

イチゴの茎頂および植物体の *in vitro* 保存

後藤 隆子, 宮崎 正則, 奥 正和, 佐藤 宏

In vitro Storage of Shoot Tips and Plantlets of Strawberry (*Fragaria ananassa*).

Takako Goto, Masanori Miyazaki, Masakazu Oku and Hiroshi Sato

For the study of *in vitro* storage at low temperature, strawberry shoot tips were placed in B5 medium containing 0.1 mg/ℓ IAA and stored at 5°C in the dark after pre-culturing at 25°C under 2,000 lux. After the storage for 30-360 days at 5°C, they were incubated at 25°C under 2,000 lux, 16hr/day for 60 days.

Shoot and root formation rates were lower as storage period was longer. But about 20-30% of shoot tips stored for 360 days survived and developed complete plantlets.

For the study of *in vitro* storage at room temperature, strawberry shoots were cultured in B5 media containing 2 or 0.2% sucrose and several growth retardants (CCC, ancymidol or ABA) at 25°C under 2,000 lux, 16hr/day for 4 months.

The growth of strawberry plantlet was significantly reduced in the medium containing 0.2% sucrose. The plant growth retardants weren't effective in the reduction of growth.

Key words: *in vitro* storage, tissue culture, low temperature, *Fragaria ananassa*, growth retardant.

イチゴは、他の多くの野菜が種子で繁殖するのに対し、ランナーによる栄養繁殖を行う。従って、育種素材となりうる有用品種を保存するには親株を圃場で維持する以外考えられなかった。しかし、この方法は毎年膨大な労力、圃場面積および経費を必要とし、かつ植物体自身も病虫害による汚染や不慮の事故などの危険に常にさらされている。

これらの問題を取り除くには、植物の生長を人為的に調節し、*in vitro*で植物体を維持することが最も望ましいと思われる。*in vitro*で植物体を保存するには、植物の代謝を抑制する条件に培養環境や培地組成を設定する方法が用いられている。植物の生長抑制にしばしば用いられる環境条件は温度で、それには低温（0°C以上）と凍結がある。イチゴは比較的低温に強い植物であると言われ、Kantha¹⁾らはイチゴの茎頂を凍結保存し、高い生存率を得ている。凍結は植物の代謝を停止させるため、かなり長期間保存でき、遺伝資源を維持するには最も有効な方法だと思われるが、専用の装置による微妙な温度管理が要求される。そこで、簡便にできるイチゴ植物の保存を検討するため、*in vitro*における茎頂の低温保存および植物体の室温保存について実験を行った。

実 験 方 法

1. 茎頂の低温保存試験

1) 供試材料 露地栽培しているイチゴ品種「宝交早生」および「アメリカ」のランナーを採

取し、滅菌後、顕微鏡下で約1mmの茎頂を切り取り、 $0.1\text{mg}/\ell$ IAA (Indole-3-acetic acid) および2%蔗糖を含むB5²⁾寒天培地の入っている小試験管(直径18mm, 高さ100mm)に置床した。

- 2) 保存方法 予備実験の結果、茎頂は5から10日間25℃で前培養を行うと、置床直後に低温に移すより保存後の生存率が高かった。そこで、培地に置床した茎頂を25℃、2000 ℓ x、16時間日照で5日間前培養を行った後、5℃、暗条件下に30、90、180、360日間保存した。一試験区あたり、‘宝交早生’で約17個体、‘アメリカ’で約20個体を用い、冷蔵庫内での細菌汚染を防止するため、試験区単位でポリ袋に密封した。
- 3) 調査方法 保存期間が終了した試験区は、5℃暗条件下から25℃、2000 ℓ x、16時間日照に移して60日間培養し、シュートの形成および草丈、不定根の形成および根長について調査した。

2. 植物体の室温保存試験

- 1) 供試材料 バイオポットで無菌的に培養しているイチゴ品種‘宝交早生’から草丈約2.5cm、展開葉が3枚程度の腋芽を採取し、根を除いた後(重さ約0.03g)、バイオポット(直径8cm, 高さ10cm)に2個体ずつ移植した(Fig. 1)。
- 2) 培地組成および培養条件 B5寒天培地に2%または0.2%蔗糖および $1\text{mg}/\ell$ のアンシミドール、(2-Chloroethyl) trimethyl ammonium chloride (CCC)、アブシジン酸(ABA)をTable 2に示す組み合わせで添加した。培地はバイオポットに各60mlずつ分注した。培養は25℃、2000 ℓ x、16時間日照で行い、1試験区3ポット合計6個体の材料を用いた。
- 3) 調査方法 移植4ヵ月後、草丈、展開葉数、葉重、根長、根数、根重および枯葉数について測定した。

結果および考察

1. 茎頂の低温保存試験

- 1) シュート形成率および草丈 Table 1に示したように、シュート形成率は保存期間が長くなるほど低くなったが、保存180日で‘宝交早生’18%、‘アメリカ’50%、保存360日で‘宝交早生’21%、‘アメリカ’32%と比較的高い割合でシュートが形成された。また、保存180日以降の茎頂は、25℃に移した時点で、すでにシュート形成がみられ、低温、暗条件でも茎頂は徐々に生長することがわかった。

草丈は、保存期間が長くなると、3cm以上になる個体の割合が増加した。これは低温保存中に起こる茎頂の生長が主な原因と考えられる。

- 2) 不定根形成率および根長 不定根形成率もシュート形成率と同様の傾向を示した(Table 1)。不定根はシュートの場合と若干異なり、低温保存期間が長くても25℃に移した時点ではまだ形成されていなかった。

不定根は、25℃、60日間の培養でほとんどが3cm以上になり、その他も培養を続けると伸長したため、最終的に低温保存で生存していた茎頂の大部分が、圃場に移しても充分生育できる状態までに生育した。

2. 植物体の室温保存試験

- 1) 培地中の蔗糖濃度による生長抑制 基本培地の蔗糖濃度を通常培養に用いている2%から0.2%に減じると、草丈は顕著に低くなった。葉数は蔗糖濃度にあまり影響されなかったが、蔗糖濃度が低いと枯葉が多くみられた。また、0.2%蔗糖添加区の展開葉は小さくて厚みが

無く、色も薄い傾向がみられ、平均葉重は2%蔗糖添加区の1/2程度だった (Fig. 4, 5, Table 2) .

Table 1. Effects of storage periods at 5°C on growth of shoot tips. ※1

Cultivars	Days of storage	Shoot formation rate (%)	Plant height ※2			Root formation rate (%)	Root length ※2		
			+	++	+++		+	++	+++
Hokowase	0	95	3	9	7	95	2	11	6
	30	53	0	1	8	53	0	0	9
	90	59	0	1	9	59	0	1	9
	180	18	0	0	3	18	0	0	3
	360	21	0	0	4	26	1	0	4
America	0	93	2	8	4	93	2	10	2
	30	95	1	8	10	95	1	0	18
	90	55	0	5	6	55	0	2	9
	180	50	0	3	7	50	0	2	8
	360	32	1	4	4	32	1	2	3

※1 Shoot tips were placed in B5 medium (2% sucrose, 0.8% agar) containing 0.1 mg/ℓ IAA and cultured at 25°C for 60 days after the storage at 5°C.

※2 Number of plants.

+ : < 1 cm, ++ : 1–3 cm, +++ : > 3 cm.

Table 2. Effects of sucrose and plant growth retardants on growth of strawberry plants *in vitro*.

Sucrose	Chemicals	Plant height (cm)	Number of leaves	Root length (cm)	Number of roots	Fresh weight(g)		T/R※	Dry weight(g)		T/R※	Number of dead leaves
						Leaves	Roots		Leaves	Roots		
2%	—	5.4	14	28	15	1.30	0.70	1.86	0.17	0.07	2.43	0.5
	CCC	5.3	15	21	16	1.23	0.77	1.60	0.18	0.06	3.00	0.8
	Ancymidol	6.0	15	16	44	1.78	1.38	1.29	0.22	0.11	2.00	2.3
	ABA	5.7	16	10	18	1.63	0.92	1.77	0.20	0.08	2.50	8.5
0.2%	—	4.0	16	12	12	0.70	0.28	2.50	0.07	0.02	3.50	4.5
	CCC	4.3	14	10	13	0.60	0.23	2.61	0.06	0.02	3.00	3.5
	Ancymidol	3.1	19	3	24	0.82	0.20	4.10	0.07	0.01	7.00	8.2
	ABA	3.4	14	3	15	0.47	0.28	1.68	0.05	0.02	2.50	7.0

Data were represented by means of six replications.

Shoots were cultured in B5 media containing 0.2 or 2% sucrose and 1 mg/ℓ growth retardant for 4 months.

※T/R=weight of leaves/weight of roots.

0.2%蔗糖添加区の根長並びに平均根重は2%蔗糖添加区に比べてかなり低い値を示し、蔗糖濃度による生長の抑制は地下部で特に顕著にみられた (Fig. 2, 3, Table 2) .

- 2) 培地中の生長抑制物質による生長抑制 ジベレリン生合成阻害物質であるアンシミドールおよびCCC, 生長阻害作用を持つ生長調節物質であるABAがイチゴ植物体に及ぼす生育抑制効果を検討したところ, Table 2およびFig. 2, 3, 4, 5に示した結果を得た.

アンシミドール添加区は蔗糖濃度2%の場合, 草丈, 葉数および葉重が無添加区よりやや大きい傾向を示した. 展開葉も緑色が濃く, 厚みがあったが, 下葉は枯れているのが多かつ

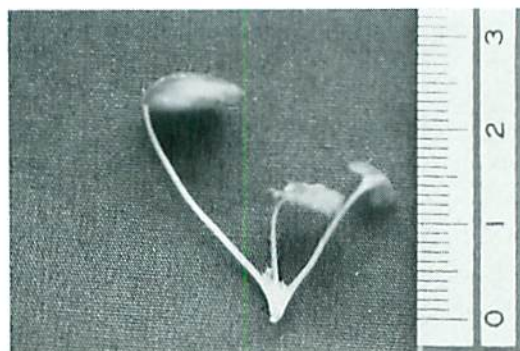


Fig.1. Plant material before transplanting in the medium.

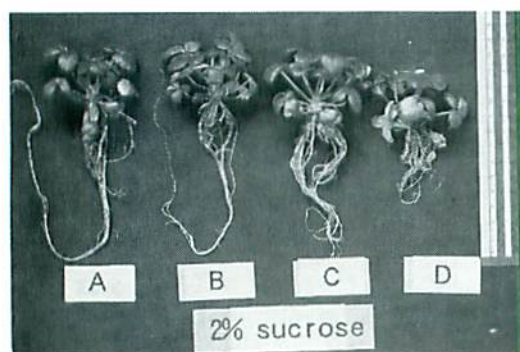


Fig.2. Effects of plant growth retardants on growth of strawberry *in vitro*. Shoots were cultured in the B5 media containing 2 % sucrose and 1 mg/l growth retardants for 4 months.

A : control, B : CCC, C : ancymidol, D : ABA.

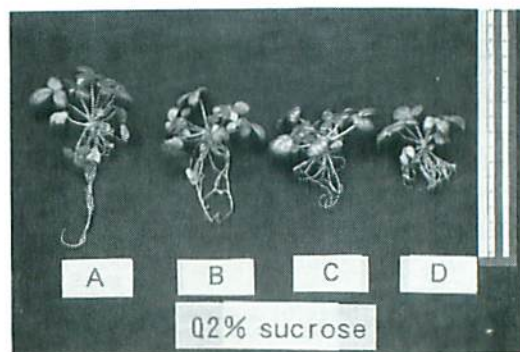


Fig.3. Effects of plant growth retardants on growth of strawberry *in vitro*. Shoots were cultured in the B5 media containing 0.2 % sucrose and 1 mg/l growth retardants for 4 months.

A : control, B : CCC, C : ancymidol, D : ABA.

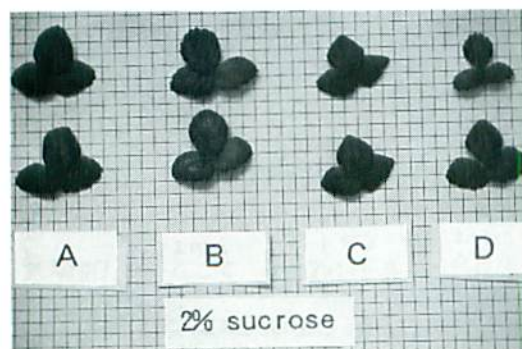


Fig.4. Effects of plant growth retardants on growth of leaf of strawberry *in vitro*. Shoots were cultured in the B5 media containing 2 % sucrose and 1 mg/l growth retardants for 4 months.

A : control, B : CCC, C : ancymidol, D : ABA.

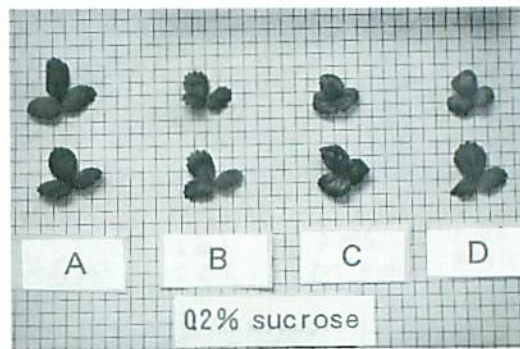


Fig.5. Effects of plant growth retardants on growth of leaf of strawberry *in vitro*. Shoots were cultured in the B5 media containing 0.2 % sucrose and 1 mg/l growth retardants for 4 months.

A : control, B : CCC, C : ancymidol, D : ABA.

た。しかし、根の伸長は著しく抑制され、太くて短い特徴的な根を形成していた。反面、根数が無添加区の2倍以上あるため、根重は大きくなり、結果として地下部の生育が抑制されているとは言えなかった。蔗糖濃度0.2%の場合、無添加区に比べて草丈が低くなり矮化した。葉数がやや多く、葉重はほとんど差がなかった。根数は無添加区より多かったが、根の伸長は2%蔗糖濃度より強く抑制されており、根重も小さくなった。

CCC添加区は蔗糖濃度に関係なく、生育抑制効果がみられなかった。

ABAはアンシミドールの作用と類似しており、蔗糖濃度が2%の場合、ABA添加区の草丈、葉数および葉重は無添加区よりやや大きい傾向を示した。根の伸長は著しく抑制されていたが、各々の根が太いため、根重は大きくなった。0.2%蔗糖濃度の場合、葉数並びに葉重は無添加区に比べて少なかった。しかし、地下部は太くて短い根を形成しているため、根重は大きくなった。

以上の結果、イチゴの茎頂を25℃で前培養した後5℃暗条件下で保存すると、保存期間が長くなるにつれシュートおよび不定根形成率は低下したが、保存360日でも‘宝交早生’で21%、‘アメリカ’で32%の茎頂が生存しており、25℃明条件下で培養すると順化可能な大きさにまで生長することがわかった。

また、イチゴ植物体の室温保存試験に関しては、培地中の蔗糖濃度を低下させることで生育を強く抑制させることができた。培地中の蔗糖濃度を低下させると生長が抑制される現象はカーネーション³⁾やキク⁴⁾などでも報告されている。蔗糖は浸透圧とは異なる作用性を持って発根に強く作用すると言われており⁵⁾、本実験においても同様の結果を得た。通常、イチゴを*in vitro*で培養する場合、室温条件では約3ヵ月以内に継代する必要があるが、蔗糖濃度を調節すると継代期間が延長され、*in vitro*における植物体の保存がより効率良くおこなえるものと思われる。

アンシミドールおよびABAなどの生長抑制物質による生育抑制は、根の伸長を抑制したものの、生体重は無添加区とあまり差がなくほとんど効果がなかった。

イチゴは植物体の維持、増殖に多大の時間、労力、費用および圃場面積が必要であったが、バイオテクノロジーによる*in vitro*での植物体の保存や大量増殖技術を用いると、多種の保存品種から必要とするものを選択し、その苗を多量にかつ迅速に生産者に供給できる優れた育苗システムの確立が可能になる。本実験で得られた結果は、簡便かつ効果的にイチゴを保存できるのでこのシステムに充分利用できると考えられる。

要 約

イチゴの茎頂を25℃で前培養した後5℃暗条件下で一定期間保存し、再び25℃明条件下で培養してその生育を調べた。保存期間が長くなるにつれシュートおよび不定根形成率は低下したが、保存360日でも20～30%程度の茎頂が生存しており、順化可能な大きさにまで生長した。

またイチゴ無菌苗を2%または0.2%蔗糖および種々の生長抑制物質(CCC, アンシミドールおよびABA)を加えたB5培地に植えつけ、25℃で培養したところ、0.2%蔗糖で顕著に生育が抑制されており、生長抑制物質はほとんど効果がなかった。

引 用 文 献

- 1) Kartha, K. K., Leung, N. L., Pahl, K. : *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **105**, 481-484 (1980).
- 2) Gamborg, O. L., Miller, R. A., Ojima, K. : *Exp. Cell Res.*, **50**, 148-151 (1968).
- 3) Schnapp, S. R., Precce, J. E. : *Plant Cell, Tissue Organ Cult.*, **6**, 3-8 (1986).

- 4) 深井誠一, 森井正弘, 大江正温: 植物組織培養, 5, 20-25 (1988).
- 5) Hyndman, S. E., Hasegawa, P. M., Bressan, R. A.: *Plant Cell, Tissue Organ Cult.*, 1, 229-238 (1982).