

## イチゴにおける組織培養作業簡略化の可能性

我 妻 尚 広

### Tissue Culture Work in Strawberry (*Fragaria ananassa* Duchesne) Production Evaluated from the Standpoint of Labour Reduction

Takahiro WAGATSUMA  
(June 1999)

#### 緒 言

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<sup>1,5,6)</sup>。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。すなわち、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、北海道であっても西南暖地や関東周辺などの主要産地と同様な増殖効率を得られる。しかし、組織培養では培地の褐変、養分の枯渇による同種培地への移植や生育段階に応じた異種培地への移植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の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。これまでに筆者は培養時の茎頂生長の季節的変化<sup>9)</sup>や組織培養の作業分散<sup>8,10)</sup>に関する研究を行い、イチゴの組織培養の効率化を図った。

本報告では、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<sup>7,2,4)</sup>がある。そこで、本実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

##### 1. 供試植物

幌加内町農業研究センター圃場で栽培しているイチゴ (*Fragaria ananassa* Duchesne) 品種 ‘ベルルージュ’ の 20~30 cm に伸長し、先端の子葉が展開していないランナーから茎頂を摘出し培養した。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 0.2~0.5 mm の大きさに調整した。培地は Hyponex 修正培地<sup>10)</sup> を用い、pH は 5.8 に調節した。培養は 25℃、2,000 lm/m<sup>2</sup>、16 時間照明で 12 週間行い、幼植物(草丈 10 mm、葉数 3~4 枚)を得た。

##### 2. 大量増殖作業に関する実験

前述の方法で得られた幼植物からの多芽体を、生長調節物質 BAP (6-benzylaminopurine) 0.5 mg l<sup>-1</sup> と Kin (kinetin) 0.1 mg l<sup>-1</sup> を添加した Hyponex 修正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. 1)。滴下法で用いた生長調節物質の量は、慣行法の 1 容器に添加した量 (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、幼植物のクラウン部に 0.1 ml ずつ滴下した。これらの生長調節物質溶液は、滴下前に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 μm) でろ過滅菌した。25℃、2,000 lm/m<sup>2</sup>、16 時間照明で 6 週間培養し、増殖個体数と増殖した個体の展開葉数、草丈を調査した。

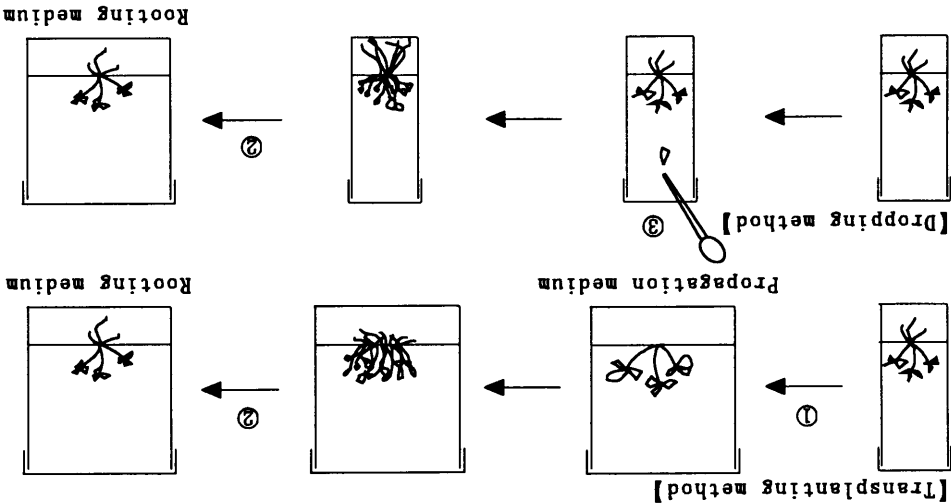


Fig. 1 Comparison of mass-propagation methods for strawberries  
① Root pruning and transplanting  
② Dividing and transplanting  
③ Dropping of growth regulators to crown

順化後1本ずつに分割して6cm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、培土にはバーミキュライトを用いた。発根率、発根数および順化率 (順化過程での生存率) について調査した。

これらの実験で得られた苗について、前述の大量増殖作業に関する実験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。各測定値について Duncan の範囲検定を行った。

### 結果および考察

#### 1. 大量増殖に関する実験

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に比較し1/4倍で減少したものの、他区では同等か増加する傾向が認められた。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。草丈は慣行法に対し、2倍区では高くなったが、他区では低

くなった (Table 1)。

Fig. 3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)では小葉の变形や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。

さらに、これらの処理で得た幼植物を分割して、

無機塩類濃度を1/2としたMS基本培地<sup>9)</sup>に移植し、発根後6cmポリエチレン製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90cm×25cmの高畝1条植えとし、白黒マルチ<sup>10)</sup>を使用した。定植の10日前に燐硝安加里NS262(N:12, P:16, K:12)を30kg/10a、有機化成S708(N:7, P:10, K:8)を120kg/10a施した。越冬前の1994年10月15日に展開葉数、草丈、クワ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。また、各測定値について Duncan の範囲検定を行った。

#### 3. 順化作業に関する実験

前述の方法で得られた幼植物を断根し、BAP 0.5 mg l<sup>-1</sup> と Kin 0.1 mg l<sup>-1</sup> 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. 2に示すように、供試材料からシュートを1本ずつ分割し1/2 MS培地に移植し、発根後6cm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、1/2 MS培地に多芽体を直接移植し、発根後6cmポリポットに分割移植した無分割区 (No-divide) と多芽体の分割や発根培地への移植を行わず、直接バーミキュライト (深さ約5cm) の入った育苗箱 (36×45×10 cm) に移植・順化し、

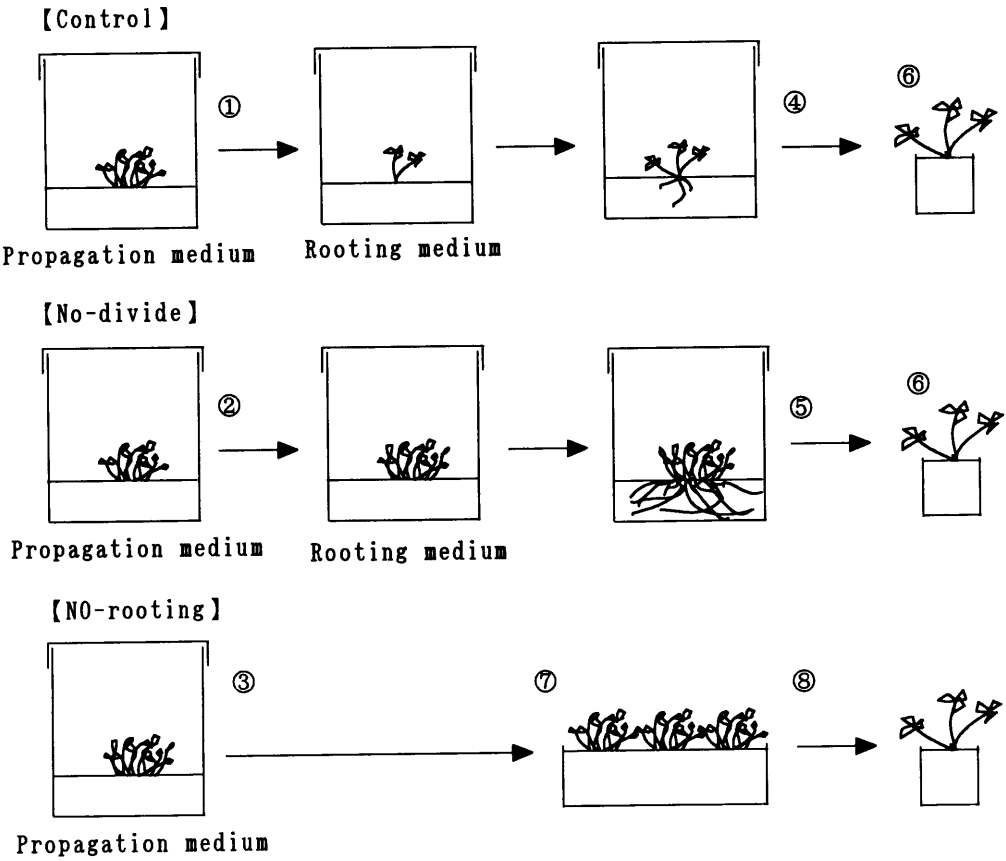


Fig. 2 Comparison of rooting methods for strawberries.  
① Dividing and transplanting in rooting medium  
② Transplanting in rooting medium  
③ Transplanting in soil  
④ Transplanting in soil  
⑤ Dividing and transplanting in soil  
⑥ Acclimating  
⑦ Rooting and acclimating in soil  
⑧ Dividing and transplanting in soil

Table 1 Effects of add-methods and concentration of growth regulators on mass-propagation of axillary buds in meristem plantlet.

| Add-methods                      | Concentration <sup>3)</sup><br>of growth<br>regulators | No. of<br>shoots per<br>plantlet | Developing shoots |                      |
|----------------------------------|--|----------------------------------|-------------------|----------------------|
|                                  |  |                                  | No. of<br>leaves  | Shoot<br>height (mm) |
| Control <sup>1)</sup>            | 1  | 11.6b <sup>4)</sup>              | 2.6a              | 20.8b                |
|                                  | 1/4  | 6.1a                             | 3.4b              | 18.4b                |
|                                  | 1/2  | 11.8b                            | 2.9ab             | 16.5b                |
| Dropping <sup>2)</sup><br>method | 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.  
<sup>1)</sup> Roots of plantlets were pruned and transplanted on propagation medium.  
<sup>2)</sup> Growth regulators were dropped on plantlet crowns.  
<sup>3)</sup> Concentration of growth regulators was based on BAP 0.02 mg and Kin 0.004 mg per plantbox.  
<sup>4)</sup> Values with the same letter in a column are not significantly different at 5% level according to Duncan's multiple range test.

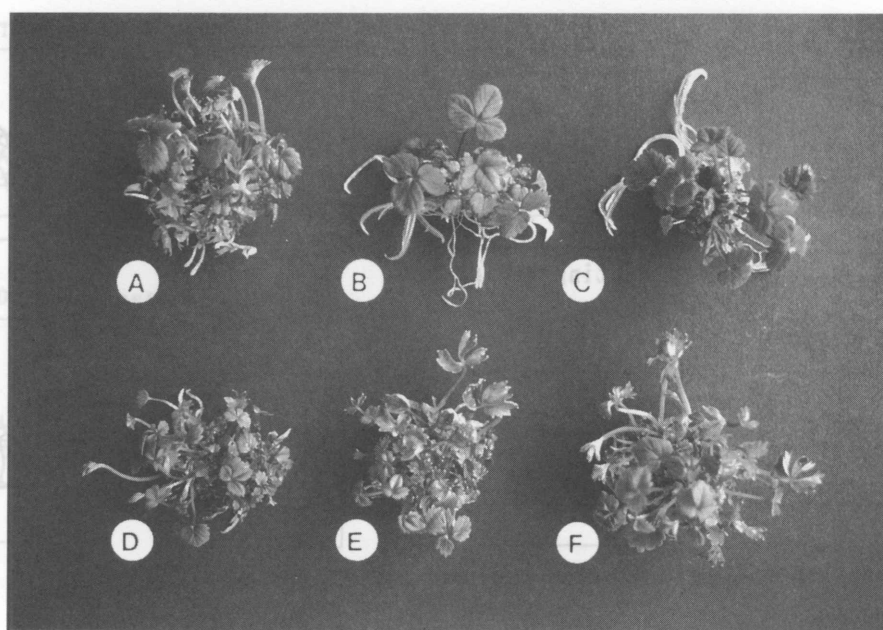


Fig. 3 The effects of add-methods and concentration of growth regulators on mass-propagation of strawberries.

- 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 show the dropping method.

順化・定植後の越冬前では展開葉数が対照区に対し、各処理区に差がなかった。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 2)。

収穫後の展開葉数は、対照区に比べ、各処理区に差がなかった。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 3)。

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、各処理区は対照区と比べ大きな差は認められなかった (Table 4)。

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

Table 2 Effects of add-methods and concentration of growth regulators on plantlet growth before overwinter in the field.

| Add-methods                      | Concentration <sup>3)</sup><br>of growth regulators | No. of leaves      | Plant height (cm) | Crown width<br>(mm) | No. of<br>axillary buds |
|----------------------------------|---|--------------------|-------------------|---------------------|-------------------------|
| Control <sup>1)</sup>            | 1   | 6.5a <sup>4)</sup> | 17.8a             | 17.4a               | 2.2a                    |
| Dropping <sup>2)</sup><br>method | 1/4   | 7.2a               | 17.2a             | 15.4a               | 1.8a                    |
|                                  | 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                    |

<sup>1)</sup> Roots of plantlets were pruned and transplanted on propagation medium.

<sup>2)</sup> Growth regulators were dropped on plantlet crowns.

<sup>3)</sup> Concentration of growth regulators was based on BAP 0.02 mg and Kin 0.004 mg per plantbox.

<sup>4)</sup> Values with the same letter in a column are not significantly different at 5% level according to Duncan's multiple range test.

Table 3 Effects of add-methods and concentration of growth regulators on growth after picking time in the field.

| Add-methods                      | Concentration <sup>3)</sup><br>of growth regulators | No. of leaves       | Plant<br>height (cm) | Length of<br>flower cluster<br>(cm) | No. of<br>flower<br>clusters |
|----------------------------------|---|---------------------|----------------------|-------------------------------------|------------------------------|
| Control <sup>1)</sup>            | 1   | 25.8a <sup>4)</sup> | 20.7a                | 30.4a                               | 4.3a                         |
|                                  | 1/4   | 26.2a               | 19.4a                | 29.8a                               | 4.8a                         |
|                                  | 1/2   | 25.3a               | 21.3a                | 27.6a                               | 4.9a                         |
| Dropping <sup>2)</sup><br>method | 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                         |

<sup>1)</sup> Roots of plantlets were pruned and transplanted on propagation medium.  
<sup>2)</sup> Growth regulators were dropped on plantlet crowns.  
<sup>3)</sup> Concentration of growth regulators was based on BAP 0.02 mg and Kin 0.004 mg per plantbox.  
<sup>4)</sup> Values with the same letter in a column are not significantly different at 5% level according to Duncan's multiple range test.

Table 4 Effects of add-methods and concentration of growth regulators on fruit yield in the field.

| Add-methods                      | Concentration <sup>3)</sup> of<br>growth regulators | Picking periods | Single fruit<br>weight (g) | Fruit weight<br>per stock (g) |
|----------------------------------|---|-----------------|----------------------------|-------------------------------|
| Control <sup>1)</sup>            | 1   | July 8-Aug. 14  | 14.9a <sup>4)</sup>        | 310.8a                        |
|                                  | 1/4   | July 5-Aug. 15  | 12.5a                      | 283.4a                        |
|                                  | 1/2   | July 4-Aug. 14  | 14.4a                      | 359.4ab                       |
| Dropping <sup>2)</sup><br>method | 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                        |

<sup>1)</sup> Roots of plantlets were pruned and transplanted on propagation medium.  
<sup>2)</sup> Growth regulators were dropped on plantlet crowns.  
<sup>3)</sup> Concentration of growth regulators was based on BAP 0.02 mg and Kin 0.004 mg per plantbox.  
<sup>4)</sup> Values with the same letter in a column are not significantly different at 5% level according to Duncan's multiple range test.

な方法であることが示された。

2. 順化作業に関する実験

順化作業に関する実験では、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。すなわち、発根率は対照区と無分割区の間には差がなかったが、無発根区では低下した。他区の発根数は対照区に対し、減少する傾向が見られたが、有意な差ではなかった。無分割区の順化率は対照区と差がなかったが、無発根区では低下した (Table 5)。

順化・定植後の越冬前の展開葉数は、対照区と各処理区間に差がなかった。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と処理区には差がなかった。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 6)。

収穫時期、一果重と一株収量には対照区といずれの処理区との間に大きな差はなかった (Table 7)。

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、無菌的分割操作を省略することが可能であった。

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

Table 5 Effects of rooting methods on acclimatization.

| Treatments               | Rooting rate (%)  | No. of roots | Acclimatization rate (%) |
|--------------------------|-------------------|--------------|--------------------------|
| Control <sup>1)</sup>    | 97b <sup>4)</sup> | 4.1a         | 95b                      |
| No-divide <sup>2)</sup>  | 82b               | 3.5a         | 94b                      |
| No-rooting <sup>3)</sup> | 60a               | 3.2a         | 60a                      |

<sup>1,2,3)</sup> See Fig. 2.  
<sup>4)</sup> 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 rooting methods on growth before overwinter and after picking time.

|                    | Treatments               | 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 <sup>1)</sup>    | 6.2a <sup>4)</sup> | 16.3a             | 16.4a            | 1.9a                | —                             | —                      |
|                    | No-divide <sup>2)</sup>  | 7.1a               | 17.2a             | 15.3a            | 1.8a                | —                             | —                      |
|                    | No-rooting <sup>3)</sup> | 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                   |

<sup>1,2,3)</sup> See Fig. 2.<sup>4)</sup> Values with the same letter in a column are not significantly different at 5% level according to Duncan's multiple range test.**Table 7** Effects of rooting methods on fruit yield in the field.

| Treatments               | Picking periods | Single fruit weight (g) | Fruit weight per stock (g) |
|--------------------------|-----------------|-------------------------|----------------------------|
| Control <sup>1)</sup>    | July 8-Aug. 14  | 14.2a <sup>4)</sup>     | 275.8a                     |
| No-divide <sup>2)</sup>  | July 5-Aug. 14  | 13.8a                   | 322.6a                     |
| No-rooting <sup>3)</sup> | July 7-Aug. 12  | 15.3a                   | 297.0a                     |

<sup>1,2,3)</sup> See Fig. 2.<sup>4)</sup> Values with the same letter in a column are not significantly different at 5% level according to Duncan's multiple range test.

くすることで、これ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できる株数を多くすることが可能となった。

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。

以上の結果、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の多芽体を誘導することができ、移植作業を簡略化することができることを明らかにした。また、多芽体を分割せずに発根させることで、無菌操作を簡略にすることができた。さらに、多芽体を直接順化することで、順化時のスペースを少なくすることに成功した。これらの方法で生産したウイルスフリー苗は生育および収量において慣行法の苗とは差が認められず、実用的な方法であることが明らかとなった。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。しかし、ウイルスフリー苗の大量増殖作業に関する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、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。本実験の方法は大量培養槽を利用した増殖法ほど簡便なものとはならないものの、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と推察される。

#### 引用文献

1. Kartha, K.K., N.L. Leung and K. Pahl 1980. Cryopreservation of strawberry meristems and mass propagation of plantlets. J. Amer. Soc. Hortic. Sci., 105: 481-484.
2. Lopez-Aranda, J.M., F. Pliego-Alfaro, I. Lopez-Navidad and M. Barcelo-Munoz 1994. Micropropagation of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.). Effect of mineral salts, benzyladenine levels and number of subcultures on the in vitro and field behaviour of the obtained microplants and the fruiting capacity of their progeny. J. Hortic. Sci., 69: 625-637.
3. Murashige, T. and F. Skoog 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant., 15: 473-497.
4. Nehra, N.S., K.K. Kartha, C. Stushnoff and K. L. Giles 1994. Effect of in vitro propagation methods on field performance of two strawberry cultivars. Euphytica. 76: 107-115.
5. Nishi, S., K. Ohsawa 1973. Mass production method of virus-free strawberry plants through meristem callus. JARQ. 7: 189-194.

6. Suzuki, R., K. Kawamura, Y. Sakuma 1985. Studies on the establishment of virus-free strawberry stocks. (in Japanese) Bull. Miyagi Agri. Cent. 52: 1-9.
7. Swartz, H.J., G.J. Galletta and R.H. Zimmerman 1981. Field performance and phenotypic stability of tissue culture-propagated strawberries. J. Amer. Soc. Hortic. Sci. 106: 667-673.
8. Wagatsuma, T. 1993. Possibility of low-temperature storage of runners for shoot apex culture of strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duchesne). (in Japanese with English abstract) Plant Tissue Culture Letters 10: 160-162.
9. Wagatsuma, T. and Y. Un-no 1996. Effects of sampling dates of runners on plantlet growth in shoot apex culture of strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duchesne). (in Japanese with English abstract) Plant Tissue Culture Letters 13: 273-277.
10. Wagatsuma, T. 1997. Effect of pretreatment and length of low-temperature storage period of runner on plantlet growth in the shoot apex culture of strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duchesne). (in Japanese with English abstract) Environ. Control in Biol. 35: 85-90.

### Summary

To efficiently produce virus-free strawberry plants with minimal labour costs, a reliable method is necessary. In this study a labour-saving procedure was evaluated as a feasible approach to the work engaged in the tissue culture of strawberry (*Fragaria ananassa* Duchesne). When a growth regulating solution was dropped onto the crown in plantlets derived from the shoot apex culture, multi-bud formation was induced with a frequency comparable to that achieved by conventional transplantation. When the roots were produced without dividing the multi-bud formation, the rooting rate and the number of roots resulting were no different from those produced by the conventional methods. Thus, labour reduction was realized in aseptic procedures. Although the rooting rate and the acclimatization rate were lower than rates achieved by conventional methods whereby the multi-bud form is acclimatized directly, the acclimatization efficiency was enhanced in a limited space. No differences occurred in plant growth and strawberry yield among the three methods examined, i.e., the dropping method, the no-divide method, and the no-rooting method. Results of this study suggest that these methods can be used in practical ways to achieve a given purpose.