

## 茎頂部の腋芽増殖によるイチゴの効率的な大量増殖

藤本まなみ・浅尾浩史・小島博文・小玉孝司

## Efficient Micropropagation of Strawberry

## Using Axillary Buds from a Meristem plantlet

Manami FUJIMOTO, Hiroshi ASAO, Hirofumi KOBATAKE and Takashi KODAMA

## Summary

Healthy strawberry plants propagated by runners are being distributed in Nara Prefecture. In vitro micropropagation system using axillary buds was investigated in order to enhance the efficiency of this work.

1. Linsmaier and Skoog's solid medium without hormone was suitable for the initial culture.
2. A meristem plantlet cultured for 45-60 days was placed on the micropropagation medium. Linsmaier and Skoog's medium containing 6-benzylaminopurine (BAP) 0.5mg/l+kinetin (KIN) 1.0mg/l was the most suitable medium for this purpose. After 30-40 days, the number of effective axillary buds was increased by at least 20 times.
3. For rooting from axillary buds, 1/2 Linsmaier and Skoog's medium without auxin was more suitable than that with auxin. After 15-20 days, roots had regenerated sufficiently for acclimation.
4. Adapting this method, one meristem plantlet should be able to produce 8000 plantlets through 3 propagations.

Key Words: strawberry, micropropagation, axillary bud

## 緒 言

奈良県では、昭和49年以来イチゴ優良原々種育成事業により、毎年農業試験場高原分場から約6,000本の無病優良苗を産地の増殖団体へ有償配布している。現在、ランナー繁殖によって苗を増殖しているため、広面積の施設を要し、またウィルス病・萎黄病等の再感染を防ぐため厳重な管理と細心の注意が必要である。この労力的・精神的負担を解消するためにもより安全で効率的な大量増殖法の確立が望まれている。

栄養繁殖性植物の効率的な大量増殖としては、大澤ら<sup>6-8)</sup>によって、茎頂カサの分割片から茎葉を分化させるカリクロン植物誘導法が、イチゴ・サトイモ・ニンニク等多くの植物で試みられている。しかし、カリクロン植物は、変異し易いので実用上問題がある。この変異性を回避する方法として、Boxus<sup>1)</sup>、藤重ら<sup>3)</sup>は茎頂由来植物から多数の腋芽を誘導する増殖方法を試みて、好結果を得ている。そこで筆者らは従来のランナー増殖法に比べて再汚染の

心配がなく、効率的なイチゴの大量増殖法として茎頂培養による腋芽増殖法について、より効率的な増殖・育成条件を検討したので、その結果を取りまとめて報告する。

## 実験材料および方法

## 1. 実験材料および殺菌方法

供試材料として、農業試験場高原分場で維持している宝交早生の無病株 (K-35) を用いた。そのランナーの先端部を80%エチルアルコールに数秒浸漬した後、有効塩素濃度1%の次亜塩素酸ナトリウム溶液に15~20分間浸漬殺菌し、さらに、滅菌した水道水で3回洗浄して供試した。

基本培地濃度およびホルモン添加試験では、1986年5月初旬に茎頂組織を0.3~0.5mmの大きさに摘出して供試し、固体(寒天)培地と液体培地の比較試験では、同年5月下旬に2~5mmの大きさに摘出して下記により培養した。

## 2. 茎頂組織の初期培養条件の検討

供試培地は、Linsmaier & Skoog(LS)の培地 (基本培地) に、ショ糖3%、寒天0.7%を加え、pH 5.6~5.8に調整し、18mm $\phi$ ×105mmの試験管に5mlずつ分注した後、オートクレーブ(1kg/cm<sup>2</sup>・15分間)で滅菌して、以下の実験に供した。

基本培地濃度試験は、LS培地とこれを2倍に希釈した培地(以下1/2LS培地)に15個ずつ茎頂組織を置床し、培養7日目・20日目・2か月目の生育状況を調査した。

固体培地と液体培地の比較試験は、基本培地に寒天を加えたものを固体培地とし、加えないものを液体培地とした。液体培地に10個、寒天培地に15個の茎頂組織を置床し、培養40日目に茎頂組織の生育状況を調査した。なお、液体培地では、ペーパーブリッジ法によって置床組織が培地中に沈み込まないように維持した。

ホルモン添加試験は、LS培地とLS培地に6-ベンジリアミノプリン(BAP) 0.5mg/l + カイネチン(KIN) 1.0mg/l を添加した培地を用いて行った。各々の培地に15個ずつ茎頂組織を置床し、培養7日目・20日目・2か月に茎頂の生育状況を調査した。

## 3. 大量増殖培地の検討

供試材料として、あらかじめ茎頂を培養して茎葉分化した個体をさらに、BAP 0.5mg/l と KIN 1.0mg/l を添加したLS培地で増殖・育成して腋芽塊となったものを1芽づつに分割して用いた。増殖培地としてBAP 1.0mg/l、BAP 0.5mg/l + KIN 1.0mg/l、4-ピリジルフエニル尿素(4PU:協和発酵) 1.0mg/l をそれぞれ添加したLS培地を用い、その培地を100mlずつ分注した培養瓶(容量:500ml)に腋芽を3個ずつ置床した。培養は25℃、16時間照明で27日間行った。増殖状況調査は、1培養瓶に置床した3腋芽の中から平均的に増殖したと思われる腋芽塊を選び出し、その腋芽発生数および重量を調べた。

## 4. 発根培地の検討

供試材料として、前項で2回腋芽増殖を繰り返した茎葉分化個体を用いた。ホルモン試験には、1/2LS培地としてナフタレン酢酸(NAA)を0.05mg/l、0.1mg/l、インドール-3-酢酸(IAA)を0.05mg/l、0.1mg/lそれぞれ添加した培地とホルモン無添加の培地の5種類を用いた。糖濃度試験には、1/2LS培地(糖分1.5%)

と糖分だけを3%に調整した1/2LS培地の2種類を用いた。培養は25℃、16時間照明下で行い、発根調査は置床後19日目に根長を測定した。

## 結 果

### 1. 茎頂組織の初期培養培地の検討

培地成分濃度による茎頂組織の初期生育は、培養20日目には多少LS培地の方が1/2LS培地に比べて優ったが、2か月目には共によく生育し、培地濃度による差は見られなかった(第1表)。さらにLS培地を用いて、固体(寒天)培地と液体培地における茎頂組織の初期生育を比較したところ、両培地とも1個の茎頂組織から1個の茎葉が伸長したが、固体培地は液体培地に比べ、葉色が濃く、良好な生育を示した(第2表、図版1)。

第1表 イチゴ茎頂組織の初期生育に及ぼす培地成分濃度の影響

Table 1. Comparison between LS and 1/2LS medium of meristem in the initial stage.

培地	茎 葉 伸 長 (mm)		
	培養7日	同20日	同2か月
LS <sup>1)</sup>	0.70	2.1	5.7
1/2LS	0.73	1.5	5.5

1) Linsmaier & Skoog 培地

第2表 イチゴ茎頂組織の初期生育における固体培地と液体培地との比較

Table 2. Comparison between liquid and solid (agar) medium of meristem in the initial stage.

培地	培養40日目の 茎葉伸長(mm)
LS固体 <sup>1)</sup>	15.3
LS液体 <sup>2)</sup>	6.0

1) 寒天培地

2) ペーパーブリッジ法

茎頂組織の初期生育に及ぼすサイトカイニンの影響をみると、培養7日目には、BAP 0.5mg/l + KIN 1.0mg/l 添加培地と無添加培地の間で、茎頂組織の生育の差はほとんど認められなかった。培養20日目には、添加

第 3 表 イチゴ茎頂組織の初期生育に及ぼすホルモン添加の影響

Table 3. Effect of cytokinin on meristem culture in the initial stage.

培地	培養7日目		同20日目		同2カ月目	
	茎頂組織の大きさ(mm)	芽数(個)	茎頂組織の大きさ(mm)	芽数(個)	茎頂組織の大きさ(mm)	芽数(個)
LS培地	0.70	1	2.1	1	5.9	1
BAP 0.5 mg/ℓ + KIN 1.0 mg/ℓ 添加 培地	0.78	1	1.8	1	5.0	29

第 4 表 イチゴの腋芽増殖に及ぼすサイトカイニンの影響

Table 4. Effects of cytokinin on micropropagation of axillary buds using a meristem plantlet.

添加ホルモン <sup>1)</sup>	調査個体数	腋芽発生数 <sup>2)</sup>	腋芽数/1個体	重量(g)	重量(g)/1腋芽
BAP 1.0 mg/ℓ	3	106	35.3	7.5	0.071
BAP 0.5 mg/ℓ +KIN 1.0 mg/ℓ	3	145	48.3	13.1	0.090
4PU 1.0 mg/ℓ	3	77	25.6	5.0	0.065

1) 基本培地：LS培地

2) 培養27日目

培地に置床した茎頂組織は、基部が肥大、膨潤し、黄緑色を呈していたが、無添加培地に置床した茎頂組織は濃緑色を呈し、縦方向の伸長を示して基部の肥大は認められず、葉が1枚だけ伸長する傾向を示した。培養45日目には、無添加培地に置床した個体は多くの芽が分化し、多芽体を形成した(第3表, 図版2)。この多芽体を小さく分断し、1/2 LS培地に置床したところ、芽は順調に生育し、多くの幼植物体が得られたが、塊状のまま1/2培地に移植したものは移植19日目にも発根が認められず、茎葉の生育も分割したものに比べると劣った。

## 2. 大量増殖培地の検討

茎葉分化個体をもとに大量増殖培地について、LS培地を基本培地として、そこに添加するサイトカイニンの種類と量を検討した。その結果、BAP 0.5 mg/ℓ + KIN 1.0 mg/ℓ 添加培地は、発生腋芽数・重量ともBAP 1.0 mg/ℓ または4PU 1.0 mg/ℓ 添加培地に比べて

高い値を示し、培養27日目で1個体から48.3個の腋芽が得られた。外観に関してはBAPおよびBAP+KIN添加培地で増殖させた個体はともに生育が良好で、葉色は緑色であったが、4PU添加培地で増殖させた場合は淡緑色を呈し、茎の太さに比べて葉が著しく小さかった。(第4表, 図版3, 4, 5)。

## 3. 発根培地の検討

前項で増殖した茎葉分化個体の発根培地を1/2 LS培地を基本培地として検討した。その結果、ホルモン無添加培地に置床した個体は、カルスを形成することなく発根し、発根の開始がNAAとIAA、各0.05 ml、0.1 ml添加培地に置床した場合よりも早かった。またホルモン添加培地に移植した個体は、いずれも基部にカルスを形成し、発根が遅れた。とくに、NAAはカルス化の傾向が強かった。培養19日目の調査によると根の生育は、ホルモン無添加培地に置床したものが最も優れ、次

いで IAA 0.05 mg/ℓ、0.1 mg/ℓ 添加培地で NAA は 0.05 mg/ℓ、0.1 mg/ℓ 添加培地とも劣った (第5表, 図版6, 7)。また 1/2 LS 培地において、糖濃度による発根の差は、糖濃度 1.5% と 3.0% の培地の間では認められなかった。しかし 3.0% に置床した個体は、1.5% に置床したものに比べ植物体にアントシアン様の赤味がやや強く現れた。

第 5 表 茎葉分化個体の発根に及ぼすオーキシンの影響

Table 5. Effect of auxin on rooting from axillary buds.

添加ホルモン <sup>1)</sup>	平均最長根長 (cm) <sup>2)</sup>
無添加	2.5
NAA 0.1 mg/ℓ	0.5
NAA 0.05 mg/ℓ	0.6
IAA 0.1 mg/ℓ	1.5
IAA 0.05 mg/ℓ	1.2

1) 基本培地：1/2 LS 培地

2) 培養 19 日目

## 考 察

イチゴ茎頂の初期培養には、LS 培地が良好であり、その効果は 2 倍に希釈してもほとんど変らなかつた。そこで、ホルモン添加の有無による茎頂の伸育について検討したところ、BAP 0.5 mg/ℓ + KIN 1.0 mg/ℓ 添加区では、組織が膨潤となり、小さな芽が分化して多芽体を形成した。これは茎頂細胞の異常な増殖とも考えられ、その変異性については詳細な検討が必要である。一方、ホルモン無添加区では、茎頂 1 個から 1 個の植物体しか再生されなかつたが、伸育や葉色とも前記のホルモン添加区に比べて良好であった。また、培地の性状については、固体 (寒天) 培地がペーパーブリッジ法による液体培地より良好であった。

これらのことから、茎頂の初期培養には、高山ら<sup>9)</sup>や静岡農試がホルモン無添加 MS 培地、1/2 MS 培地を採用して好結果を得ていることからみて、また変異性の面からもホルモン無添加 LS 寒天培地が有効と考えられる。

つぎに、茎葉分化個体をもとにした大量増殖法として、サイトカイニンの種類や量をかえて休眠している腋芽の覚醒を促し、多数の腋芽を発生させる方法について検討した。

この腋芽増殖法については、Boxus<sup>1)</sup>が 1974 年に BAP 1.0 mg/ℓ を添加した MS 培地を用いて、多数の腋芽を誘導して大量の幼植物を増殖したと報告している。わが国では、藤重ら<sup>3)</sup>が近年、Hyponex 培地に BAP 0.5 mg/ℓ + KIN 1.0 mg/ℓ を添加して 1 個体当たり約 23 の腋芽を得てその有効性を見出している。また、高山ら<sup>9)</sup>はサイトカイニンとして 4PU 1.0 mg/ℓ を添加した MS 培地で多数の芽を分化させるのに成功している。

本実験においても、前記のいずれのホルモン添加 LS 培地でも茎葉分化個体から腋芽がよく発生した。中でも、BAP 0.5 mg/ℓ + KIN 1.0 mg/ℓ 添加 LS 培地は、腋芽数・重量とも優っており、1 個当たり 48.3 個の腋芽が得られ、また、それぞれの茎葉の伸長・葉色がよかつたのでイチゴの大量増殖培地として適していると考えられる。

一般に、オーキシンは、低濃度で発根を促進するといわれ、イチゴに関しても、インドール-3-酪酸 (IBA) がその発根を促進するとの報告<sup>2)</sup>がある。しかし、本実験において、基本培地に 1/2 LS 培地を用いて、ホルモン無添加とオーキシンとして IAA と NAA の低濃度添加とを比較したところ、添加は基部にカルスを発生させ発根の促進効果は認められず、無添加の方が良い結果を得た。藤重<sup>3)</sup>らや岡山<sup>5)</sup>らもイチゴの発根用培地としてはホルモン無添加の方がよいと報告している。これらの同じ植物でのオーキシン効果の違いは、オーキシンの種類や、用いたイチゴの品種、植物体の大きさや状態などによる内生ホルモンレベルの差異など培養条件の違いによるものと考えられる。

以上の結果から、この方式で得られる有効腋芽数は約 30 日間で最低 20 倍になり、増殖を 3 回繰返せば、1 茎頂より 8,000 個体が得られることになる (第 6 表)。現在、奈良農試高原分場でランナーを増殖し、毎年 6,000 株の原々苗を県下に配布しているが、この方式によると 1 茎頂から 3 回増殖することで、十分カバーできる。したがって、本方式はイチゴの効率的な大量増殖法として有効であると考えられる。しかし、本方式は変異性が非常に少ないものと考えられるが、その変異性については、十分に考慮しなければならない。今後、培養株の生育調査や生産力検定を行い、その安全性を確認した上で本方式をイチゴ大量増殖の実用技術として確立したい。

第 6 表 イチゴ無病苗の大量増殖方式

Table 6. Micropropagation system of healthy strawberry plants.

増殖回数	増殖用原株数	増殖段階 <sup>1)</sup>	増殖株数	鉢上げまでに <sup>2)</sup> 要する日数
1	360	×20	7,200	130
2	18	×20 → 360 → ×20	7,200	170
3	1	×20 → 20 → ×20 → 400 → ×20	8,000	210

1) 1回の増殖率：20倍      2) 茎頂摘出からの日数

摘 要

奈良県で現在実施されているイチゴ優良原々種育成事業を、より効率的に行うために、腋芽増殖による大量増殖法について検討した。

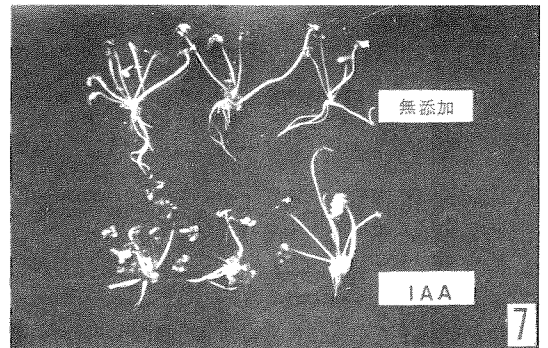
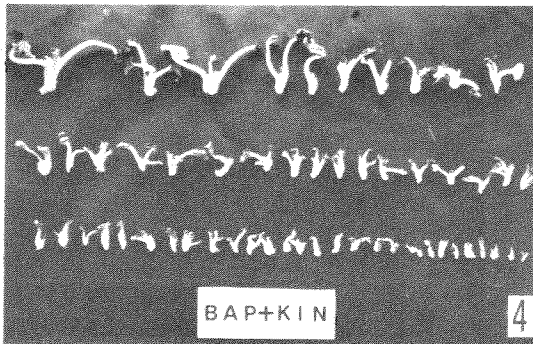
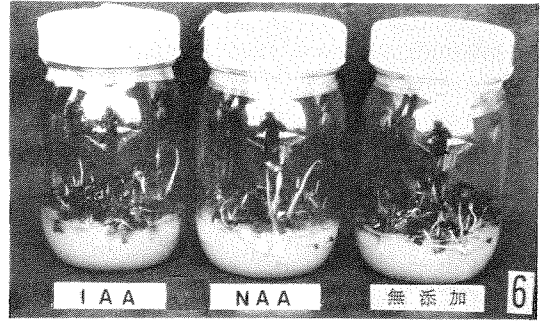
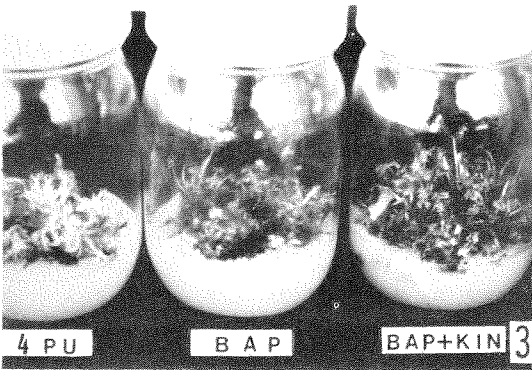
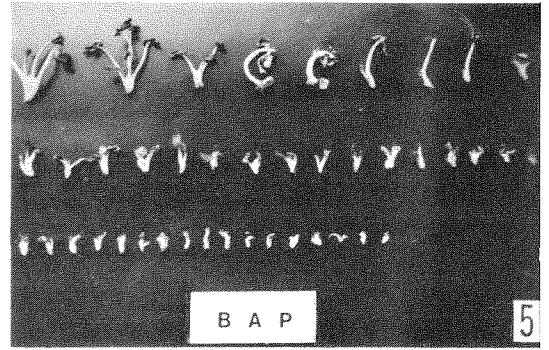
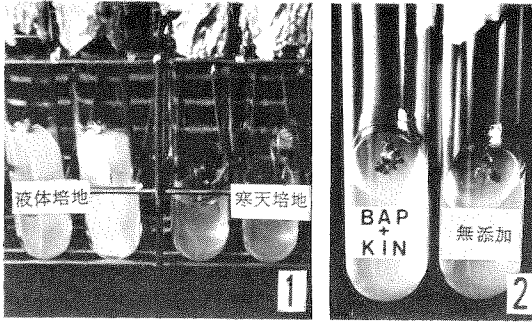
1. 初期培養には、ホルモン無添加LS固体（寒天）培地が良好であった。
2. 茎葉分化個体をもとにした大量増殖培地としては、BAP 0.5 mg/l + KIN 1.0 mg/l 添加したLS培地が最適であり、27日の増殖で1個体当たり48.3個の腋芽数を得た。
3. 腋芽からの発根には、オーキシンを添加した1/2 LS培地よりもホルモン無添加の1/2 LS培地の方が良好であり、移植後15～20日で順化できるまでに発根した。
4. 以上の結果をもとにした腋芽増殖法によると、1茎頂を3回増殖することによって210日で8,000個体のイチゴが得られ、本県のイチゴ優良原々種育苗育成事業に必要な苗数に十分達することができるものと考えられる。

組織培養による大量増殖苗の原苗としての利用、第2報 大量増殖培地と増殖率の検討、園学要旨、昭59春：240—241。

4. Linsmaier, E.M. and F. Skoog. 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* **18**: 100—127.
5. 岡山健夫・大沢勝次・1984. 組織培養によるイチゴ、サトイモの大量増殖・奈良農試研報**15**；1—9.
6. 大沢勝次・山川邦夫・西貞夫 1973. イチゴの組織培養に関する研究。第2報、生長点組織の脱分化・再分化によるウイルスフリー株大量増殖技術について、園学要旨、昭48春：200—201.
7. ———・1980. 栄養繁殖性作物における無菌苗の作出技術、農及園**55**：199—206.
8. ———・栗山尚志・菅原祐幸 1981. 組織培養による栄養繁殖性野菜の大量増殖と利用に関する研究、1. 植物体の大量誘導に及ぼす培養部位及び培地組成の影響、野菜試報告、**49**：1—46.
9. 高山真策・元川寛子・天羽孝子・深野真弓・大沢勝次 1985. ジャーファーマンターによる大量繁殖法の確立、園学要旨、昭60春：220—221.

引 用 文 献

1. Boxus, P. 1974. The production of strawberry plants by in vitro micropropagation. *J. Hort. Sci.* **49**: 209.
2. ———, C. Damiano and E. Brasseur. 1984. Strawberry. Ammirato, P.V. et al. edit. *Handbook of plant cell culture*, vol. 3. Macmillan. 453—486.
3. 藤重宣昭・市川清・横田一郎 1984. イチゴの茎頂組



図

版

plate

1. 液体培地と固体（寒天）培地での茎頂の初期生育。
  2. サイトカイニン添加の有無による茎頂の初期生育。  
左：BAP 0.5 mg/ℓ + KIN 1.0 mg/ℓ，右：ホルモン無添加。
  3. サイトカイニン添加による腋芽増殖。左：4 PU 1.0 mg/ℓ，中央：BAP 1.0 mg/ℓ，右：BAP 0.5 mg/ℓ + KIN 1.0 mg/ℓ。
  4. BAP 0.5 mg/ℓ + KIN 1.0 mg/ℓ 添加LS培地で1個体から増殖された腋芽。
  5. BAP 1.0 mg/ℓ 添加LS培地で1個体から増殖された腋芽。
  6. オーキシンの有無による幼植物体の発根。左：IAA 0.05 mg/ℓ，中央：NAA 0.05 mg/ℓ，右：ホルモン無添加。
  7. IAA添加の有無による発根状況。上：無添加，下：IAA 0.1 mg/ℓ。
1. Comparison between the liquid LS medium and the solid (agar) medium of meristem culture in the initial stage.
  2. Effect of cytokinin on meristem culture in the initial stage.
  3. Effect of LS medium containing cytokinin on micropropagation of axillary buds using a meristem plantlets.
  4. Axillary buds separated from a cluster of multiple buds.
  5. The same as above.
  6. Effect of auxin on rooting from axillary buds.
  7. Effect of IAA on rooting.