

イチゴ培養苗の生育と苗質における 炭酸ガス施用効果

荒井 滋・浅尾浩史・小島博文

Effect of CO₂ Enrichment on the Growth and Quality of Strawberry Plantlets Regenerated from a Shoot-tip Culture

Shigeru ARAI, Hiroshi ASAO and Hirofumi KOBATAKE

Summary

The present experiments were carried out to establish a method for in vitro micropropagation system of healthy strawberry plants. Effect of CO₂ enrichment, sucrose and plant hormone concentration on the growth and quality of plantlets in tissue culture were investigated.

1. The CO₂ gas concentration inside the vessel decreased to 100-200 ppm during the light period. The number of effective axillary buds appearing was inhibited in a non-sucrose medium.
2. After the propagation medium was supplemented with 0.25 mg/l benzyladenine (BA) and 0.5 mg/l kinetin (KIN), the number of effective axillary buds was almost equal to the usual medium supplemented with 0.5 mg/l BA and 1.0 mg/l KIN, but an increase was observed with CO₂ enrichment.
3. The growth and dry weight of plantlets was promoted in proportion to the amount of sucrose concentration and become even stronger when CO₂ enrichment was applied to the rooting medium.
4. The acclimatization rate and growth of acclimatized were promoted by an increase in sucrose concentration or CO₂ enrichment and the epicuticular wax covering the leaves of these plantlets was thicker.

Key words: strawberry, micropropagation, CO₂ enrichment, epicuticular wax

緒 言

栄養繁殖性植物の試験管内大量増殖技術として、茎頂組織や薬由来のカルスから効率的に植物体を分化させる方法が試みられているが、そのようなカリクロンを利用した増殖方法^{14) 15) 16) 17)}では再生した植物体に変異し易く実用面では問題があるとされている。変異性を回避する手段として、BOXUS^{11) 2)}、KARTHA⁹⁾や横田ら²⁴⁾は茎頂由来の植物から腋芽を誘導する方法により短期間に多数のクローン個体を得ており、イチゴでは藤本ら⁵⁾、鈴木²⁰⁾、高野ら²¹⁾や吉原ら²⁵⁾の報告がある。

しかしながら、培養幼植物体は軟弱のため枯死したり、

生長が抑制される^{22) 26)}ため生育が不揃いであり、順化効率が悪く、成苗化に長い時間がかかるなど問題点が残されている。この要因として、密閉条件下で従属栄養生長を行っている植物体は、急激な環境変化とくに水ストレスに生理機能が素早く順応出来ないことが主な原因と考えられている^{4) 5) 18)}。古在ら¹¹⁾は培養幼植物体の順化のための環境調節の検討を行い、順化装置を開発し、幼植物体の活着や生育を促進させるための環境条件の重要性を報告している。順化の過程で炭酸ガス施用による生育促進⁸⁾や噴霧並びに遮光による活着率の向上²³⁾など、順化後の環境調節を扱った報告はあるが、培養幼植物体の生育を促進させるために培養中の環境を制御した例は

Kozaiら¹²⁾の報告以外にない。

そこで本報では、順化率を高め効率的な健苗生産技術を確立するために、培養苗の生育と苗質に及ぼす培地の糖並びにホルモン条件と培養中の炭酸ガス施用の影響について検討したのでその結果を報告する。

材料および方法

供試した外植体は、MURASHIGE & SKOOG(MS)培地¹³⁾を基本培地とし、ショ糖3%、サイトカイニン(ベンジルアデニン:BA 0.5mg/l+カイネチン:KIN 1.0mg/l)を含む当時慣行の増殖培地で腋芽増殖したイチゴ(室交早生)の培養幼植物体を用いた。1芽に分割し葉数を3枚に揃えた後、下記の試験培地を分注した培養容器(プラントボックス)に4個体ずつ、1区12個体移植した。キャップにはPP製透明フィルムを用い、輪ゴムどめとした。

増殖試験には、MS培地を基本にショ糖3水準(3、1.5、0%)、ホルモン濃度3水準(慣行濃度、慣行の2分の1、ホルモンフリー)の培地を用い、25℃、5000 lux、16時間照明の培養条件で40日間培養した。さらに、炭酸ガス施用も併用した。

発根試験には、MS培地を基本にショ糖3水準(3、1.5、0%)の培地を用い、25℃、5000lux、16時間照明の培養条件で35日間培養した。

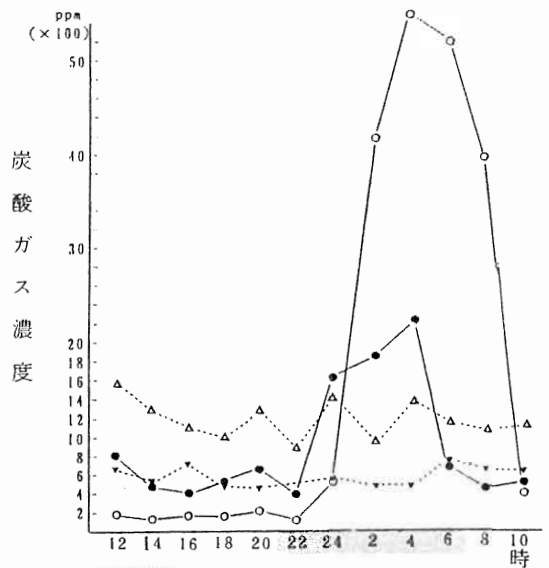
培養幼植物体の順化は、20日間ガラス室内で行い、移植用土には山土、パーミキュライト、ピートモス各等量混和したものを用いた。移植直後は遮光率30%のラプシートで1週間トンネル被覆して活着を促した。灌水は1日2回底面給水により行った。

炭酸ガス施用は、透明アクリル製チャンバー(30×50×35cm)内に培養容器を入れて行い、施用試験設定濃度(1000ppm)になるように赤外線炭酸ガスコントローラー(藤井電器 ZFT-1)で5分毎チェックし、修正した。培養容器内のガス濃度はガスクロマトグラフィーで測定した。

培養幼植物体の葉面観察は、新生第3葉を約3mm角に切断して、凍結試料作製装置(GIKO FD 2A)で-90℃乾燥処理し、金蒸着の後走査電子顕微鏡(AKASHI ALPHA-9)で観察した。

結 果

炭酸ガス施用時の培養容器内のガス濃度は、供給ノズルの余圧のため1000~1500ppmとやや高めに推移した



第1図 培養容器及び培養室中の炭酸ガス濃度の日変化
培養容器: ● CO₂施用 ○ CO₂無施用
△ CO₂施用(植物体無し)
培養室: ▼ 暗期

Fig. 1 Change with passage of time in CO₂ concentration in the culture bottle and culture room.

がほぼ設定値が維持できた。一方、幼植物体を培養した条件では、炭酸ガスを施用しないと培養容器内のガス濃度は、明期では200ppm程度と低く、暗期の直前ではさらに100ppm程度まで低下し、暗期になるとガス濃度は急上昇して5000ppm以上となった。しかしながら、炭酸ガス施用することにより、明期の培養容器内ガス濃度は培養室内のレベル(450ppm)に維持できた(第1図)。

増殖培地の糖濃度は増殖腋芽数に大きく影響し、無糖培地では極端に減少したが、1.5%、3%では変わらなかった。また、ホルモン濃度を慣行の2分の1にしても腋芽数に差は認められず、ホルモンフリー培地ではほとんど増殖しなかった。一方、炭酸ガスを施用することにより全般に増殖数は増加し、ショ糖0%であってもホルモンを含む培地であればある程度の増殖は認められた。培養幼植物体の生育は、増殖率の大きい試験区程抑えられた(第1表)。

発根培地での培養幼植物体の生育は、草丈については大きな差は認められなかったが、根部の生育や生体重量では培地の糖濃度が大きく影響し、ショ糖無添加で生育は抑えられ、ショ糖濃度の増加とともに生育は良好となった。しかしながら、炭酸ガスを施用することにより培

地の糖の減量による生育抑制は回避され、生体重量も大となった(第2表)。培養後の幼植物体の乾物率は培地の糖濃度の増加で高くなり、炭酸ガスの施用でさらに向上した(第2図)。

順化後の生育も培養中の糖濃度が影響し、糖の減量で生育は抑制され、順化率も減少し枯死株も認められた。しかし、培養中の炭酸ガス施用により生育は促進され、シヨ糖の減量による生育抑制が回避され、順化率も高く

第1表 イチゴの腋芽増殖に及ぼす培地のシヨ糖及びホルモン濃度と培養中のCO₂施用の影響

Table 1 Effect of sucrose, cytokinin concentration and CO₂ enrichment on the micropropagation of strawberry using auxillary buds from a meristem plantlets.

CO ₂ (ppm)	シヨ糖(%)	ホルモン(mg/l)		腋芽数 ¹⁾	草丈(mm)	葉数	
		B A P	K I N				
1000~1500	3.0	0.5	1.0	31.5	11.6	2.6	
		0.25	0.5	26.4	11.3	2.9	
		0	0	1.8	30.6	6.1	
	1.5	0.5	1.0	30.9	12.7	2.9	
		0.25	0.5	27.8	18.6	3.1	
		0	0	2.9	29.0	5.2	
	0	0.5	1.0	11.3	7.4	— ²⁾	
	400~450 (無処理)	3.0	0.5	1.0	24.8	12.5	3.1
			0.25	0.5	22.6	11.9	3.1
			0	0	1.8	39.8	6.6
		1.5	0.5	1.0	23.1	12.9	2.7
			0.25	0.5	24.2	14.4	3.2
0			0	4.8	23.3	4.4	
0		0.5	1.0	4.7	9.9	—	

1) 1株当たり草丈5mm以上の腋芽数 2) 調査せず

第2表 培養幼植物の生育に及ぼす培地の糖濃度と培養中のCO₂施用の影響¹⁾

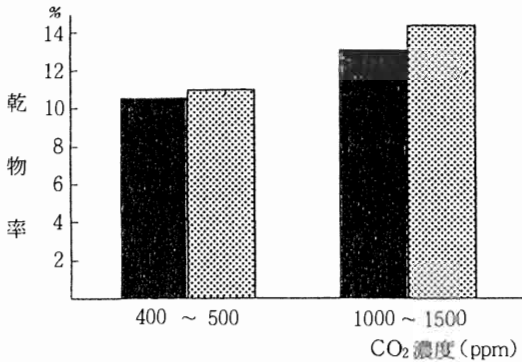
Table 2 Effect of sucrose concentration and CO₂ enrichment on the growth of strawberry plantlets.

CO ₂ (ppm)	シヨ糖(%)	草丈(mm)	葉数	根長(mm)	根数	生体重(g)
1000~1500	3.0	32.5	7.7	94.8	11.3	1.058
	1.5	40.0	7.7	95.6	11.4	0.993
	0.75	35.8	7.6	77.5	10.7	— ²⁾
	0	48.4	8.2	59.4	9.3	—
400~450	3.0	30.7	7.5	102.2	10.3	0.827
	1.5	32.5	7.9	92.6	8.8	0.615
	0.75	29.6	7.8	75.0	7.6	—
	0	34.1	6.2	45.8	2.6	—

1) 数字は10個体平均 2) 調査せず

供試したすべての株が苗化できた (第3表)。

培養幼植物体葉表面を走査型電子顕微鏡で観察したところ、エピクチクラワックス量は培養条件により変化した。培地の糖濃度が高くなるにつれて増加し、炭酸ガス施用でさらに増加した(図版1)。また、培養幼植物体は、外部の環境条件に慣れ成苗化が進むにつれエピクチクラワックス量の増加が観察された(図版2)。



第2図 培養幼植物の乾物率に及ぼす培地のシヨ糖濃度と培養中のCO₂施用の影響

■ シヨ糖 1.5% ▨ シヨ糖 3.0%

Fig. 2 Effect of sucrose concentration and CO₂ enrichment on the dry weight rate of strawberry plantlets.

考 察

シヨ糖の添加による培養幼植物体の草丈の増加は認められないが、根の生長や生体重量ではシヨ糖の添加により認められる。このことは、一般に培養幼植物体の生育には1~5%の糖の添加が必要であると言われているように、培養幼植物体が炭素源として培地に添加されたシヨ糖を用いた従属栄養生長を主体に行っていることを示唆している。

しかしながら、炭酸ガスを施用しない場合、培養容器内の炭酸ガス濃度は、培養容器外に比べ明期では100~200 ppmと低く推移し、暗期になると5000 ppm以上に上昇し、明期で再び急速に低下する。さらに、炭酸ガス施用(1000~1500 ppm)により生体重量や腋芽数が増加することから、光合成による光独立栄養生長も行い、古在ら¹⁰⁾がすでに報告しているように培養幼植物体は光混合栄養的に生長していることを示しており、明期におけるこのような炭酸ガスの飢餓状態は、培養幼植物体生育

第3表 培養幼植物の順化後の生育に及ぼす培地のシヨ糖濃度と培養中のCO₂施用の影響¹⁾

Table 3 Effect of sucrose concentration and CO₂ enrichment on the growth of acclimatizable strawberry plantlets.

CO ₂ (ppm)	培地の		培養幼植物	
	シヨ糖(%)	草丈(mm)	順化率(%)	
1000 ~ 1500	3.0	37.4	100	
	1.5	41.9	100	
	0.75	41.0	100	
	0	39.9	100	
400 ~ 450	3.0	38.1	100	
	1.5	28.8	100	
	0.75	22.8	100	
	0	17.0	78	

1) 数字は10個体平均、順化20日後調査

の制限要因となっていることが考えられる。また、DONNLYら³⁾が述べているように、培養幼植物体の葉緑素量が少ないために光合成能が低く従属栄養生長に頼らざるを得ないことも、培養幼植物体の複雑な生長様式の一因であると考えられる。

腋芽増殖条件について検討したところ、サイトカインを添加しても腋芽数は殆ど増加せず、腋芽の増加には糖の存在が必須条件であると考えられる。糖濃度が1.5%以上では、藤本ら⁵⁾が用いたサイトカニン濃度の2分の1 (BA 0.25 ppm + KIN 0.5 ppm) でも腋芽の増殖数は変わらず、一定レベル以上の糖濃度でサイトカニンの添加効果が現れると考えられる。このことについてはBoxus¹¹⁾、高野ら²¹⁾、や横田ら²⁴⁾も低いサイトカニン濃度で十分な量の腋芽数を得ている事実や、炭酸ガス施用で生体重量や腋芽数が増加することから、炭酸ガス施用条件下では少なくともサイトカニン濃度を藤本らが用いた4分の1程度に軽減させても、従来の腋芽数は確保できるものと考えられる。

培養幼植物体の順化率や順化後の生育についても、順化前の培養中の糖濃度や、炭酸ガス施用の有無と関係が深い。すなわち、培養幼植物体の葉面のエピクチクラワックス量が培養中の高糖濃度や炭酸ガス施用で増加し順化率は向上する。また、順化後の生育も良好で、乾物率も高くなる。

一般に、培養幼植物体は密閉条件下の高湿度、低照度環境条件で生育しているため、気孔の発達が不十分で開

閉調節機能が悪かったり^{6) 18) 19)}、水ストレスに対し弱く⁴⁾、葉表面のエピクチクラワックスの発達が悪い^{6) 18) 19)}ことや葉緑素含量が少なく、光合成能が低い^{4) 6)}ことから、順化時の環境の急激な変化に培養幼植物体が十分に順応できない⁷⁾と言われていることから考えて、本試験では炭酸ガス施用によってエピクチクラワックス量が増加し、光合成により培養幼植物体の独立栄養生長が向上されて、健苗化されたものと考えられる。

このように炭酸ガス施用は、培養幼植物体の生育を促すだけでなく、葉面のエピクチクラワックスの発達も促して順化の容易な健苗生産を可能にし、さらに、培地の低糖濃度化も図られることから、イチゴ培養苗の健苗化と効率的な大量生産に有効な手段と考えられる。

摘 要

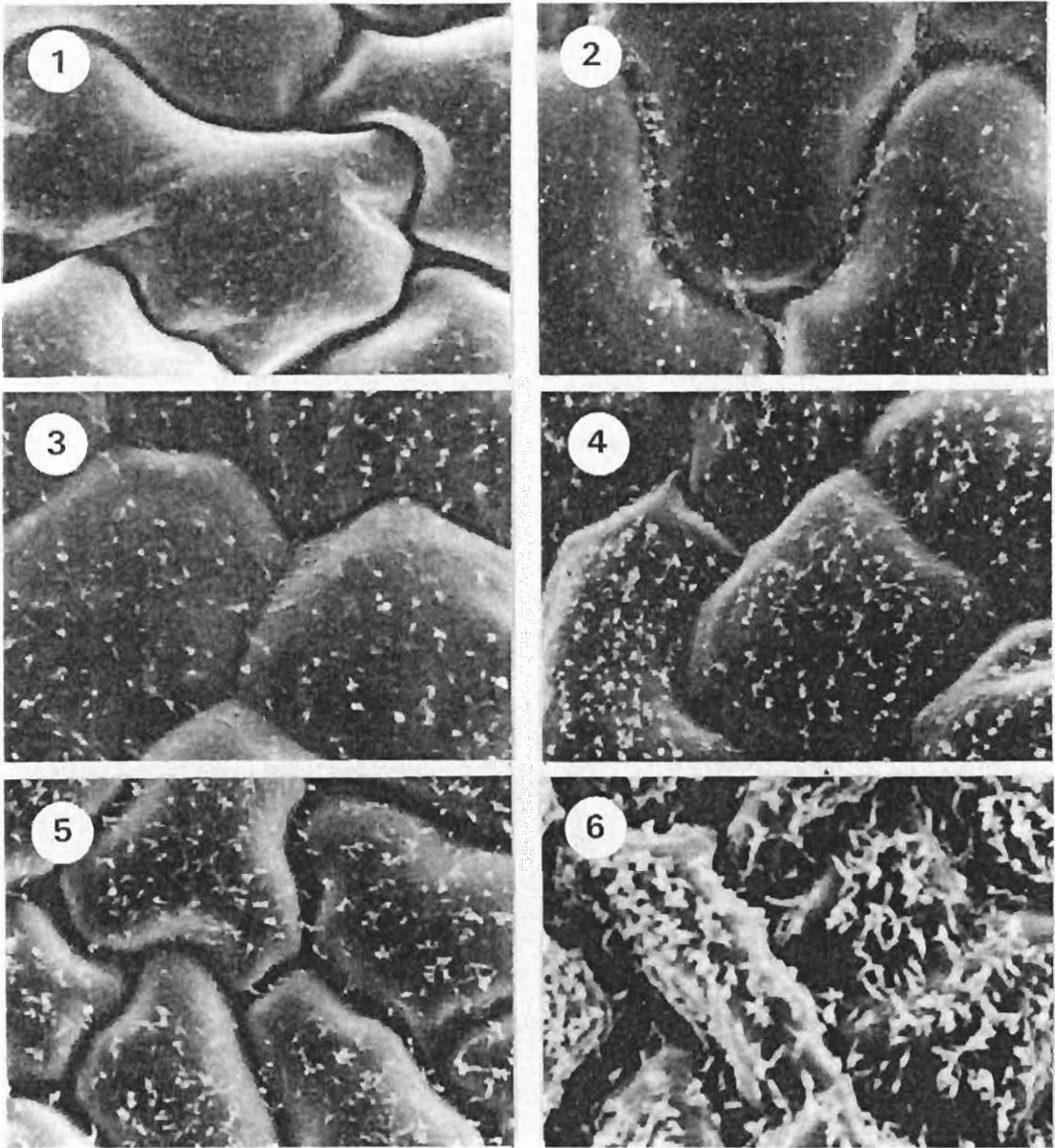
本試験は健苗生産を目的に、培養苗の生育と苗質に及ぼす培地中の糖及びホルモン濃度と、培養中の炭酸ガス施用の影響について検討した。

1. 炭酸ガス無施用の場合、明期での培養容器中の炭酸ガス濃度は100~200 ppm程度まで低下し、無糖培地での腋芽増殖は著しく抑制された。
2. サイトカニン濃度をBA 0.25 ppm、KIN 0.5 ppmと現行の2分の1にしても腋芽数は現行と変わらず、炭酸ガス施用により増加した。
3. 発根培地での培養幼植物体の生育や乾物重はショ糖濃度に比例して大となり、炭酸ガス施用はさらに生長を助長した。
4. 培養中の糖濃度の増加や炭酸ガス施用により、幼植物体葉表面のエピクチクラワックス量は増加し、順化率並びに順化後の生育も良好となった。

引 用 文 献

1. BOXUS, P. 1974. The production of strawberry plants by in vitro micropropagation. *J. Hort. Sci.* **49**: 209-210.
2. _____, M. QUOIRIN, and J. M. LAINE. 1977. Large scale propagation of strawberry plants from tissue culture. 130-143. In: J. Reinert and Y.P.S. Bajaj. (eds) *Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
3. DONNELLY, D.J. and W.E. VIDAUER. 1984. Pigment content and gas exchange of red raspberry in vitro and ex vitro. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **109**: 177-181.
4. EARLE, E. and R. LANGHANS. 1975. Carnation propagation from shoot tips cultured in liquid medium. *Hort. Science* **10**: 608-610.
5. 藤本まなみ・浅尾浩史・小島博文・小玉孝司 1987. 茎頂部の腋芽増殖によるイチゴの効率的な大量増殖. *奈良農試研報* **18**: 65-71.
6. GROUT, B.W.W. and M.J. ASTON. 1977. Transplanting of califlower plants regenerated from meristem culture. I Water loss and water transfer related to change in leaf wax and to xylem regeneration. *Hort. Res.* **17**: 1-7.
7. _____ and _____. 1978. Transplanting of califlower plants regenerated from meristem culture. II Carbon dioxide fixation and the development of photosynthetic ability. *Hort. Res.* **17**: 65-71.
8. 林真紀夫・児玉友孝・古在豊樹・渡辺一郎 1987. 植物組織培養苗の順化に関する研究(第3報) 順化装置内におけるCO₂施用がイチゴの生長に及ぼす影響. *園学要旨* 昭62春: 338-339.
9. KARTHA, K.K., N.L. LEUNG and K. PAHL. 1980. Cryopreservation of strawberry meristems and mass propagation of plantlets. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **105**(4): 481-484.
10. 古在豊樹・岩波好恵・富士原和宏 1987. 炭酸ガス施用が増殖培養時におけるスターチス (*Limonium Hybrid*)の小植物体の生長に及ぼす影響. *植物組織培養* **4** (1): 22-26.
11. _____・林真紀夫・広沢裕次・児玉友孝・渡辺一郎 1987. 植物組織培養苗の順化のための環境調節 (1) 順化装置の開発と栽培試験. *農業気象* **42**: 349-358.
12. KOZAI, T. and Y. IWANAMI. 1988. Effect of CO₂ enrichment and sucrose concentration under high photon fluxes on plantlet growth of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) in tissue culture during the preparation stage. *J. Japan Soc. Hort. Sci.* **57**(2): 279-288.
13. MURASHIGE, T. and F. SKOOG. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* **15**: 473-497.
14. 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**: 473-497.
15. 大沢勝次・山川邦夫・西貞雄 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.

16. ———・戸田幹彦・西貞雄 1974. 蕚培養の利用に関する研究Ⅲ. イチゴ蕚培養によるウイルスフリー株の大量育成. 野菜試報 A 1 : 41-57.
17. ——— 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.
18. SUTTER, E. and R. W. LANGHANS. 1979. Epicuticular wax formation on carnation plantlets regenerated from shoot tip culture. J. Amer. Soc. Hort. Sci. **104**(4): 493-496.
19. ——— and ———. 1982. Formation of epicuticular wax and its effect on water loss in cabbage plants regenerated from shoot-tip culture. Can. J. Bot. **60**: 2896-2902.
20. 鈴木柳子・川村邦夫・佐久間裕 1985. イチゴウイルスフリー苗の育成に関する研究. 宮城農セ研報 52 : 1-10.
21. 高野邦治・赤木博 1988. 茎頂培養によるイチゴの大量増殖法. 農及園 63 : 159-162.
22. WARDLE, K., V. DALSOU, I. SIMKINS and K. C. SHORT. 1983. Redistribution of rubidium in plantlets of *Chrysanthemum morifolium* Ram. c.v. Snowdon derived from tissue cultures and transferred to soil. Ann. Bot. **51**: 261-264.
23. ———, E. B. DOBBS and K. C. SHORT 1983. In vitro acclimatization of aseptically cultured plantlets to humidity. J. Amer. Soc. Hort. Sci. **108**: 386-389.
24. 横田一郎・藤重宣昭 1984. イチゴの茎頂組織培養による大量増殖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.
25. 吉原利一・羽生広道 1990. 組織培養による種苗の大量生産技術の開発. 農業電化 43 (3) : 7-11.
26. ZIV, M., G. MEIR and A. G. HALEVY. 1983. Factors influencing the production of hardened glaucous carnation plantlets. Plant Cell Tiss. Organ Cult. **2**: 55-65.



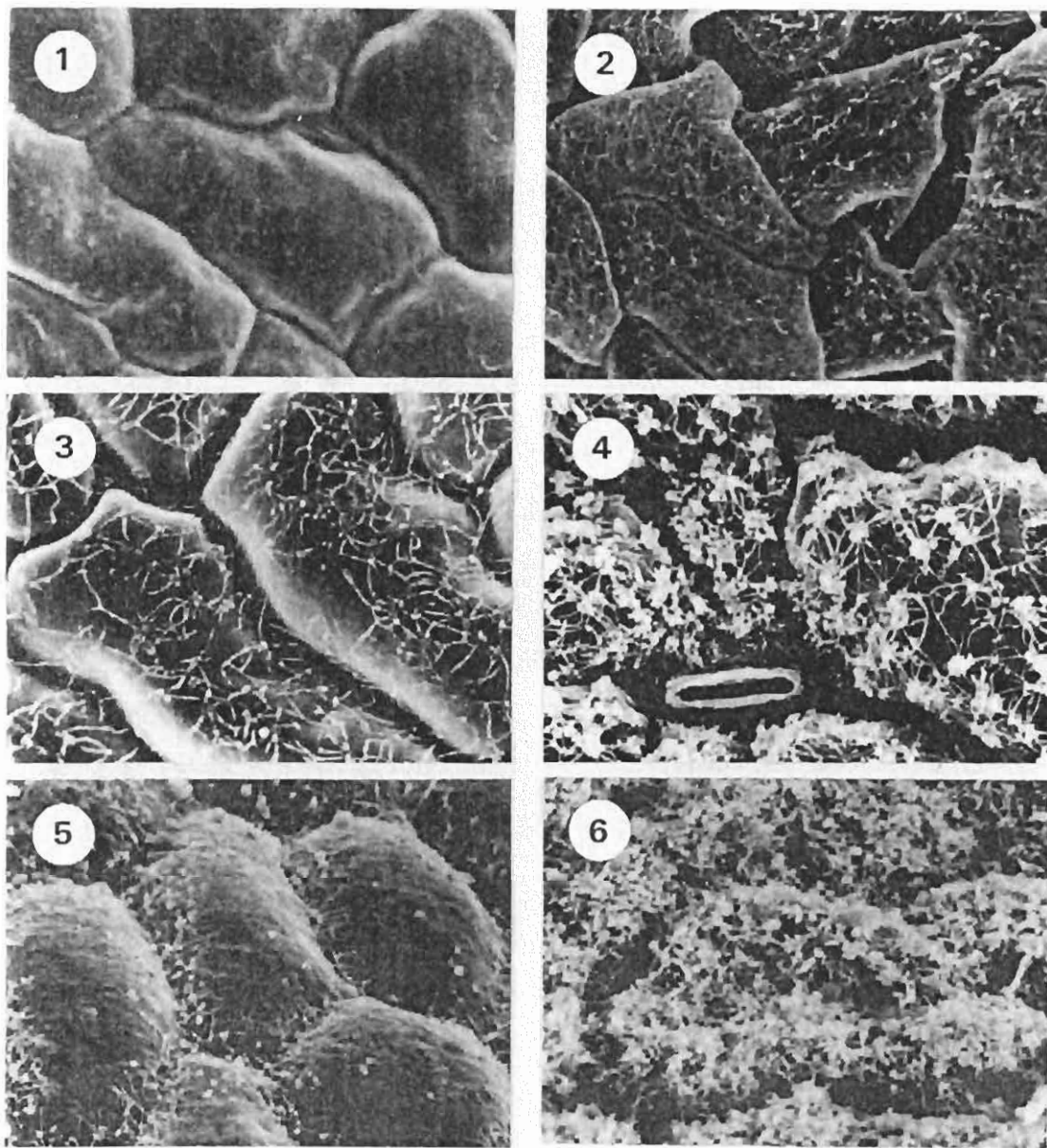
CO₂施用 無

有

図版1 イチゴ培養幼植物体葉表面のエピクチクラワックス量に及ぼす培地の糖濃度と培養中のCO₂施用の影響

1、2：0%ショ糖 3、4：1.5%ショ糖 5、6：3%ショ糖

Plate 1 Effect of sucrose concentration and CO₂ enrichment on the epicuticular wax formation of surface of leaves strawberry plantlets cultured in vitro.



表面

裏面

図版2 イチゴの生育ステージの違いによるエピクチクラワックス量の差異

1、2：培養個体 3、4：順化個体 5、6：成苗化個体

Plate 2 Epicuticular wax formation of strawberry plantlets of different growing period.