

イチゴの組織のカルス形成能, カルス生長, および品質間差異

衣川堅二郎*・種坂英次*・岡本昌洋*

Capacity of different tissues of strawberry plants to form callus

Kenjiro KINUGAWA*, Eiji TANESAKA* and Masahiro OKAMOTO*

Synopsis

Virus-free-plants of strawberry (*Fragaria ananassa*) are produced by meristem culture with a special technique, and enough young plants for commercial cultivation have been prepared over the past ten years. To improve the technique, the capacity of the runner-meristem, anther, and filament to form callus, and the growth of the callus obtained, were compared on the MS medium. The three cultivars Nyohou, Toyonoka, and Houkouwase were studied. The anthers of Houkouwase and Nyohou formed callus more readily than their runner-meristems and filaments. Filaments of Toyonoka formed callus more readily than its runner-meristems. In anther cultures, more calli were formed on media containing lower benzyladenine (BA) and higher auxin (NAA or 2,4-D) concentrations, or lower kinetin and lower auxin (NAA or 2,4-D) concentrations. Anther length and its callus-forming capacity were correlated. Most of calli from long anthers stopped growing within eight weeks after the start of culture. Calluses from anthers and filaments grew faster than those from meristems.

I 緒 言

近年, イチゴの収穫用種苗として, 生長点培養法により誘導, 大量増殖された無ウイルス植物が供給されている^{1,2)}. 生長点培養によって, 多くのウイルスを除去し得るが^{3,4,5)}, ウイルス除去率は摘出組織の大きさに依存し, 除去率100%となるには0.4 mm以下の極微小な組織摘出が必要である^{1,6)}. この様に, 生長点の摘出操作には熟練した技術が必要であり, 種苗を農家へ配布するまでの増殖期間に数年を要する²⁾ことなどとともに, 未だ改良の余地は大きい。

本報告ではイチゴの3品種を用い, より効率的な大量増殖法の開発のため, 基礎研究として, ランナー生長点組織, 葯および花糸のカルス形成能, 生じたカルスの生長条件, およびそれらの品種間差異に

ついて検討した。

この研究は, 平成元年度奈良市経済部農林課の委託研究として実施した。

II 実験材料および方法

供試材料は, 奈良市農林課の御助力で入手したイチゴ (*Fragaria ananassa* Duch.) の3品種, 宝交早生, 豊の青および女峰である。供試組織は, ランナー先端の生長点近傍組織, 葯および花糸で, 各組織のカルス形成率, カルス生長と培地条件を調べた。培地は基本的にMS培地⁷⁾を用い, それにショ糖30 g/lを加え0.1 N NaOHまたは0.1 N HClでpH 5.8に調整後, 寒天8 gを加えオートクレーブで1気圧加圧10分間滅菌した。カルス誘導培地は, MS培地に2 ppm NAAと2 ppm BAを加えた。培養は

25±1°C, 3000 lx 連続照明下で行った。また、オーキシンとして NAA と 2,4-D, サイトカイニンとして BA と Kinetin を種々の濃度で加えた培地を用い、それら植物生長調節物質が葯のカルス形成に及ぼす影響を調べた。さらに、生長段階の異なる蕾から葯を摘出し、葯の長さとおカルス形成率との関係を調べた。

各組織は実体顕微鏡下で無菌的・外科的に摘出し、培地に置床した。各組織の滅菌は以下の手順で行なった。

ランナー生長点：ランナーの頂芽部分 (2~3 cm) を水道水で洗浄し、70%エタノールで30秒間、次に2%次亜塩素酸で10分間滅菌した後、生長点近傍組織 (1~1.4 mm 角) を摘出した。

葯：開花前の蕾をランナーの場合と同様に滅菌処理し、針付台に固定して摘出した。

花糸：開花直前の蕾をランナーの場合と同様に滅菌処理し (但し、2%次亜塩素酸処理は3~5分間)、葯の場合と同様に摘出した。

カルスの生長は培養容器の外側から、カルスの縦、横、高さを mm 単位で測定し、それらの積を生長指数として表した。さらに、置床より3週間後のカルスの生長指数を1とし、その後の生長を相対生長として表した。また、生長段階の異なる葯からカルスを誘導すると、中には生長を停止するカルスも現われる。そこで、それぞれのカルスについて生長の持続性を知るため、置床より7日毎に生長指数を測定し、全供試カルス数に占める生長したカルス (前回の測定値よりも大きな生長指数をもつカルス) の割合を求めた。

III 結果および考察

各組織切片からのカルス形成率を Fig. 1 に示した。ランナー生長点のカルス形成率はランナーの発育程度によって異なり、1 cm 以上の長さに展開した葉をつけているランナーの生長点は全くカルス化しなかったため、図には展開葉をつけないか、あるいは1 cm 未満の展開葉を1枚つけているランナーの生長点について結果を示した。生長点のカルス形成率は宝交早生と女峰で、それぞれ37%と40%、豊の青で54%となった。葯 (長さ1.2~1.4 mm) では他の組織よりもカルス形成は良好で、置床切片の56~78%がカルスを形成した ('豊の青' は未調査)。花糸では品種間でばらつきが大きく、宝交早生と女峰で約30%、豊の青で68%がカルスを形成した。カルス形成率は生長点、花糸ともに豊の青で最も高く、宝交早生、女峰では同程度であった。この結果は、カルス形成能に品種間差異が存在する事を示唆している。

組織間で最もカルス形成能の高かった葯について、オーキシン (NAA, 2,4-D) とサイトカイニン (BA, Kinetin) の組合せの違いがカルス形成に及ぼす影響を Fig. 2 に示した。材料として宝交早生の長さ1.2~1.4 mm の葯を用いた。サイトカイニンとして BA を添加すると、組合せたオーキシンの種類にかかわらず、BA 濃度が低く、オーキシン濃度が高いほどカルス形成率は高くなり、0.2 ppm BA+2.0 ppm オーキシンの組合せで最高値を示した。一方、サイトカイニンとして Kinetin を添加すると、組合せたオーキシンの種類にかかわらず、Kinetin 濃度が高く、オーキシン濃度が低いほどカルス形成率は

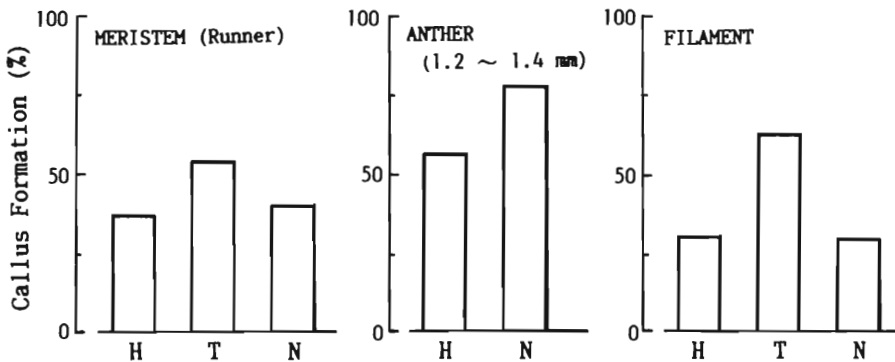


Fig. 1. Rate of callus formation in three different tissues of three strawberry cultivars; Houkouwase (H), Toyonoka (T) and Nyohou (N).
Medium: MS+2 ppm NAA+2 ppm BA.

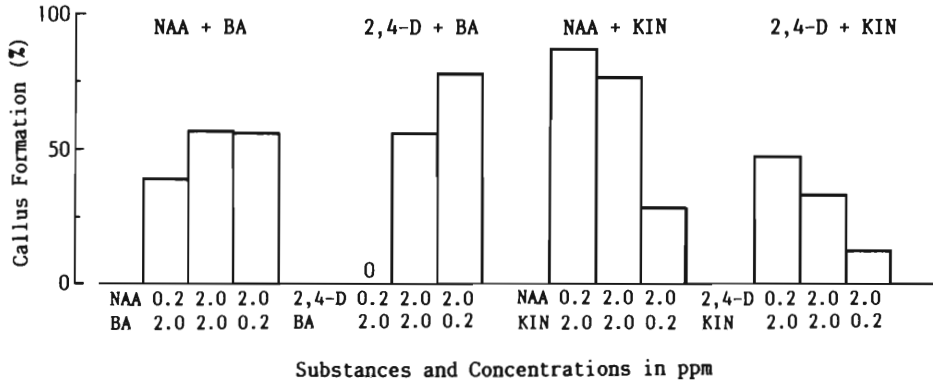


Fig. 2. Effects of auxins and cytokinins in culture medium on callus formation from anther (1.2-1.4 mm long).
KIN: kinetin. Cultivar: Houkouwase.

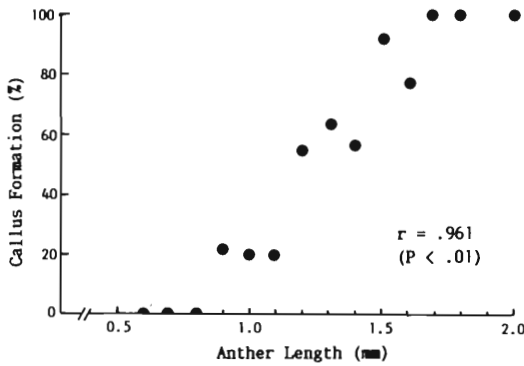


Fig. 3. Dependence of the rate of callus formation on the length of anthers. Each value of measurements of 5 to 41 explants.
Cultivar: Houkouwase.
Medium: MS+2 ppm NAA+2 ppm BA.

高くなり、2.0 ppm Kinetin+0.2 ppm オーキシンの組合せで最高値を示した。この結果は、オーキシンを含むカルス誘導培地でのサイトカイニンの選択には留意すべき事を示している。

置床した葯の長さでカルス形成率との関係を Fig. 3 に示した。品種は宝交早生を用いた。両者は正の相関関係にあり ($r = .961, P < .01$)、葯の生長と共にカルス形成率は増加し、1.8 mm 以上になると全ての葯がカルスを形成した。また、葯の生長に伴うカルス形成率の増加は不連続で、今回の培養では、葯の長さが0.6~0.8 mm のときカルスは生ぜず、0.9 mm, 1.2 mm, および1.5 mm に達するとカルス形成率はそれぞれ、20%, 50~60%, 80~100%

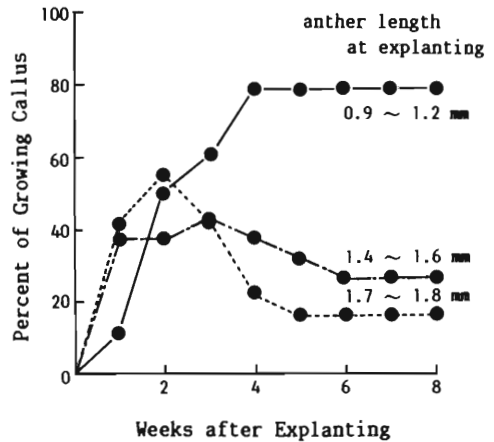


Fig. 4. Relationship between anther length and callus that continues to grow.
Cultivar: Nyohou
Medium: MS+2 ppm NAA+2 ppm BA.

と階段状に増大した。0.8 mm の葯ではすでに減数分裂は完了しているが、花粉粒はその後、1核期、2核期を経て成熟する。このような花粉の生長段階と葯のカルス形成率の不連続な増加との間に、何らかの関係があるのかもしれない。

置床時の葯の大きさ(発達の違い)とカルスが生長を持続する性質との関係を Fig. 4 に示した。品種は女峰を用いた。長さ1.7~1.8 mm の葯から生じたカルスは、切片置床後2週間して、前回の測定にくらべ生長したことの明らかなカルスの数は全体の約55%を占めていたが、その後、生長を続けるカルスは徐々に減少し、5週目からは16%が8週目まで生

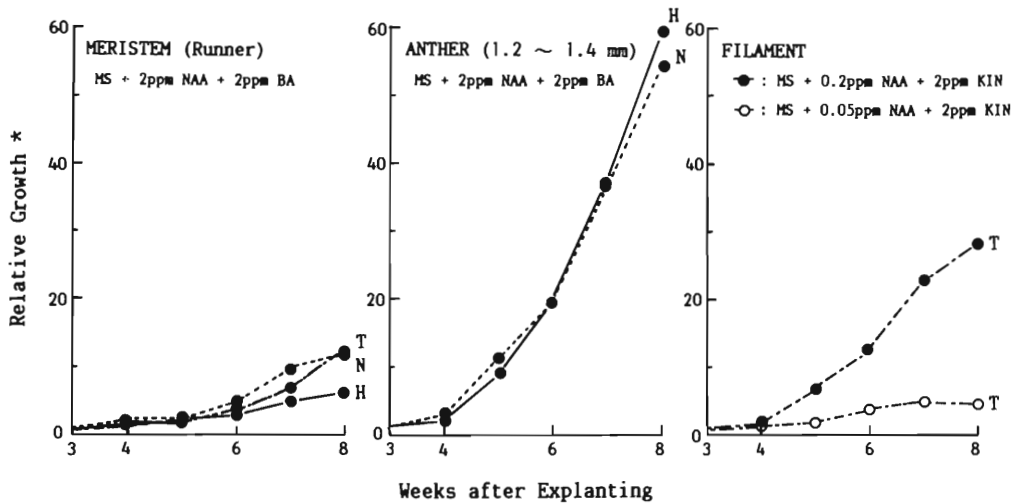


Fig. 5. Growth of callus induced from different tissues of three cultivars; Houkouwase (—H), Toyonoka (---T) and Nyohou (-----N).

*: Relative growth represents the ratio of volume of callus to that at 3 weeks after being explanted.

長を持続した。1.4~1.6 mm の葯から生じたカルスは、同様に2週目には約40%が生長していたが、生長を持続したカルスは6週目以後約30%となった。一方、0.9~1.2 mm の葯に由来するカルスでは、4週目以後も79%のカルスが安定した生長を続けた。以上の結果が示すとおり、小さな葯よりも生長した葯で高いカルス形成能を示すが、生長した葯由来カルスにおいて生長を持続するものの割合が低かった事を考慮すると、カルスの大量増殖においては長さ1.2~1.4 mm (蕾長: 約5~6 mm) の葯の使用が適当と考えられる。

異なる組織から由来したカルスの生長を Fig. 5 に示した。生長は置床より3週間後のカルスの体積を1とする相対生長で表した。由来した組織が異なると、カルス生長にも大きな差がみられた。8週間後の相対生長は、ランナーの生長点由来カルスでは6~12、葯では53~59に達し、後者は前者の5~10倍の値を示した。また、花糸由来カルスの生長は培地に添加したホルモンの濃度によって異なり、0.05 ppm NAA + 2 ppm Kinetin 区では6週以後の生長は停滞したが、0.2 ppm NAA + 2 ppm Kinetin 区では順調に生長を続け、8週間後の相対生長は前区のその6倍に達した。カルスの生長にはカルス形成率とは異なり、明瞭な品種間差はみられなかった。

本実験では、カルス形成能に品種間差異が存在することを示した (Fig. 1)。カルス形成能や植物体再生能における品種間差異の存在は、イネ科主要作物

ではトウモロコシ⁸⁾、エンバク⁹⁾、オオムギ¹⁰⁾等で見られる。また、トマトでは、植物体再生能が2つの主働遺伝子で支配されていると報告されている¹¹⁾。本実験において、組織が異なっても品種間で同様なカルス形成能の差異が表れた事は、イチゴのカルス形成能における少数の主働遺伝子の存在が示唆される。

種苗の大量増殖においては、再生個体の遺伝的変異を小さく、あるいは無くすることが必要である。しかし、カルスからの再生個体は、カルスの由来が体細胞であっても生殖細胞であっても、倍数体、異数体あるいは点突然変異個体を含む^{9,12)}。これらの出現頻度は種、品種、または培地組成によっても異なる¹²⁾。一方、葯培養は遺伝学的、育種的な興味から半数体作出を目的とする場合が多い。しかし、葯培養カルスは小孢子(花粉)に由来する場合も、葯壁に由来する場合もあり、中には染色体倍化細胞等を含み、しばしば2倍体から高次倍数体植物を再生する^{1,13)}。イチゴ属では、*F. virginiana* (2n=56) の葯培養で2n個体を再生している¹⁴⁾。半数体は植物体の矮小化や環境低抗性の劣化を伴うが、本研究室で得られた再生個体では染色体数の調査を行っていないものの、その様な現象はみられず、2n個体である可能性が大きい。

生長点培養はイチゴの多種のウイルスを除去し得る^{3,4,5)}。しかし、ウイルスの除去率は摘出組織の大きさに依存し、摘出組織が0.2~0.4 mm では除去

率100%であるのに，0.5～1.0 mmでは0～50%となり^{1,6)}，この微小な生長点の摘出には熟練した技術が要求される。一方，葯や花糸は摘出が容易で，1つの蕾から10本以上の摘出が可能である。カルスを経た再生個体の変異性についてはなお検討を要するが，葯や花糸はカルス形成能，カルス生長も良好で，無ウイルス性である可能性も高いため，種苗の大量増殖用の組織素材として有望であろう。

引用文献

- 1) PH. BOXUS, M. QUOIRIN, and J.M. LAINE: in "Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue, and Organ Culture" (J. REINERT and Y.P.S. BAJAJ, ed.) 130-143 Springer-Verlag, Berlin (1977)
- 2) 鈴木柳子: "昭和59年度技術情報調査報告書—急速大量増殖及びクローン増殖における組織培養技術の応用" 70-72 (1985)
- 3) R.O. BELKENGREN and P.W. MILLER: *Plant Dis. Rep.* 46, 119-121 (1962)
- 4) J.R. MCGREW: *Phytopathology*, 55, 480-481 (1965)
- 5) S.J. VAINE: *J. Hort. Sci.*, 43, 293-297 (1968)
- 6) S. NISHI and K. OOSAWA: *Japn. Agr. Res. Quart.*, 7, 189-194 (1973)
- 7) T. MURASHIGE and F. SKOOG: *Physiol. Plantarum* 15, 473-497 (1962)
- 8) M. NESTICKEY, F.J. NOVAK, A. PIOVARCI, and M. DOLEZELOVA: *Z. Pflanzenzucht.*, 91, 322-328 (1983)
- 9) 森川利信・染森由起子・平知明: 近畿作育研究, 33, 20-23 (1988)
- 10) W. POWELL and J.M. DUNWELL: *Heredity*, 58, 75-80 (1987)
- 11) M. KOORNNEEF, C.J. HANHART, and I. MARTINELLI: *Theor. Appl. Genet.*, 74, 633-641 (1987)
- 12) F. D'AMATO: in "Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue, and Organ Culture" (J. REINERT and Y.P.S. BAJAJ, ed.) 343-357 Springer-Verlag, Berlin (1977)
- 13) J.M. DUNWELL; in "Plant cell culture" (R.A. Dixon, ed.) 21-36 IRL Press, Oxford (1985)
- 14) P. ROSATI, M. DEVREUX, and U. LANERI: *HortSci.*, 10, 119-120 (1975)