

イチゴ葉組織からのカルス誘導と植物体再生

荒井 滋・浅尾浩史

Callus Formation and Shoot Regeneration
from Leaf Explants of Strawberry

Shigeru ARAI and Hiroshi ASAO

Summary

The present experiments were carried out to establish a shoot regeneration from leaf explants for apply to breeding of strawberry.

1. Many calli were derived by the pretreatment before a leaf explants of strawberry cultivar "Nyoho" on the callusing medium.
2. The calli of strawberry cultivar "Toyonoka" were derived by the pretreatment of 3 days or more. However the callus formation was kept down by the long periods pretreatment with cutting the leaf explants after pretreatment. The callus formation was promoted by the renewable pretreatment medium.
3. Shoots regeneration from callus derived by the pretreatment of 2 days or more of strawberry cultivars except *Fragaria vesca* (UC-5) were not occurred.
4. Many regeneration plants of *F. vesca* (UC-5) were obtained, but "Toyonoka" and "Ascaberi" were not.
5. Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 0.1mg/ℓ 2,4-dichlorophenoxy-acetic acid (2,4-D) and 1mg/ℓ 6-benzyl-amynopurine (BA) were useful for callus formation and plant regeneration of strawberry.

Key words : strawberry, callus formation, shoot regeneration

緒 言

イチゴのような栄養繁殖性植物の組織培養を利用した大量増殖の手法として、茎頂由来の幼植物を用いた腋芽増殖技術が用いられてきた^{2,3,4,15,16,20,21)}。この方法は培養変異をおこす確率が極めて低いため、種苗の大量増殖に好適である。

しかしながら、新品種育成のための一手法として組織培養技術の利用を図るためには、むしろ培養変異を積極的に活用することも考えられる。腋芽増殖に比べ変異し易いと考えられている組織由来のカルスからの再分化技術^{10,11,12,13,14,17)}は、すでに細胞選抜に取り入れられている。また、今後研究の進展が最も期待されている遺伝子導入技術においては、組織からの再分化系の確立が不可欠であり、浅尾ら¹⁾、Jamesら⁵⁾、Nehraら⁹⁾および豊田ら^{18,19)}はこの培養系を用いて形質転換個体を得てい

る。

筆者らは、葉組織からの効率的カルス誘導と植物体再生条件について新しい知見を得たので、その結果を報告する。

材料及び方法

試験には '女峰'、'とよのか'、'宝交早生'、'アイベリー'、'アスカベリー' (未登録) の5品種と、野生種の *Fragaria vesca* (UC-5) を用い、すべて Murashige & Skoog (MS) 培地⁸⁾を基本に、ショ糖3%、ベンジルアミノプリン (BA) 0.125mg/ℓ、カイネチン (KIN) 0.25mg/ℓ を含む増殖培地で無菌的に継代して使用した。

1. 葉組織からのカルス誘導に及ぼす前処理の影響
外植体として '女峰' の培養幼植物体の小葉を約5mm

角に切り、切った葉小片をMS培地及び2,4-ジクロロフェノキシ酢酸(2,4-D) 0.2mg/l, BA 1mg/lを含むMS培地に1時間浸漬したのち、カルス誘導培地(MS、2,4-D 0.2mg/l, BA 1mg/l, 寒天(0.8%)に置床し、30日目にカルス化率を調査した。‘とよのか’の葉小片を用いて、前処理期間は1, 3, 10, 19日の4処理と、小葉の切断時期は前処理の前後の2処理を組み合わせ、処理20日目にカルス化率を調査した。また、小葉の切断は5mm角とした。さらに、前処理培地は2日おきに新しい同じ培地と交換した。

前処理期間中は25℃, 暗黒, 100rpm, 置床後は25℃, 100lx, 16時間照明下で本試験を行った。

2. 前処理期間及び培地のホルモン組成が再分化に及ぼす影響

各培養幼植物体の小葉を5mm角に切り、前処理培地(MS, 2,4-D 0.2mg/l, BA 1mg/l)に1, 2, 3日間浸漬したのちホルモン組成の異なるカルス誘導培地(MS, 2,4-D 0.1mg/lまたは0.2mg/l, BA 1mg/lまたは2mg/l, 寒天0.8%)に置床し、同一培地上でシュートを誘導した。

再分化カルス数, シュート数は、‘女峰’, *F. vesca* (UC-5)では置床後55日目に、その他の品種については90日目に調査した。

前処理期間中は25℃, 暗黒, 100rpm, 置床後は25℃, 100lx, 16時間照明下で試験を行った。

結 果

1. 葉組織からのカルス誘導に及ぼす前処理の影響

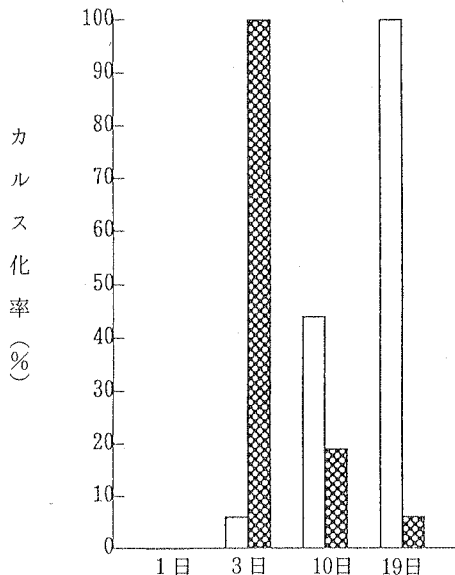
‘女峰’の5mm角の葉小片をカルス誘導培地に置床したところ、30日目ではカルス化は全く認められなかった。ところが、2,4-D 0.2mg/l, BA 1mg/lを含むMS培地に1時間浸漬し前処理を行ったところ、葉小片は100%カルス化した。しかし、ホルモンを含まないMS培地ではカルス誘導は認められなかった(第1表)。

‘とよのか’の場合は、置床前1日の前処理ではカルス化は認められなかったが、3日以上処理期間で高率にカルス化した。浸漬処理前に小葉を5mm角に切断した場合は、処理期間が長くなるに従ってカルス化率は向上し、19日間の処理では100%カルス化したのに対し、浸漬処理後に切断して、カルス誘導培地に置床した場合は、3日間処理で100%カルス化した。それより長期間の処理では逆にカルス化率は減少した(第1図)。

第1表 葉小片の浸漬前処理がカルス化に及ぼす影響¹⁾
Table 1. Effect of pretreatment of strawberry leaf on callus formation¹⁾.

処 理	置床数	カルス化数	カルス化率 (%)
無処理	57	0	0
MS培地浸漬	54	0	0
MS+2, 4-D, BA浸漬	58	58	100

¹⁾供試品種：女峰, 浸漬時間：1時間, 調査：置床後30日後



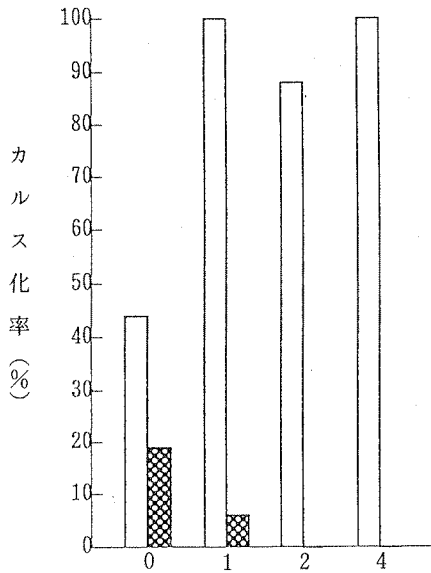
第1図 前処理期間(1~19日)と切断期間が‘とよのか’葉小片のカルス化に及ぼす影響

Fig. 1 Effect of pretreatment period on callus formation from leaf explants of strawberry

(*Fragaria* × *ananassa* cv. TOYONOKA)

□ : 処理前切断 ▨ : 処理後切断

また、前述の試験で、前処理期間中に培地を2日おきに新しい培地に更新した場合、処理前に葉小片に切断した区では、更新によりカルス化率は高くなったが、カルス誘導培地に置床する前に切断する区では、培地の更新回数が多くなるほど、カルス誘導は抑制された(第2図)。



第2図 前処理培地の交換回数(0~4)と切断期間が
‘とよのか’ 葉小片のカルス化に及ぼす影響

Fig.2 Effect of exchange frequency of pretreatment medium on callus formation from leaf explants of strawberry
(*Fragaria* × *ananassa* cv. TOYONOKA)

□: 処理前切断 ▨: 処理後切断

2. 前処理期間及び培地のホルモン組成が再分化に及ぼす影響

供試品種及び *F. vesca* (UC-5) は、培地に置床後20日目で100%カルス化した。*F. vesca* (UC-5) をのぞき、そのほかの品種では前処理期間が2日以上になると、誘導されたカルスからのシュートの形成は認められなかった。再分化率は品種間差が大きく、*F. vesca* (UC-5) が最も高く、次いで‘女峰’、‘宝交早生’、‘アイベリー’の順に高く、‘とよのか’、‘アスカベリー’は低率であった。本試験で用いたホルモン組成では、再分化率に大きな差は認められなかったが、2,4-D 0.1mg/ℓ, BA 1 mg/ℓの組み合わせが若干優れていた(第2表)。

考 察

本試験では、培養幼植物体を外植体を用いることにより、供試各品種で安定的なカルスの誘導条件を設定し、再分化系を確立した。

イチゴの組織培養では、培地に置床した外植体の褐変が問題になることが多く、その回避策として、培地への活性炭の添加が一般的に行われてきた。この方法を用いることにより褐変は抑制されるが、カルス化率の低下や

第2表 前処理期間及び培地のホルモン組成がイチゴ品種の再分化に及ぼす影響¹⁾

Table 2. Effect of pretreatment period and hormone concentrations on shoot regeneration of strawberry cultivars¹⁾.

品 種	前処理 日 数	2,4-D BA 置床数	0.1mg/ℓ 1.0mg/ℓ		0.2mg/ℓ 1.0mg/ℓ		0.1mg/ℓ 2.0mg/ℓ		0.2mg/ℓ 2.0mg/ℓ	
			再分化 カルス数	shoot 数	再分化 カルス数	shoot 数	再分化 カルス数	shoot 数	再分化 カルス数	shoot 数
女 峰	1	50	25	63	17	42	8	8	25	33
	2	50	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	50	0	0	0	0	0	0	0	0
とよ の か	1	50	8	9	8	8	6	7	5	5
	2	50	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	50	0	0	0	0	0	0	0	0
宝交早生	1	50	20	45	16	33	11	15	12	18
	2	50	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	50	0	0	0	0	0	0	0	0
アイベリー	1	50	16	17	8	8	10	10	0	0
	2	50	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	50	0	0	0	0	0	0	0	0
アスカベリー	1	50	6	6	4	5	4	4	3	5
	2	50	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	50	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>F. vesca</i> (UC-5)	1	50	17	42	16	17	8	8	8	8
	2	50	16	35	17	42	17	18	33	50
	3	50	9	10	25	83	33	100	8	33

¹⁾ 女峰、*F. vesca* は置床後55日目、その他は90日目に調査

外植体の生育抑制が問題であった。また、外植体として未展開の若い葉組織を用いる方法^{9, 10)}や培地のオーキシン濃度を下げる¹¹⁾ことにより褐変を抑制してきた。

筆者らは、外植体をカルス誘導液体培地に短期間浸漬処理することにより、褐変を完全に抑制した。この理由は、液体培地への外植体の浸漬期間が長くなるに従い、さらに培地の交換回数を重ねることにより、褐変の主因と思われるフェノール物質が洗い流されたためと考えられる。

フェノール物質は、外植体の切断によりイチゴ組織から誘導されると考えられるので、外植体の調製時期と浸漬処理期間により褐変率とカルス化率は影響を受ける。すなわち、浸漬処理前の切断では、浸漬処理期間が長くなるほど、切断により誘導された多量のフェノール物質は洗い流されて減少するが、浸漬処理後の切断ではフェノール物質の誘導量が少ないと考えられ、短期間の浸漬処理のほうがむしろカルス化率は良く、長期間の浸漬処理では、外植体のカルス化能が減少するのではないかと考えられる。

カルスからの再分化に及ぼす2,4-DとBAのホルモンバランスを検討した結果、豊田ら¹²⁾の報告のとおり、Nehraら¹³⁾より低レベルの2,4-D 0.1mg/lで再分化が良好であった。

供試品種間で再分化率に差が認められたのは、誘導カルスの内生ホルモンバランスが、遺伝的に異なる品種間で違うためと考えられる。また、同じ品種であっても試験管内で育成された外植体より、温室で育てられた外植体からの再分化率が高い¹⁴⁾のも育成過程の違いによる内生ホルモンバランスの違いが影響しているものと考えられる。

液体培地での浸漬処理期間が2日以上になると、20日目のカルス化率は向上したが、*Fragaria vesca* (UC-5)を除き培養90日目の再分化は認められなくなった。浸漬処理期間が短くても、90日の培養期間中には100%カルス化するため、前処理期間は再分化を考慮して1日で十分であると考えられる。

以上のように、品種間差は多少あるものの、無菌培養幼植物体を用いたイチゴ葉組織からの再分化系が確立できたことにより、細胞選抜や形質転換に利用が可能となった。しかしながら、Marcotrigianoら¹⁵⁾が指摘しているように、組織培養により得られた再分化個体の組織の不安定性や遺伝的変異についても十分考慮しながら、育種の一手法として利用する必要がある。

摘 要

本試験は育種利用を目的に、イチゴ葉組織からの再分化技術を検討した。

1. '女峰'では、カルス誘導培地に置床する前に葉小片前処理することにより、カルス形成は向上した。
2. 'とよのか'では3日間以上の前処理で高率にカルス化した。しかしながら、前処理後に小葉を切断した場合は、3日間以上の前処理でカルス化は抑制された。また、前処理培地の更新回数が多いほどカルス化は促進された。
3. *Fragaria vesca* (UC-5)をのぞき、2日間以上の前処理で誘導されたカルスからはシュート形成は認められなかった。
4. *F. vesca* (UC-5)では多くの再分化個体を得られたが、'とよのか'や'アスカベリー'では再分化個体はわずかであった。
5. カルス誘導並びに再分化培地は、2,4-D 0.1mg/l, BA 1mg/lを含むMS培地が適当であった。

引用文献

1. 浅尾浩史・荒井滋・佐藤隆徳・平井正志・日比忠明. *Agrobacterium tumefaciens* によるイチゴ形質転換体の作出. (組織培養学会 投稿中)
2. Boxus, P. 1974. The production of strawberry plants by in vitro micropropagation. *J. Hort. Sci.* 49:209-210.
3. ———, 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.
4. 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大量増殖. *奈良農試研報* 18:65-71.
5. JAMES, D.J., A.J. PASSEY and D.J. BARBARA. 1990. *Agrobacterium*-mediated transformation of the cultivated strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch) using disarmed binary vectors. *Plant Science* 69:79-94.
6. 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.
7. MARCOTRIGIANO, M. and P. A. MORGAN. 1987. Histogenic instability in tissue culture proliferated strawberry plants. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 112:583-587.
 8. MURASHIGE, T. and F. SKOOG. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15:473-497.
 9. NEHRA, N.S., R.N. CHIBBAR, K.K. KARTHA, R.S. S. DATRA, W.L. CROSBY and C. STUSHNOFF. 1991. *Agrobacterium* mediated transformation of strawberry calli and recovery of transgenic plants. *Plant Cell Reports* 9:10-13.
 10. ———, C. STUSHNOFF and K.K. KARTHA. 1990. Regeneration of plants from immature leaf-derived callus of strawberry (*Fragaria × ananassa*). *Plant Science* 66:119-126.
 11. 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.
 12. 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.
 13. ———・戸田幹雄・西貞雄 1974. 薬培養の利用に関する研究Ⅲ. イチゴ薬培養によるウイルスフリー株の大量育成. 野菜試報 A1:41-57.
 14. ——— 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.
 15. 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.
 16. 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.
 17. TOYODA, H., K. HORIKOSHI, K. INABA and S. OUCHI. 1990. Plant regeneration of callus tissues induced from leaf explants of strawberry. *Plant Tissue Cult. Lett.* 7(1):38-41.
 18. 豊田秀吉・細井好之・住谷一樹・堀越浩二・大内成志 1991. アグロインフェクション法によるメロン、トマトおよびイチゴの形質転換植物の育成. 第12回組織培養学会要旨:112.
 19. ———・—————・—————・—————・塩見敏樹・————— 1991. イチゴおよびトマトにおける形質転換植物の作出. 日植病報 57(3):442.
 20. 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.
 21. 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.