

資 料

イチゴ品種宝交早生の葯培養による幼苗生産*

衣川堅二郎・種坂英次・芝尾 健**

Production of Young Plants by Anther Culture of
Strawberry, variety Houkouwase

Kenjiro KINUGAWA, Eiji TANESAKA and Ken SHIBAO

Synopsis

Culture conditions of anther culture of strawberry, variety Houkouwase, were studied to improve conventional mass production technology of young plants by callus. Anthers about 1 mm long easily produced callus on the MS and LS media supplemented with sucrose (30 g/l), agar (8 g/l), NAA (0.2-2.0 mg/l), and BA (0.2-2.0 mg/l). Presence of anthers of appropriate size for callus induction inside bud was estimated by the size of the bud and by the length of the bud stalk. Enough aeration and supply of fresh medium to calli seemed to accelerate their propagation in culture. Plant-regeneration was enhanced by transplanting growing calli from the medium with NAA of low concentration onto the medium containing 0.2 mg/l NAA and 2.0 mg/l BA. A practical handling method to produce young plants was also presented.

結 言

イチゴ苗は、ウイルスに感染すると、その後の草勢が弱くなり、著しいときは生長が停止し、果実は小さくなって減収する。イチゴ苗は栄養繁殖によって増殖するため、ウイルスはランナーを通じて次世代へ伝染し、引続き子孫植物に病徴が現れる。この弊害を防ぐには、ウイルスに無感染の苗（ウイルスフリー苗）の育成が必要で、それはランナーの生長点培養、若い葯、花糸などの培養による、カルス組織に再生させた植物から育成できることが知られている^{1,2,3)}。一般に用いられている方法はランナーの生長点培養による方法であるが^{4,5)}、確実にウイルス無感染組織を得るには、茎長組織から0.4 mm以下の微小な切片を切り出す必要があり^{6,7)}、0.6 mm角になると無ウイルス化は不可能であるとされている。この技術は高度の熟練を要し、1茎長から1細胞塊または1カルス塊しか養生できないから効率も

悪い。一方、若い葯または花糸組織もウイルス無感染で、若い葯の培養からカルス塊を、次いで植物体を再生させ、ウイルスフリー苗が作出されている²⁾。本研究では、この技術を実際に種苗生産の現場に適用した形に組み立てるため、培養の諸条件を改めて検討したものである。

材料および方法

材料

徳大和農園より購入し、ウイルスに感染している品種宝交早生を使用した。1987年(昭和62年)、圃場に定植、養生し、翌年3月～7月の間、蕾を密閉したカップの湿室内に採取し、研究室に持ち帰り実験に供した。

方法

無菌培養には、MS培地⁸⁾、LS培地⁹⁾およびWhite培地(以後WH培地¹⁰⁾)に蔗糖30 g/lおよび寒天8

*この研究は、昭和63年度奈良市経済部農林課の委託研究として助成金を受けて行った。

**農学科遺伝育種研究室 (Lab. of Genetics and Plant Breeding, Dept. of Agronomy, Fac. of Agriculture, Kinki Univ., Nakamachi, Nara, Nara 631, Japan)

Table 1. Compositions of basic nutrient media for anther and callus culture of strawberry

Component	MS*	Media (mg/l) LS*	WH**
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	370	720
Na ₂ SO ₄	—	—	200
KCl	—	—	65
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	440	—
KNO ₃	1900	1900	80
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	—	—	300
NH ₄ NO ₃	1650	1650	—
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	—	—	165
K ₂ HPO ₄	170	170	—
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.8	27.8	—
Na ₂ EDTA	37.3	37.3	—
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22.3	22.3	7
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6	8.6	3
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025	0.025	—
Fe(SO ₄) ₃	—	—	2.5
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025	0.025	—
KI	0.83	0.83	0.75
H ₃ BO ₃	6.2	6.2	1.5
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25	0.25	—
Sucrose	30000	30000	20000
myo inositol	100	100	—
Nicotinic acid	0.5	—	0.5
Pyridoxine HCl	0.5	—	0.1
Thiamine HCl	0.1~1	0.4	0.1
Ca-pantothenate	—	—	1
Glycine	2	—	3
Cysteine HCl	—	—	1
Agar	8	8	8

*MS (1962) and LS (1965) macro-and micronutrients.

**WHITE (1943).

g/lを加えたものを基本培地とし、必要な場合それに成長調整物質を適当な濃度で添加した(Table 1)。培地 pH は寒天を熱溶解した後0.1 N HCl または 0.1 N NaOH で5.7~5.8に調整し、25×100 mm 平底試験管または100 ml エルレンマイエルフラスコに分注し、1 気圧加圧15分間高圧滅菌した。生長調整物質は、常法にしたがい、オーキシンとして

Naphthaleneacetic acid (NAA)、サイトカイニンとして Benzyladenine (BA) を使用した。

蕾は70%エタノールに10秒浸漬、次いで2%アンチフォルミン (NaOCl) に10分間浸漬して表面を滅菌し、無菌的に萼と花弁を除き、薬を暴露した。薬は置床後 25°C±1°C 1000~2000 lux 連続光下で培養した。以下で特に記載しないときは、この培養条

件によるものとする。

結 果

1. 蕾および葯の大きさと葯壁のカルス化率

カルス形成が最も良好な大きさの葯の存在を蕾から推定するため、長さ4～10 mmの閉じた蕾を採取し、その大きさ、葯の大きさ、葯の色、および葯組織のカルス化率をしらべた。

カルス誘導に用いた培地は、LS基本培地にNAAとBAを2.0 mg/lずつ加えたものである。蕾と葯の大きさの関係をTable 2に、葯の大きさと置床6週間後のカルス化率をFig. 1に示した。カルス化率は葯の大きさが1 mm前後の時が最も高く、色は黄緑色から淡黄色で、その時の蕾の大きさは5.5～6.0 mmであった。この時期の葯の内容を押しつぶし法と酢酸カーミン染色によって検鏡すると、多くは花粉母細胞の減数分裂直後であった。また、蕾が1 cm前後に発育し、葯も約2 mmの長さで濃黄色～橙色になると、葯壁はカルス化しなかった。

2. 花梗の長さと葯のカルス化率

蕾の花梗の長さとその蕾から採取した葯のカルス化率の関係をFig. 2に示した。花梗が5.0～6.0 mmの蕾の葯はほぼFig. 1のランク2～4に当るものが多く、最も容易にカルス化した。大きさが8～9 mmの大きい蕾でも、花梗が5～6 mmであれば、

多数のカルスが形成された。花梗の長さも、カルス化しやすい葯を採取する手係りの1つになると考えられた。

3. 培地の種類と葯壁のカルス化率

3種の基本培地に、NAAとBAを0.2 mg/lと2.0 mg/lを加えた培地と、2.0 mg/lと0.2 mg/l加えた培地の計6種を用意した。カルス化率はMS培地とLS培地間で大差がなかった。また生長調整物

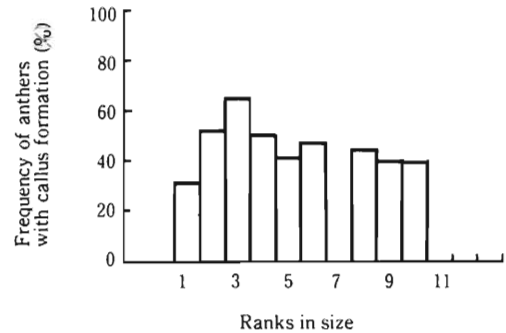


Fig. 1. Size of flower buds and the frequency of anthers with callus formation in culture (strawberry). For the size of flower bud in every ranks see Table 2.

Table 2. Size of flower buds, petals, and anthers of strawberry

Pank	Size(l)* (mm)	Mean length of petal (mm)	Mean length of anther (mm)	Color of anther**
1	4.5≤l< 5.0	1.25	0.80	tr to lg
2	5.0≤l< 5.5	1.81	0.96	yg to ly
3	5.5≤l< 6.0	2.50	1.10	
4	6.0≤l< 6.5	2.79	1.37	ly
5	6.5≤l< 7.0	3.16	1.36	
6	7.0≤l< 7.5	3.51	1.63	y
7	7.5≤l< 8.0	nd	nd	nd
8	8.0≤l< 8.5	3.60	1.83	darker y
9	8.5≤l< 9.0	4.40	1.86	
10	9.0≤l< 9.5	5.12	1.92	darker y to o
11	9.5≤l< 10.0	4.47	2.0	
12	10.0≤l	5.50		o
13	open			

*Length of closed young flower bud. The number of buds measured were 20 to 30.

** : tr, transparent ; lg, light green ; ly, light yellow ; y, yellow ; o, orange.

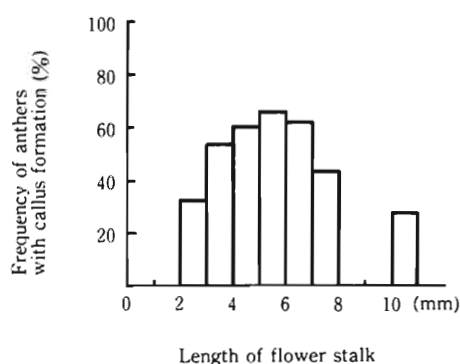


Fig. 2. Length of flower stalks and the frequency of anthers with callus formation in culture (strawberry)

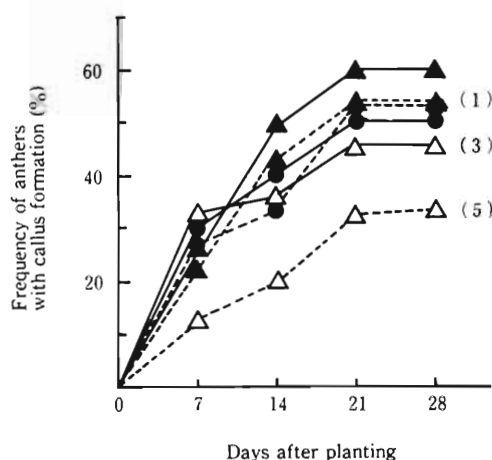


Fig. 3. Basic nutrient media and the frequency of anthers with callus formation in culture (strawberry). Media: MS (○), LS (▲), and WH (△). Every media were supplemented with NAA 0.2+BA 2.0 mg/l (—), or with NAA 2.0+BA 0.2 mg/l (-----).

質の水準の組合せ2種を比較すると、WH 培地を除き、2種の間で大差がなかった。WH 培地では、カルス形成した約は置床後21日目まで増加したが、その後、約もカルスも褐化枯死したので、生残数を()内に記載した (Fig. 3)。

4. 生長調整物質の組合せとカルス化率

LS 基本培地に、NAA および BA の濃度を 0, 0.2 および 2.0 mg/l の3水準で組合せ、薬を置床し、4

Table 3. Compositions of plant growth regulators in culture media and the number of anthers to form callus*

Group	Combination of PGR** (mg/l)		Days after culture started			
	NAA	BA	7	14	21	28
1	0	0	0	0	0	0
2	0.2	0	0	0	0	0
3	2.0	0	0	1	1	1
4	0	0.2	0	1	1	1
5	0.2	0.2	0	4	7	7
6	2.0	2.0	1	2	5	7
7	0	2.0	1	1	1	2
8	0.2	2.0	0	3	4	4
9	2.0	2.0	0	8	11	14

*The number of anthers cultured in each group was 24.

**Plant growth regulator.

週間カルス形成を観察した。NAA または BA のどちらかが欠けても、実際利用し得るほどのカルス形成はおこらなかったが、NAA または BA の濃度が高くなるほど、カルス化率も高くなる傾向がみられた (Table 3)。

5. 培地の種類とカルス増殖

3種の基本培地に NAA 0.2 mg/l と BA 0.2 mg/l を添加した培地を用意し、そこへ、5 mm 角のカルス塊を置床し、2週間毎に新培地へ移植した。置床時および移植時にカルスの重量を測定し、Fig. 4に示した。カルスはMS 基本培地において最も良好な増殖を示した。ついでLS 基本培地が有効であった。WH 培地では、カルスは褐化することが早く、その多くは生長を停止した。

6. 生長調整物質濃度とカルスの増殖

LS 基本培地に、それぞれ3水準0, 0.2, および2.0 mg/l のNAA とBA を組合せて添加し、そこへカルスを置床し、1ヶ月間の増殖を測定した。置床したカルスは、

- 1) LS 基本培地に NAA 2.0 mg/l と BA 0.2 mg/l を添加した培地で養生した前歴をもつものと
- 2) 同じく NAA 0.2 mg/l と BA 2.0 mg/l を添加した培地で養生した前歴をもつものの2種を分けて用いた。これらの結果を Table 4 に示した。

1) では、NAA 単独添加区ではカルスは殆んど増殖せず、BA の存在下で各区とも良い増殖を示し

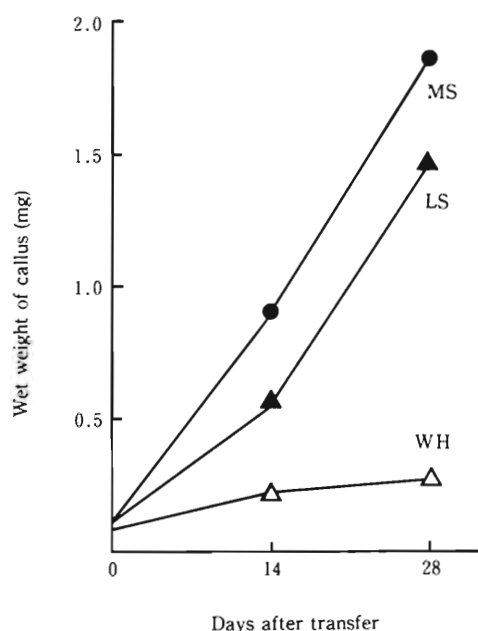


Fig. 4. Propagation of callus with time on various nutrient media (supplemented with NAA 0.2 and BA 0.2 mg/l)

た。2)では、BA 単独添加区ではカルスは殆んど増殖せず、NAA の存在下で良い増殖を示した。即ち、置床したカルス塊自体に養生時の前歴培地に含まれていた生長調整物質が残存し、その後の増殖に影響をおよぼしているものと推定される。結論的にカルスは NAA も BA も高濃度 (2.0 mg/l) のとき最も良好な増殖を示した。

7. 振盪培養によるカルス増殖

寒天を加えない LS 基本培地に、NAA と BA をそれぞれ 2.0 mg/l 添加した液体培地を、100 ml エrlenマイエルフラスコに 50 ml ずつ調製した。一方、同一組成で寒天を加えて調製した平板培地で養生したカルス塊を 10 mm 角に切り揃え、葉さじでつぶして、全量を上の液体培地へ接種した。これを、25°C、振盪距離 7 cm、96 往復/分、2000 lux 連続光下で振盪培養した。2 ヶ月間 2 週間毎の観察結果の概要を Fig. 5 に示した。カルスは器壁に付着し、好氣的条件でよく生長し、培養 8 週間後にフラスコ頸部の下では周囲のカルス塊が中央で接触するほどよく増殖した。

8. カルスの色と不定胚の発生

カルスは培養条件によってその色に変化する。色

Table 4. Effects of plant growth regulators in sequential cultures on the growth of callus

BA (mg/l)	Calluses were transferred from the medium containing:					
	NAA 2.0+BA 0.2 (mg/l)			NAA 0.2+BA 2.0 (mg/l)		
	0	NAA 0.2 (mg/l)	2.0	0	NAA 0.2 (mg/l)	2.0
0	+	+	+	+	++++	++++
0.2	++++	++++	++++	+	++++	++++
2.0	++++	++++	++++	+	+++	++++

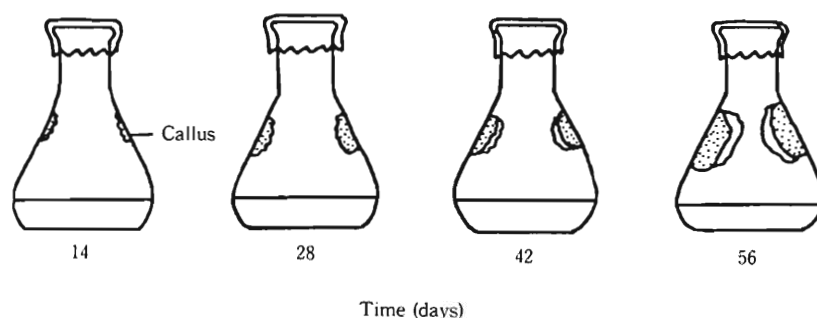


Fig. 5. Shaking culture of strawberry callus

の異なったカルス塊を5 mm 角に切り揃え、LS 基本培地に BA 2.0 mg/l を単独に添加した培地にそれらを置床し、主として植物体（不定胚）の形成を観察した。1ヶ月間培養後の観察結果を Table 5 に示した。この培養条件下では、黄緑色と黄色のカル

Table 5. Color of callus and regeneration of plant

Color of callus	Growth	Regeneration
yellow green	+	+
yellow	+	+
white	—	—
red	—*	—
brown	—**	—
transparent	—***	—

Medium, LS+BA 2/0 mg/l.

*Some turned brown.

**Finally turned dark brown.

***Grew at the beginning, turned dark brown, then ceased growing.

ス塊から最も早く多数の植物体が再生し、これらは引続き生長した。

9. カルス増殖と植物体再生に対する生長調整物質の濃度条件

前項6において、移植したカルスの生長には、移植前の培地の生長調整物質の濃度が影響することがわかった。そこで、ここでは、この影響の詳細と植物体再生条件についてしらべた。あらかじめ、LS 基本培地にそれぞれ3水準0, 0.2, 2.0 mg/l の NAA と BA を組合せて添加した培地でカルスを増殖し、それらを同様に調整した各培地に移植して、50日後にカルス生長の良否と植物体再生とを観察した (Table 6)。

カルス生長に関して、Table 6 の1, 3区と2, 4区とを比較すると、移植前培地の高濃度 NAA の影響が移植後 NAA を欠いた培地 (2, 4区) においてカルスが増殖を続けている点に現れている。植物体再生に関しては、移植前培地において NAA が低濃度で BA は高濃度であった前歴の影響が3区の NAA 0.2 mg/l+BA 2.0 mg/l において最も早く再生が生じている点に現れている。

Table 6. Effects of plant growth regulators in sequential cultures on the growth of callus and plant regeneration

Group	In the medium of pre-culture (mg/l)		BA (mg/l)	NAA (mg/l)		
	NAA	BA		0	0.2	2.0
1	0.2	0.2	0	—	++	++
			0.2	—	++	++
			2.0	—	++	+++
2	2.0	0.2	0	+	++	+++
			0.2	+	++	++
			2.0	+	++	++
3	0.2	2.0	0	—	++	++
			0.2	—	++	++
			2.0	—	++*	+++
4	2.0	2.0	0	+	++	++
			0.2	+	++	++
			2.0	+	++	+++

Basic media was the LS. Growth of callus: good (+), medium (++), and very good (+++). *Plant regeneration occurred in some cultures.

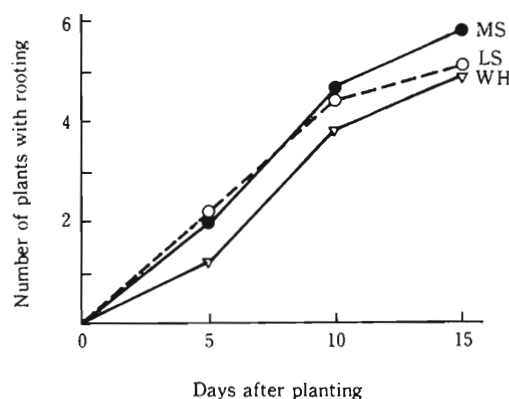


Fig. 6. Basic nutrient media and rooting from regenerated plant
Total number of plants examined were 30.

同様の結果は、基本培地に MS を使用したときも再現した。

植物体は時間の経過と共に多数再生し、さらに生長して、培養瓶に満ちるほどに増殖した。

10. 挿し木からの不定根形成と培地

カルス塊から再生した植物を苗にまで養生するには、まず、根を着けた各個体を一本づつ生長させなければならない。そこで、移植用苗養生の目的をもって再生植物体の上半を切りとり、新培地へ挿し木し、発根の良否を観察した。培地には蔗糖を除いた MS, LS および White 基本培地を用いた。15日間約 2 mm 以上の長さに発根。伸長した根の数(本/個体)を計測し、植物体の生長をも観察した。結果は Fig. 6 に示した。

発根数の増加は 3 基本培地間で大差がなかった。しかし、植物体は、MS と LS において培養瓶一杯になるまで大きく生長したが、WH 培地では茎は細く、葉は小さく、生長は悪かった。

11. 幼植物の育成と馴化

前項 10 において、発根し始めて 2～3 週間後、幼植物体を取りだし、根についている寒天を滅菌水中でよく振り落とし、MS 培地(蔗糖を除く)で湿らせた水苔培地へ移植した。根数 4～8 本をもった幼植物体はさらに発根して、殆んどすべて順調に生育した。次に、これらを根を水苔で包んだ形で透明プラスチック製ケーキパック容器(17×17×70 cm)内のパーミキュライト(高圧滅菌済み)に移植し、その容器を同じ容器で覆い、温室として次の経過で培養した。

移植後の日数 培養条件(12月下旬以降)

2～3	恒温室(25℃～28℃), 暗所
3～7	同, 連続光 2000 lux
7～14	同, 徐々にふたを開け, 湿度を下げる。
14～21	ふたを除き, 日中は室外へ出す。
21～	ビニールハウス内, ポットに定植

この幼植物は苗として順調に生育した。

考 察

1. 材料の適期

本研究の材料では、長さが 5.0～6.5 mm の蕾または 3～7 mm の花梗をつけた蕾から採取した薬が最もカルス化しやすい時期であり、この段階の蕾は未だ開かないため、薬を損うことなく滅菌できる便利さがあつた。しかし、蕾の発育速度は気候や土壌肥料分の多少によって異なり、また蕾の大きさ自身が 1 番花、2 番花、3 番花と進むにつれて小さくなる傾向がある。そのため、採取が必要になったその時の材料植物について、蕾の大きさと薬の発達の関係等を先行する蕾でしらべ、適期の薬を適確に採取する手係りとしなければならない。

2. カルス培養法

薬壁組織のカルス化、カルスの増殖、幼植物の育成には、WH 培地を使用するよりは MS 培地を使用することで好成績が得られた。これは、前 2 者の成分組成が優れていると言うよりは、それらの濃度が後者より約 10 倍も高いことに原因があると考えられる。

液体培地によるカルスの振盪培養では、寒天平板培地による静置培養よりはるかに高いカルス増殖率が得られた。このとき、カルスは容器の器壁に附着して増殖したから、カルスは充分な通気と新鮮な培養液の補給があれば著しく促進されるものと推定される。したがって、次は、この方向へ培養機器の改良をするつもりである。

3. 薬培養による幼苗増殖工程

薬組織のカルス化から幼苗増殖に至るまでの培養諸条件について、上に述べた。これに、挿木・発根および馴化を組合せると薬採取から幼苗を増殖する工程として Fig. 7 が成り立つ。この工程は、イチゴ品種室交早生を使用するかぎり、充分効果的で、幼苗は短期間で手軽に、大量に生産が可能であった。定植した幼苗の生育状況は良好で、外見状 SMOV、

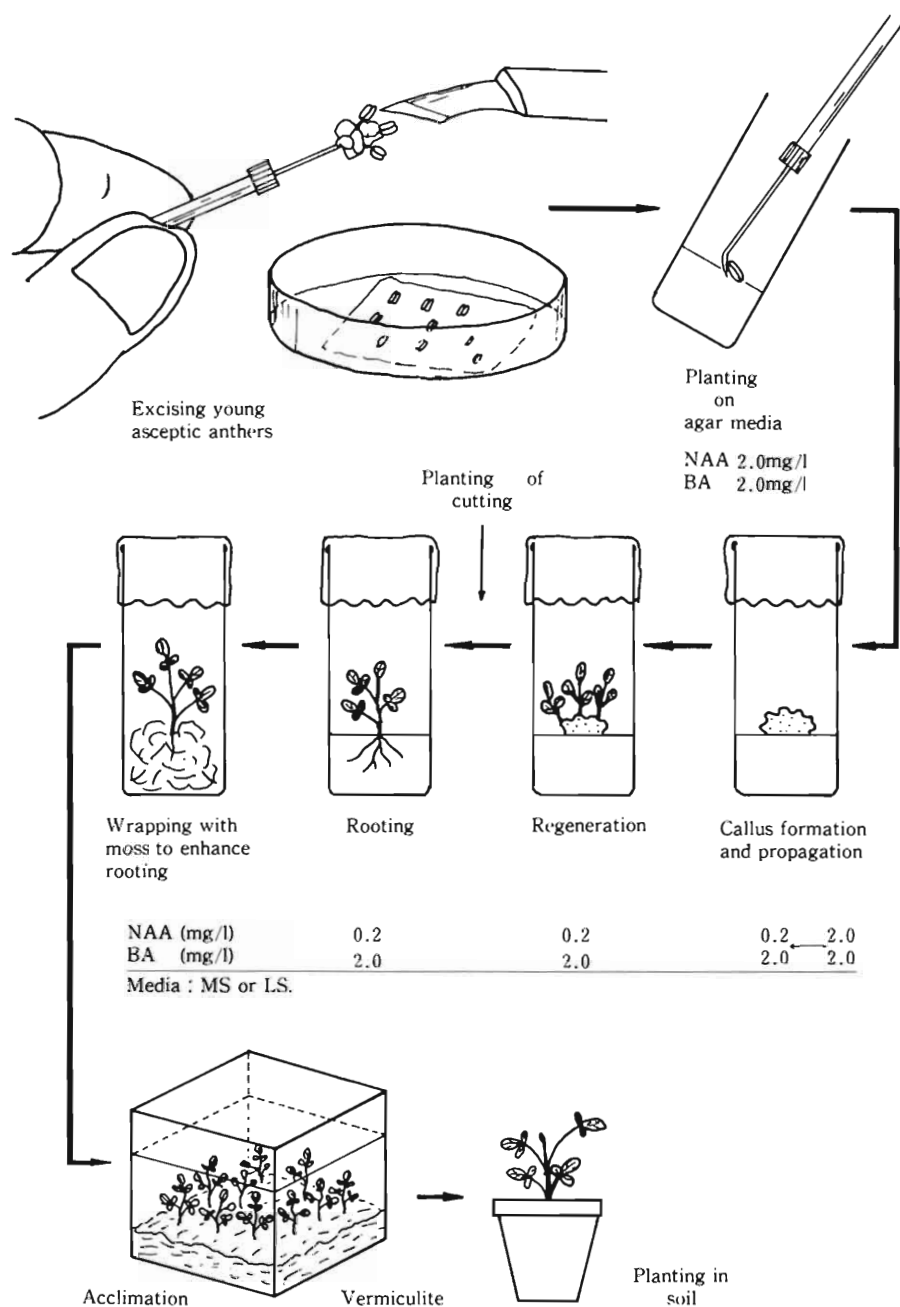


Fig. 7. Schematic sequence for the propagation of young strawberry plants

SVBV, SMYEV, SCrV の感染はないものと考えられるが、今後、指標植物への小葉継ぎ法などにより、ウイルス感染の有無の検定を充分にする必要がある。

以上、従来の諸研究の結果^{2,3)}を確認すると共に、薬培養による幼苗増殖工程を試作した。

摘 要

イチゴ品種宝交早生を用い、ウイルスフリー苗の簡便な大量培養法を開発するための実験を行った。薬を無ウイルス組織として用い、カルス化から植物体再生をへて幼苗生産までの培養諸条件を検討した。カルス化率の高い薬は長さ 1 mm 前後が適当で、MS 又は LS 培地に 蔗糖 30 g/l、寒天 8 g/l、NAA 0.2~2.0 mg/l、BA 0.2~2.0 mg/l を添加した培地上でよくカルス化し、増殖した。また、培地に NAA または BA のどちらかが欠けても、カルス化もカルス増殖もおこらなかった。通気と新鮮培地の不断の補給はカルス増殖を著しく促進すると推定された。カルス塊を NAA 0.2 mg/l+BA 2.0 mg/l で増殖し、次に同一組成の培地へ移植し培養を継続したとき、植物体再生が最も早く豊富に生じた。これらの知見をもとに、薬培養に始る幼苗育成工程を試作した。

引用文献

- 1) S. NISHI and K. OOSAWA: Japan. Agr. Res. Quart. 7, 189-194 (1973)
- 2) S. NISHI, K. OOSAWA, and T. TOYODA: Bull. Veg. Ornam. Crops Res. Station, Japan AI, 1-40 (1974)
- 3) K. OOSAWA, M. TODA, and S. NISHI: Bull. Veg. Ornam. Crops Res. Station, Japan AI, 41-57 (1974)
- 4) R.O. BELKENGREN and P.W. MILLER: Plant Dis. Rep. 46, 119-121 (1962)
- 5) J.R. MCGREW: Phytopath., 55, 480-481 (1965)
- 6) S.J. VAINE: J. Hort. Sci., 43, 293-297 (1968)
- 7) P. BOXUS, M. QUOIRIN, and J.M. LAINE: In "Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture" 130-143, Springer-Verlag, Berlin (1977)
- 8) T. MURASHIGE and F. SKOOG: Physiol. Plant. 15, 473-497 (1962)
- 9) E.M. LINSMAIER and F. SKOOG: Physiol. Plant. 18, 100-117 (1965)
- 10) P.R. WHITE: A handbook of plant tissue culture, Ronald Press, N.Y. (1943)