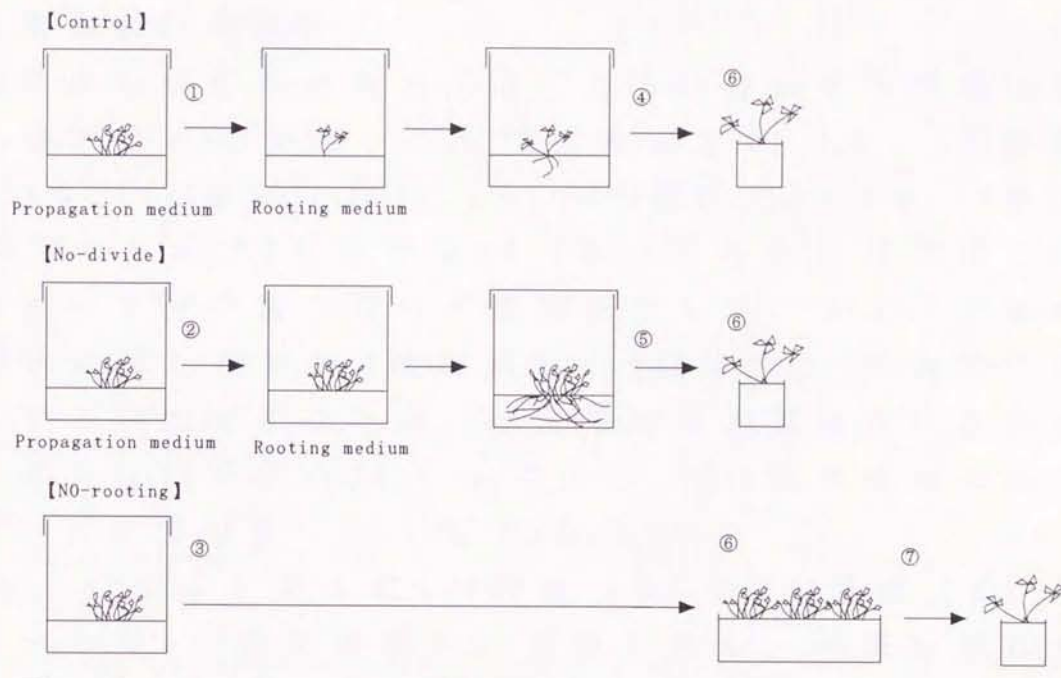


Fig. 12. Comparison of rooting methods.
 ①Dividing and transplanting in rooting medium
 ②Transplanting in rooting medium
 ③Transplanting in soil
 ④Transplanting in soil
 ⑤Dividing and transplanting in soil
 ⑥Acclimating
 ⑦Dividing and transplanting in soil

率について調査した。

得られた苗は前述の増殖作業の省力化と同様の方法で圃場での栽培試験を行い、苗の生長と収量を比較した。

【結果および考察】

多芽体は慣行法と滴下法のどちらの方法でも誘導された。誘導されたシュート数は慣行法で11.6本、1/4倍区で6.1本、1/2倍区では11.8本、3/4倍区で18.1本、1倍区で16.1本および2倍区では14.1本であった。滴下法では慣行法の半分の量で同等の増殖を示した。シュートの展開葉数は慣行法の2.6枚に対し、1/4倍区と1/2倍区では増加する傾向を示したが、他区では差が認められなかった。草丈は慣行法の20.8mmに対し、2倍区では高くなったが、他区では低くなった (Table 23)。

Fig. 13に示すように1/4倍区 (B) と1/2倍区 (C) のシュートは3小葉が展開し、葉色も濃く、発根も認められた。しかし、慣行法 (A)、3/4倍区 (D)、1倍区 (E) および2倍区 (F) では小葉の変形や1小葉しか展開していないシュートが多く、葉色も淡く、発根もほとんど認められなかった。さらに、慣行法と2倍区でシュートが徒長する傾向があった。

順化・定植後の越冬前では展開葉数が対照区の6.5枚に対し、処理区では5.5~7.2枚と差がなかった。また草丈、クラウン径およびえき芽数でも対照区と各処理区の間には差がなかった (Table 24)。

収穫後の展開葉数は対照区が25.8枚、処理区も24.7~27.4枚と差がなかった。草丈、花房長および花房数も対照区と処理区の間には差がなかった (Table 25)。

対照区の収穫時期は7月8日~8月14日で処理区と差はなかった。一果重と一株収量についても、対照区の14.9gと310.8gにくらべ、処理区では、12.5~15.0gと279.6~359.4gで大きな差は認められなかった (Table 26)。

Table 23. Effects of add-methods and concentration of growth regulators on mass-propagation of axillary buds using meristem plantlet.

add-methods	Concentration ^x of growth regulators	No. of shoots per plantlet	Developing shoots	
			No. of leaves	Shoot height (mm)
Control ^z	-	11. 6b [*]	2. 6a	20. 8b
	1/4	6. 1a	3. 4b	18. 4b
Dropping ^y method	1/2	11. 8b	2. 9ab	16. 5b
	3/4	18. 1c	2. 4a	10. 2a
	1	16. 1c	2. 5a	12. 3a
	2	14. 1bc	2. 3a	25. 1c

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

^z Plantlets were pruning roots and transplanting on propagation medium.

^y Plantlets were dropped growth regulators on crowns.

^x Concentration of growth regulators was based on BAP 0.02mg and Kin 0.004mg.

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



Fig. 13. The effects of add-methods and concentration of growth regulators on mass-propagation of strawberry.

A: Control

B: 1/4 concentration of growth regulators

C: 1/2 concentration of growth regulators

D: 3/4 concentration of growth regulators

E: 1 concentration of growth regulators

F: 2 concentration of growth regulators

B-F is dropping method.

Table 24. Effects of add-methods and concentration of growth regulators on plantlet growth before overwinter in field.

add-methods	Concentration ^x of growth regulators	No. of leaves	Plant height (cm)	Crown width (mm)	No. of axillary buds
Control ^z	-	6.5a*	17.8a	17.4a	2.2a
	1/4	7.2a	17.2a	15.4a	1.8a
Dropping ^y method	1/2	5.5a	18.9a	16.2a	1.8a
	3/4	5.8a	16.9a	15.0a	1.7a
	1	6.8a	18.2a	16.8a	1.9a
	2	7.1a	18.3a	18.1a	2.3a

^z Plantlets were pruning roots and transplanting on propagation medium.

^y Plantlets were dropped growth regulators on crowns.

^x Concentration of growth regulators was based on BAP 0.02mg and Kin 0.004mg.

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

Table 25. Effects of add-methods and concentration of growth regulators on growth after picking time in field.

add-methods	Concentration ^x of growth regulators	No. of leaves	Plant height (cm)	Length of flower cluster (cm)	No. of flower clusters
Control ^z	-	25.8a*	20.7a	30.4a	4.3a
	1/4	26.2a	19.4a	29.8a	4.8a
Dropping ^y method	1/2	25.3a	21.3a	27.6a	4.9a
	3/4	24.7a	18.6a	25.4a	4.2a
	1	27.4a	19.5a	26.6a	4.6a
	2	24.9a	17.9a	31.4a	5.1a

^z Plantlets were pruning roots and transplanting on propagation medium.

^y Plantlets were dropped growth regulators on crowns.

^x Concentration of growth regulators was based on BAP 0.02mg and Kin 0.004mg.

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

Table 26. Effects of add-methods and concentration of growth regulators on fruit yield in field.

add-methods	Concentration ^x of growth regulators	Picking periods	Single fruit weight (g)	Fruit weight per stock (g)
Control ^z	-	July 8 - Aug. 14	14.9a*	310.8a
	1/4	July 5 - Aug. 15	12.5a	283.4a
Dropping ^y method	1/2	July 4 - Aug. 14	14.4a	359.4ab
	3/4	July 5 - Aug. 12	14.7a	313.9a
	1	July 8 - Aug. 12	15.0a	291.0a
	2	July 8 - Aug. 12	12.8a	279.6a

^z Plantlets were pruning roots and transplanting on propagation medium.

^y Plantlets were dropped growth regulators on crowns.

^x Concentration of growth regulators was based on BAP 0.02mg and Kin 0.004mg.

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

以上のとおり，茎頂培養によって得られた幼植物のクラウン部分に生長調節物質溶液を滴下することで慣行法と同様に多芽体を誘導することができた。また，いずれの方法によっても得られた苗の生育および収量には差が認められず，滴下法は実用可能な方法であることが示された。

一方，順化作業の省力化については，すべての区で苗が得られたものの，調査項目で違いが認められた。発根率は対照区の97%に対し，無分割区は82%と差がなかったが，無発根区では60%に低下した。発根数は対照区の4.1本に対し，他区では3.2～3.5本に減少する傾向が見られたが有意な差ではなかった。順化率は，対照区の95%に対し，無分割区では94%と差がなかったが，無発根区は60%に低下した（Table 27）。

順化・定植後の越冬前の展開葉数は対照区が6.2枚であったのに対し，処理区も6.8～7.1枚と差がなかった。草丈，クラウン径およびえき芽数も同様に対照区と各処理の間には差がなかった。

収穫後の展開葉数は対照区の24.5枚に対し，処理区は25.8～27.1枚と差がなかった。草丈，花房長および花房数でも対照区と各処理区の間には差がなかった（Table 28）。

対照区の収穫時期は7月8日～8月14日で，一果重と一株収量はそれぞれ14.2g，275.8gであった。いずれも処理区と大きな差はなかった（Table 29）。

以上の結果から，無分割区は慣行法と発根率や発根数に差が見られず，無菌操作を省略することが可能であることが示された。

また，対照区と無分割区では鉢上げ後の順化で1枚の育苗箱には30本の苗しか入れることができず，順化できる苗数は28.2～28.5本であった。しかし，無発根区では1枚の育苗箱に入れる多芽体の数を多くすることでこれ

Table 27. Effects of rooting methods on acclimatization.

Treatments	Rooting rate(%)	No. of roots	Acclimatization rate(%)
Control ^z	97b*	4.1a	95b
No-divide ^y	82b	3.5a	94b
No-rooting ^x	60a	3.2a	60a

^{z, y, x} See Fig. 12.

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

Table 28. Effects of rooting methods on growth before overwinter and after picking time.

	Treatment	No. of leaves	Plant height (cm)	Crown width (mm)	No. of axillary bud	Length of flower cluster (cm)	No. of flower clusters
Before overwinter	Control ^z	6.2a*	16.3a	16.4a	1.9a	-	-
	No-divide ^y	7.1a	17.2a	15.3a	1.8a	-	-
	No-rooting ^x	6.8a	17.4a	18.1a	1.8a	-	-
After picking time	Control	24.5a	18.0a	-	-	27.4a	4.5a
	No-divide	25.8a	19.1a	-	-	26.6a	4.6a
	No-rooting	27.1a	20.5a	-	-	24.3a	4.3a

^{z, y, x} See Fig. 12.

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

Table 29. Effects of rooting methods on fruit yield in field.

Treatment	Picking periods	Single fruit weight (g)	Fruit weight per stock (g)
Control ^z	July 8 - Aug. 14	14.2a*	275.8a
No-divide ^x	July 5 - Aug. 14	13.8a	322.6a
No-rooting ^y	July 7 - Aug. 12	15.3a	297.0a

^{z, y, x} See Fig. 12.

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

より多くの苗の順化が可能となる。つまり、無発根区では慣行法に比較し発根率と順化率は低下するものの、限られたスペースで順化の効率を高めることができた。

一方、いずれの方法でも得られた苗の生育と収量には差がなく、これらの発根法は目的に応じて実用可能であることが示された。

現在、イチゴ生産は省力化の方向に進み、栽培技術や出荷規格が簡素化され、作業時間は短縮されている⁸⁷⁾。しかし、ウイルスフリー苗を作る技術や大量増殖での簡略化についてはほとんど検討されていない。他の作物では、省力化を目的に大量培養槽を利用した増殖法が検討されているが^{113, 114)}、培養体のガラス化や順化の問題があるため、イチゴでは実用化に至っていない。本試験の方法は新たに技術修得や設備投資が不要なことから早期の実用化が可能である。

第3章 イチゴの四季成り性系統育成に関する研究

イチゴはバラ科に属する8倍体（染色体数 $2n=56$ ）の植物であり⁸¹⁾、わが国ではランナーで繁殖する栄養繁殖性作物の代表的な種である。しかし、品種改良にあっては交雑育種が一般的で、現在栽培されているほとんどの品種がこの方法によって育成されている^{1, 23, 35, 68, 90, 130)}。

一方、組織培養を利用した育種では葉外植片からの植物体再生^{119, 120)}、耐病性系統の作出^{3, 95, 107, 108, 122)}や体細胞変異体の出現頻度およびその形質^{124, 149)}について研究がなされている。さらに、遺伝子操作を利用した形質転換体の作出^{7, 121)}も試みられている。

現在、北海道のイチゴ栽培では9月上旬から10月中旬に収穫する夏秋どり栽培が高収益をあげる作型として注目されている。しかし、夏秋どり栽培では短日処理に多くの労力を必要とするため、この作型の作付面積は増加していない。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が、現存の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、普及には至っていない。北海道における夏秋どり栽培の作付面積を伸ばすためには、現在の一季成り性品種並の収量や果実硬度を持つ四季成り性品種の育成が不可欠である。

本章では‘ベルルージュ’の葉外植片からのカルス誘導、増殖および個体再生の効率化を検討したうえで、組織培養によって得られたクローン植物から、四季成り性に注目して選抜を行った。さらに、得られた選抜系統の能力を選抜母株と比較した。

【材料および方法】

実験1. 葉片からのカルス誘導と植物体再生培養

カルス誘導は‘ベルルージュ’の茎頂培養で得られた幼植物の未展開葉をシャーレ(φ90mm×20mm)に5葉置床し, 10反復の培養を行った。培地として2,4-D(1mg/l)を添加したMS基本培地^{66,67)}を用いた。試験区は明条件(2,000lux, 連続照明)と暗条件の2区を設け, 25℃で90日間培養した。カルス増殖は誘導されたカルスを葉外植片から切り離し, 前述と同じ培地に移植し, 同じ条件で60日間培養した。個体再生には増殖後のカルスを用いた。培地としてホルモンフリーのMS基本培地を用い, 25℃, 明条件で90日間培養した。カルス形成葉片数, 形成カルス数, 再生カルス数および再生個体数について調査を行った。

実験2. 葉外植片由来のクローン植物からの四季成り性株の選抜とその特性

選抜集団として1989~1990年に我妻ら¹³⁵⁾の方法で作出した6,024個体のクローン植物を対象とした。

四季成り性株の選抜は1990年にこれらのクローン植物を6cmポリポットに鉢上げし, 順化後, 露地に仮植し花芽分化した株を一次選抜し, 圃場に定植した。栽植密度は90cm×25cmの高畝1条植えとし, 白黒ダブルマルチを使用した。肥料は定植の10日前にホウ素入り燐硝安加里NS262を30kg/10a, 有機化成S708を120kg/10a施与し, 越冬後に千代田472, 7kg/10aを数回に分け灌水時に追肥した。越冬後の1991年に花房発生期間の長い株およびランナー増殖によって得られた子株に花芽分化の認められた株を二次選抜した(Fig. 14)。選抜株の子株は同様の条件で株ごとに圃場に定植した。二次選抜した株およびその子株は越冬後の1992年に二次選抜と同様の調査を行い, その形質が安定しているかどうかを調べた。四季成



Fig. 14. Strawberry plants selected by flower-bud differentiation of runner plants.

り性の安定した株を選抜し、茎頂培養で20個体に増殖し、選抜系統とした。

選抜系統および‘ベルルージュ’を前述と同様の方法で圃場に定植し、越冬前と収穫後に特性を調査した。展開葉数、草丈、クラウン径およびえき芽数を越冬前の1993年10月15日に調査した。収穫後調査として展開葉数、草丈、花房長および花房数を1994年8月20日に行った。また、収量は1994～1996年の3年間に収穫時期、収穫日数、一果重、1株収量、果肉および果皮硬度を調査した。果皮および果肉硬度の測定にはプロプッシュ計（SINKODENSI MFG-5K 芯径2mm）を用いた。測定はそう果をさけ果実の皮層部まで、プロプッシュ計の針が垂直になるよう突き刺した。また、果皮を含む果実硬度と果皮を除いた果肉硬度については1株あたり、10果を調査した。果皮硬度は果実硬度から果肉硬度を引いて算出した。

【結果および考察】

実験1. 葉片からのカルス誘導と植物体再生培養

培養90日目のカルス形成率は、明条件が14%、暗条件が78%と暗条件で高かった。明条件では7個の褐色カルス、暗条件では42個の緑色カルスが得られた（Table 30, Fig. 15）。得られたカルスは増殖により、明条件では褐色で柔くペースト状に、暗条件では緑白色で固く塊粒状になった（Fig. 16）。

また、カルスからの個体再生におよぼす明暗条件の影響では、暗条件で誘導したカルスにおいてのみ再生個体が認められ、個体再生率は64%であった。この培養で1カルス当たり平均32個体の植物体を得られた（Table 31, Fig. 17）

以上の結果、カルスの誘導および増殖を暗所で行うことによって高い個体再生率を得ることができた。

Table 30. Effects of diffused light and continuous darkness on callus formation for leaf culture.

Treatment	Rate of callus formation (%)	No. of callus formed
Light ²	14	7
Darkness	78	42

² Light of 24 hr. at 2,000 lux.

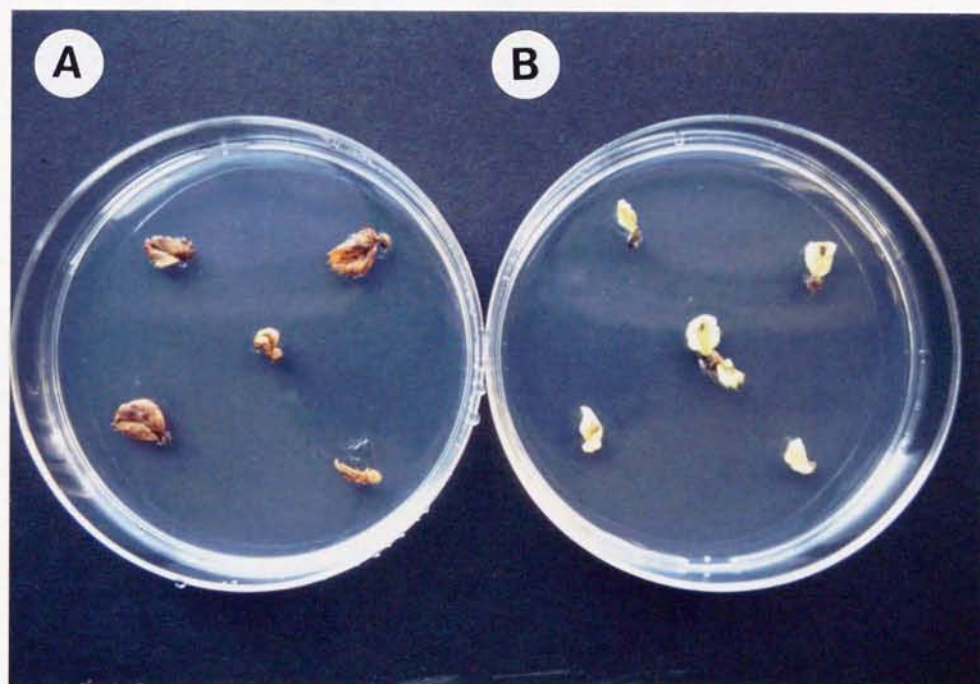


Fig. 15. Callus induced from young leaves under light and darkness.
A: Light, B: Darkness

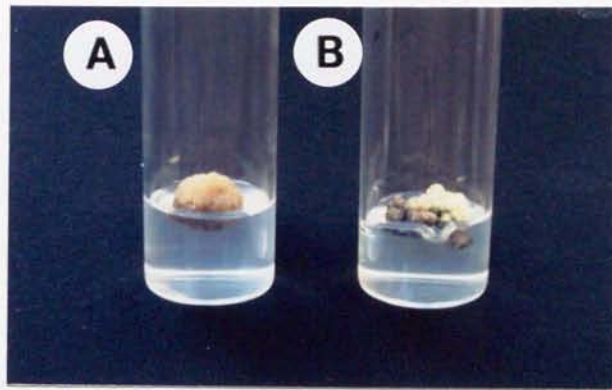


Fig. 16. Comparison of callus propagated under light and darkness.
A: Light, B: Darkness

Table 31. Effects of diffused light and continuous darkness on plant regeneration for leaf culture.

Treatment	Rate of plant regeneration (%)	No. of plants regenerated
Light ^z	0	0
Darkness	64	864 (32) ^y

^z Light of 24 hr. at 2,000 lux.

^y (per callus)



Fig. 17. Shoot formation from callus induced under darkness.

実験2. 葉外植片由来のクローン植物からの四季成 り性株の選抜とその特性

1990年に6,024株のクローン植物から、育苗過程で花芽分化した637株を四季成り性株として一次選抜した。1991年に花房発生期間の長い株およびランナー増殖によって得られた子株に花芽分化の認められた2株を二次選抜した。二次選抜した2株から発生した子株は選抜株と同様の条件で圃場に定植した。越冬後の1992年に二次選抜した株およびその子株から発生した子株に花芽分化が見られるかと、その形質が安定しているかを調べた。そのうち四季成り性が安定していた2株を選抜し、選抜系統 BR-cv1と BR-cv2とした (Table 32, Fig. 18)。これらを茎頂培養で各20個体に増殖した。

越冬前調査では、'ベルルージュ'の展開葉数が6.4枚に対し、選抜系統では5.7~7.1枚と差がなかった。草丈、クラウン径およびえき芽数でも'ベルルージュ'と選抜系統の間には差がなかった。

収穫後の調査では、'ベルルージュ'の展開葉数が28.6枚に対し、選抜系統も28.9~29.3枚と差がなかった。草丈、花房長および花房数についても'ベルルージュ'と選抜系統の間には差がなかった (Table 33)。

また、収穫時期については、調査した3ヶ年の融雪の早晚で多少前後するものの、'ベルルージュ'の収穫日数22~28日に対し、選抜系統は2倍以上の50~57日と著しく長く、四季成り性と考えられた (Table 34)。

Table 32. Selection of ever-bearing plant from clone plants Belle-rouge in leaf culture.

No. of recovered plants used in selection	The primary ^z selection	The secondary ^y selection	Elite line
6,024	637	2	2

^z Selected by flower-bud differentiation of clone plants.

^y Selected by flower-bud differentiation of runner plants.

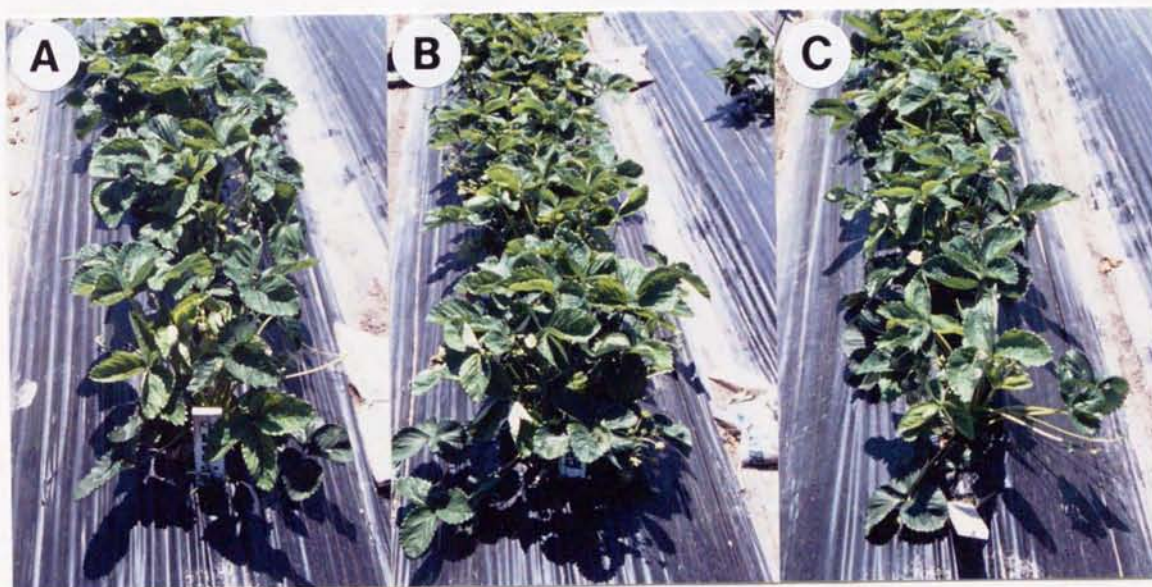


Fig. 18. Plant forms strawberry lines BR-cv1, BR-cv2 and cultivar Belle-rouge. A: BR-cv1, B: BR-cv2, C: Belle-rouge

Table 33. Growth characteristics of selected ever-bearing lines, BR-cv1 and BR-cv2, before overwinter in 1993 and after picking time in 1994.

		No. of leaves	Plant height (cm)	Crown width (mm)	No. of axillary bud	Length of flower cluster (cm)	No. of flower clusters
Before overwinter	Belle-rouge	6.4a ²	18.5a	16.6a	2.4a	-	-
	BR-cv1	5.7a	16.9a	17.2a	2.2a	-	-
	BR-cv2	7.1a	18.2a	18.3a	2.2a	-	-
After picking time	Belle-rouge	28.6a	19.9a	-	-	28.4b	4.8a
	BR-cv1	29.3a	18.5a	-	-	17.9a	8.6b
	BR-cv2	28.9a	20.6a	-	-	20.4a	7.2b

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

Table 34. Picking periods in the selected ever-bearing lines, BR-cv1 and BR-cv2, during the three seasons, 1994-1996.

	Picking periods (No. of picking days)					
	1994		1995		1996	
Belle-rouge	July 5 - Aug.	1(28)	June 30 - July 21	22(22)	July 8 - Aug.	2(25)
BR-cv1	June 29 - Aug.	18(50)	June 28 - Aug.	18(51)	July 4 - Aug.	30(53)
BR-cv2	June 29 - Aug.	25(57)	June 26 - Aug.	18(53)	July 5 - Aug.	31(54)

一果重は‘ベルルージュ’の14.5gに対し，選抜系統は12.2～12.8gと12%以上小さくなった．一方，一株収量は‘ベルルージュ’の500.7gに対し，選抜系統では756.7～785.6gと51%以上増加した．果肉硬度は‘ベルルージュ’の75.9Nと比べ，BR-cv1は88.2N，BR-cv2は80.7Nと差がなかった．果皮硬度も‘ベルルージュ’が63.9N，BR-cv1は58.2N，BR-cv2は68.5Nと差がなかった（Table 35）．

BR-cv1とBR-cv2の果形は‘ベルルージュ’と同じ円錐形であった．しかし，選抜系統には一番果を中心に乱形果が見られた（Fig. 19）．乱形果は果柄が数本癒着して合弁花のような状態で発生し，果実は非常に大きかった．乱形果の発生は年を追うごとに減少した．

以上のように，選抜系統BR-cv1とBR-cv2を母株の‘ベルルージュ’と比較すると，花房数の増加により一果重は劣るものの，一株収量は勝った．‘ベルルージュ’並の果実硬度を持った四季成り性系統が得られ，当初の育種目標が達成された．

組織培養を利用した育種に関し，高橋らは‘盛岡16号’からイチゴ黒斑病抵抗性品種の作出^{103,104}や抵抗性品種の栽培適応性¹⁰⁶を報告している．さらに，黒斑病感受性品種¹⁰¹やその遺伝¹⁰²について詳細な検討を行い，クローン植物を利用した育種の有効性を示唆している¹⁰⁵．組織培養で得られたクローン植物を利用した育種では交雑育種法¹⁴⁷に比べ，短期間で目的とする株が得られることや母材とする品種の形質が失われないことなど多くの利点がある．本研究でも短期間に育種目標に達することができた．また，果実硬度など多くの形質が母材とした品種と同じであった．一方で，果柄の癒着によって一番果に乱形果が生じた．培地へのサイトカイニン添加は，培養直後の植物体に異常生長を起こさせることが知られている⁶⁹．現に，選抜株の栽培を継続する中で乱

Table 35. Fruit quality in the selected ever-bearing lines, BR-cv1 and BR-cv2, during the three seasons, 1994-1996.

	Single fruit weight (g)	Fruit weight per stock (g)	Hardness of fruit flesh (N)	Hardness of fruit peel (N)
Belle-rouge	14.5b ²	500.7a	75.9a	63.9a
BR-cv1	12.8a	756.7b	88.2a	58.2a
BR-cv2	12.2a	785.6b	80.7a	68.5a

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

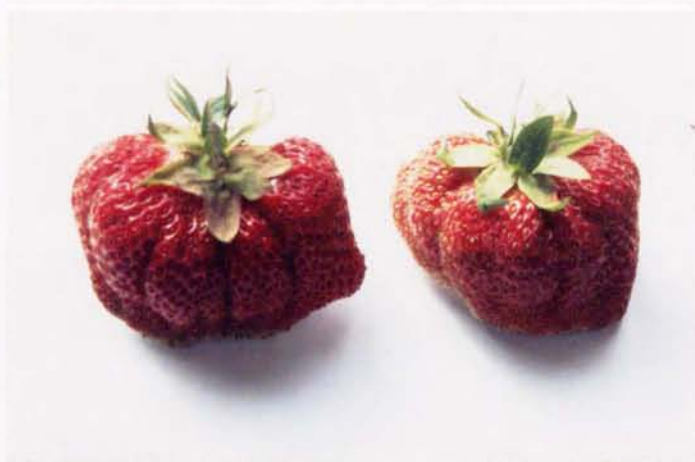


Fig. 19. Strawberry line BR-cv1 and BR-cv2 showing irregular fruits.

形果の発生は減少する傾向を示し、ランナー増殖を繰り返す中でこれらが改善されることが期待できる。

得られた系統は育種目的を達成できたものの、花房数が増加し、果実が小さくなった。摘果や花房の間引きなど栽培法の改善によって果実を大きくする検討が必要である。しかし、現在は収穫作業を省力化できる大果系品種が望まれている。また、子株が花芽分化を起こすため、ランナーによる増殖効率が劣り、増殖と育苗を農業者が行うのは難しい。得られた系統の特性から直ちに品種として普及するのは難しく、育種母材としての利用が有効と思われる。

四季成り性品種は一般に一季成り性品種よりも、ランナー増殖の効率が悪く^{41, 146)}、普及には試験管内で必要な苗数を確保する効率的な大量増殖システムの確立が必要である。