順化操作不要化のためのイチゴ組織培養苗の培養期間と生育の条件

古賀正明・平島敬太・伏原 肇・三井寿一・中原隆夫

福岡県農業総合試験場生産環境研究所 818-8549 福岡県筑紫野市吉木

The Effects of the Length of the Culture Period and Size of the Plantlets at the Potting on Survival of the Tissue-Cultured Strawberry Plantlets Raised without the Operation of Acclimatization

Masaaki Koga, Keita Hirashima, Hajime Fushihara, Hisakazu Mitsui and Takao Nakahara

Institute of Agro-Environmental Science, Fukuoka Agricultural Research Center, Yoshiki, Chikushino, Fukuoka 818-8549

Summary

The conditions to eliminate the operation of acclimatization of tissue-cultured strawberry plantlets were examined.

Strawberry plantlets cultured in the rooting medium following propagation culture were transplanted into small pots without the operation of acclimatization, and were raised on the shelf system with manual irrigation. The percentage of plantlets taking root and surviving in the pots after transplantation increased, as the culture period in the rooting medium was lengthened. And, the survival percentage of the plantlets, cultured for 54 days in the rooting medium, after potting reached 95 to 100%. Even in cases where the plantlets were cultured for only 35 days in the rooting medium, the plantlets which had five or more leaves, or whose longest roots measured 40 mm or more were all able to survive after potting.

In the suitable season for potting, from late April to early June, the plantlets, cultured for 54 days in the rooting medium, were potted several times without the operation of acclimatization, and were raised with cheesecloth cover and water spraying three times per day by microsprinklers. Consequently, 96 to 100% of these plantlets survived, indicating that the operation of acclimatization of well-cultured strawberry plantlets is not necessary prior to transplanting them into the field.

Key Words: strawberry, tissue culture, acclimatization, raising.

緒 言

イチゴの促成栽培において定着しているポット育苗法は、ランナー子株をポットに採苗し、育成するものである。採苗に当たっては、6ヶ月以上の長期間にわたる親株管理と採苗作業が必要であり、これらの労力は多大である。そこで、採苗の省力化が強く望まれている。採苗の省力化の手段の一つとして、ランナー子株の代わりに組織培養苗を利用することが考えられる。このためには大量の組織培養苗を鉢上げし、活着させる必要がある。

この鉢上げから活着を省力的かつ少ない設備投資で行うためには、組織培養苗をポットに詰めた培養土にそのまま鉢上げし、慣行の育苗法により活着させ、育成することが望ましい。しかし、このような方法によると、容器内で培養した通常の苗は枯死することから、順化のた

めに一定の操作が必要である(駒嶺ら, 1990)。増殖の過程を経ていないイチゴの茎頂培養苗で95~100%の活着率を得た Sobczykiewicz (1979)の報告では、この順化操作の必要性は述べられていない。また、高山ら(1985b)は、固形培地や液体培地で増殖した苗を順化操作を行わずに鉢上げする方法について検討し、最高約70%の活着率を得ている。ところが、これらの報告以降に出版された書籍には、液体培地で増殖した苗について述べた高山(1989)のものを除き、イチゴ組織培養苗の鉢上げに際して順化操作を行う必要がないことを紹介したものは見られない。代わりに、鉢上げ直後に高湿度を保つため、2週間のプラスチックフィルム被覆(Boxusら, 1984)や4~5日間のプラスチックフィルム被覆とミストかん水の併用(高野, 1990)の順化操作を行う方法が紹介されている。順化操作を行わず、ランナー子株に対して行う方法により直接育苗する方が省力的かつ省施設的であるにもかかわらず、これが可能であることが書籍中で紹介されていない原因としては、検討された組織培養苗が増殖の過程

を経たものではないこと (Sobczykiewicz, 1979), 活着率が十分に高くないこと (高山ら, 1985b) および培養期間や生育状態の異なる組織培養苗を用いて活着との関係を調査した文献が見当たらないこと等が考えられる。

そこで, 組織培養による増殖に広く利用されている 2 種の固形培地 (横田・藤重, 1984; 高山ら, 1985a) で増殖した苗について, ポットへ直接鉢上げし, 順化操作を行わずに育苗した場合にも高い活着率を得るための組織培養苗の培養期間と生育状態の条件について検討した。

材料および方法

基本培地には $30 \text{ g} \cdot \text{liter}^{-1}$ のショ糖を添加し, 無機塩のみを 1/2 に減じた MS (Murashige・Skoog, 1962) 培地を用いた。これに $1 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ の N-(2-クロロ-4-ピリジル)-N'-フェニルウレア (4-PU) を添加したもの (高山ら, 1985a) を増殖培地 A, $0.5 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ のベンジルアデニン (BA) と $1 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ の Kinetin を添加したもの (横田・藤重, 1984) を増殖培地 B とした。また, 基本培地に $0.01 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ のナフタレン酢酸 (NAA) を添加し, 発根培地とした。増殖培地 A・B および発根培地のいずれも pH を 5.8 に調整したのち, $2 \text{ g} \cdot \text{liter}^{-1}$ のゲランガムを加え, プラントボックス (柴田科学社製, $60 \times 60 \times 100 \text{ mm}$) 当たり 40 ml 分注した。供試したイチゴ組織培養苗は, 'とよのか' のランナーの茎頂を培養し, 葉数 8~12 枚となるまで養成したものである。なお, 培養は 25°C , 約 6,000 lx, 16 時間照明下で行い, 光源として白色蛍光灯 (日立製作所社製, FLR40SW/M-B 型) を用いた。

1. 発根培地での培養期間および組織培養苗の生育状態が活着に及ぼす影響

イチゴ組織培養苗を増殖培地 A および B にプラントボックス当たり 4 株ずつ移植し, 42 日間培養して腋芽の集塊を得た。集塊からメスで切り取った腋芽を発根培地にプラントボックス当たり 4 株ずつ移植した。発根培地での培養期間は 21, 35 および 54 日間の 3 水準とした。発根培地での培養後, 頂芽および新たに生じた腋芽を根が付いたままメスで互いに分離し, 葉数および最も長い根の長さ (以下, 根長) を測定した後, 葉数 5 枚以上のものは葉を 4 枚に調整した。すべての苗を, 1993 年 10 月 28 日に, 小型育苗ポット専用培養土 115 ml を詰めた小型育苗ポット (伏原ら, 1995) に各試験条件につき 20 株鉢上げした。なお, 小型育苗ポット専用培養土の組成はバーミキュライト 4:ピートモス 3:ぼら 1.5:製紙残さ炭化物 1.5 であり, 肥料成分含量は $\text{N } 150 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$, $\text{P}_2\text{O}_5 \text{ } 500 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$, $\text{K}_2\text{O } 150 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ である。苗の順化操作は行わずに, ガラス室内の棚式育苗システム (伏原ら, 1995) で 9 時および 16 時に各 1 回の如露によるかん水で同年 12 月 9 日まで 42 日間育苗した後, 苗の活着状況を調査した。気温および湿度は, 鉢上げ日から 2 週間について, 棚式育

苗システムの架台の高さである地上約 70 cm の位置で直射日光を遮断し, 通風性のある状態で測定した。

2. 鉢上げ時期が活着に及ぼす影響

増殖培地 B で増殖後, 発根培地で 54 日間培養した組織培養苗を, 1996 年 4 月 23 日, 5 月 7 日, 5 月 24 日, 6 月 10 日の 4 時期に各々 50 株, 試験 1 と同様に鉢上げした。鉢上げ後は苗の順化操作を行わず, 遮光率 50 % の寒冷紗をトンネル掛けした露地の棚式育苗システムでかん水を行った。かん水は, 9 時, 12 時および 15 時から 5 分間, 棚式育苗システムの架台より約 10 cm 上部の位置に 90 cm 間隔で設置したスプリンクラー (マイクロスプリンクラー, DH-882 型, サンホープ社製) により, 約 $2.5 \text{ kg} \cdot \text{cm}^{-2}$, $2.2 \text{ liter} \cdot \text{min}^{-1}$ の散水強度で行った。30 日間育苗したのち, 苗の活着状況を調査した。気温および湿度は, 4 月 23 日から 6 月 10 日の 2 週間後の 6 月 24 日まで試験 1 と同様に測定した。

結 果

1. 発根培地での培養期間および組織培養苗の生育状態が活着に及ぼす影響

発根培地での培養期間が組織培養苗の活着に及ぼす影響を第 1 図に示した。発根培地での培養期間が長いほど鉢上げ後の活着率は高く, 54 日間培養した苗の活着率は 95 または 100 % に達した。また, 本試験で設定した発根培地での培養期間のいずれにおいても, 増殖培地のサイトカイニンの相違による苗の活着率の差は認められなかった (Fisher の正確確率検定, 5 % 水準)。

組織培養苗の葉数と根長が活着に及ぼす影響を第 2 図

Fig. 1. The effects of the length of the culture period in the rooting media and different cytokinins in the propagation media on the surviving of strawberry plantlets. The analysis was conducted on the 42nd day after transplantation into small pots and raising without the operation of acclimatization.

Fig. 2. The effects of the No. of leaves and length of the longest root on the surviving of strawberry plantlets. The plantlets were cultured in different three periods in rooting media following propagation with different cytokinins, transplanted into small pots and raised without the operation of acclimatization. Measurement of the size of the plantlets and the analysis of life and death of the plantlets was conducted at the time of transplantation and on the 42nd day after that, respectively. Propagation medium A contained $1.0 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ of 4-PU, whereas Propagation medium B contained $0.5 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ of BA and $1 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ of Kinetin. 4-PU, N-(2-chloro-4-pyridyl)-N'-phenylurea, is a synthetic cytokinin. ◎: Mean size of the plantlets. ○: A survivor after transplantation. ●: A non-survivor after transplantation.

に示した。発根培地での培養期間が長いほど鉢上げを行う苗の葉数は多く、根長も長かった。また、発根培地での培養期間にかかわらず、葉数が多く、根長が長い苗ほど鉢上げ後の活着率が高い傾向にあった。発根培地での培養期間が21日間で増殖培地Bを用いた場合には、葉数4枚以上の苗はすべて活着した。同じ培養期間で増殖培地Aを用いた場合には、活着した苗に関する葉数や根長の条件は特定できなかった。培養期間が35日間では、いずれの増殖培地を用いても、葉数5枚以上もしくは根長40 mm以上の苗は鉢上げ後すべて活着した。54日間培養では、増殖培地Aを用いた場合の発根していない1個体を除き、すべての個体が活着した。葉数4枚以下で根長40 mm未満の苗の活着の割合は、増殖培地Aを用い、発根培地での培養期間が21、35および54日間の場合には各々5/10、5/10、および2/3、増殖培地Bを用いた場合には同様に各々5/12、5/7および6/6であり、発根培地での培養期

間が長いほど活着率が高まる傾向が認められた。

鉢上げ日から2週間のガラス室内の1日の平均気温は13.3~21.0℃、最高気温は19.0~32.1℃、最低気温は9.0~16.0℃の範囲で推移した。また、1日の平均湿度は52~97%、最高湿度は72~100%、最低湿度は29~89%の範囲内であった。特に、昼間の湿度については、ほぼ毎日50%以下に低下した。

2. 鉢上げ時期が活着に及ぼす影響

組織培養苗の鉢上げ時期が活着に及ぼす影響を第1表に示した。4月23日、5月7日、5月24日および6月10日のいずれに鉢上げした場合にも活着率は96~100%で、100%と有意差が認められない(Fisherの正確確率検定、5%水準)ほど高率であった。

4月23日から6月10日の2週間後の6月24日までの1日の平均気温は14.5~24.8℃、最高気温は16.5~29.1℃、最低気温は9.1~22.7℃の範囲で推移した。また、1日の平

Table 1. The effect of the season of potting on the survival of tissue-cultured strawberry plantlets (1996).

Potting date	No. of transplants	30th day after the potting	
		No. of survivors	Percentage of survivors
April 23	50	49	98
May 7	50	48	96
May 24	50	50	100
June 10	50	50	100

The plantlets were transplanted into small pots without the operation of acclimatization. They were raised with cheesecloth cover and water spraying three times a day by microsprinklers.

均湿度は49~100%, 最高湿度は58~100%, 最低湿度は12~98%の範囲内であった。6月10日鉢上げの場合を除き、鉢上げ後の昼間の湿度は50%付近を推移することが多かった。

考 察

イチゴ組織培養苗を鉢上げする際のプラスチックフィルム被覆 (Boxus ら, 1984) やプラスチックフィルム被覆とミストかん水の併用 (高野, 1990) 等による順化操作を行わず、棚式育苗システムで通常のかん水法により直接育苗するための条件について検討した。試験1の結果、発根培地で54日間培養することにより、順化操作を行わず、如露によるかん水で直接育苗しても活着可能な組織培養苗が95%以上の確率で得られることが明らかとなった (第1図)。これまで、固形培地で増殖したイチゴ組織培養苗の鉢上げに順化操作が必要とされていたのは、発根培地での培養期間が2~3週間 (高野, 1990) あるいは4~6週間 (Boxus ら, 1984) と比較的短期間であり、順化操作を行わずに生存するために必要な組織培養苗の生育が十分確保できなかったことによると考えられる。これは、発根培地での培養期間が21および35日間の今回の結果から支持される。また今回の結果、活着の指標としては、根長と共に葉数が重要であり、発根培地での培養期間が35日間でも葉数5枚以上もしくは根長40 mm以上の苗を鉢上げすることにより、順化操作を行わなくても100%活着できることが判明した (第2図)。増殖の過程を経ない茎頂培養苗で95~100%の活着率が得られる条件として Sobczykiewicz (1979) により報告された3~5枚の葉と数本の根をもつことは、今回得られた苗の条件にかなり近いと考えられる。さらに、葉数4枚以下で根長40 mm未満の苗について見ると、発根培地での培養期間が長くなるにつれ高率で活着する傾向が認められたことから、葉数や根長以外の苗の要因が活着に関係しているものと推定される。この点については、今後さらに検討する必要がある。

試験1の結果に基づき、順化操作を行わない組織培養苗

の鉢上げ法の実用場面での適用の可否を明らかにするため、予想される適期に鉢上げを行った。なお、鉢上げ時の組織培養苗の生育状態がランナー子株から得た苗のものより劣ることから、最も初期の鉢上げ日を慣行栽培での採苗開始時期より1ヶ月程度早い4月23日に設定した。一方、最も後期の鉢上げ日は、慣行の採苗終了期と同時期の6月10日とした。試験の結果、増殖培地Bで増殖し、54日間発根培地で培養した苗の活着率は、いずれの鉢上げ時期にも96~100%と極めて高率であった。これらの高い活着率が得られた試験1および2について鉢上げ日から2週間の気温と湿度の推移を総合すると、気温は9.0~32.1℃、湿度は12~100%の比較的広い範囲で変動した。また、試験2において測定した期間の気温および湿度は平年値から大きく外れることなく推移した (データ略)。これらのことから、試験2で検討した順化操作不要化のための培養期間の条件は、多くの年の鉢上げ適期に適用できるものと考えられる。さらに、現在開発中の小型ポット (小野, 1994) やセル成型トレイ (小林・小林, 1995; 松尾ら, 1995; 石原ら, 1994) を用いた棚式育苗システム以外の省力的育苗法においても、生育を十分に促した苗は順化操作を行わずに活着できる可能性がある。

試験1においては、発根培地での培養期間が35日間でも葉数5枚以上もしくは根長40 mm以上の苗を鉢上げすることにより、100%の活着率を得た。この条件が鉢上げ適期についても適用できるものであるかについては今後の検討を要するが、試験1と2での鉢上げ後2週間の気温および湿度の変動範囲には決定的と思われる相違が見られなかったことおよび試験2の結果から、この条件に近い組織培養苗は鉢上げ適期にも順化操作を行わずに活着できるものと予想される。

本研究により、順化操作を行わないことで、ビニル被覆やミストかん水等の施設と苗の植え替えや移動等の労力を不要にできることが示唆された。しかしながら、今回適用性が示された順化操作不要化の条件は、前述のとおり、Boxus ら (1984) や高野 (1990) の報告に比較して発根培地での培養に長期間を要する。このため、今後は高い活着率を保ちつつ培養期間の短縮をはかる必要がある。

発根培地での培養期間にかかわらず、十分に生育した苗は100%活着した (第2図) ことから、発根培地での生育を促進することにより、高い活着率を保持しつつ培養期間の短縮が期待できる。織田 (1996) は、シヨ糖濃度5%のホルモン無添加培地でイチゴ組織培養苗を培養した場合、シヨ糖濃度3%の場合に比較して苗の草丈、展開葉数、葉面積、新鮮重および乾燥重がいずれも優ることを確認している。また、Kozai ら (1991) は、通気フィルム被覆の培養器使用、強光照射の条件下において、外気の炭酸ガス濃度を高め培地のシヨ糖を除いた場合には、通常の炭酸ガス濃度と2%のシヨ糖濃度の場合に比較してイチゴ組織培養苗の新鮮重、乾物重が重くなり、展開葉数も多くなる

ことを報告している。荒井ら(1991)は、培地のショ糖濃度が0~3%の範囲では、高濃度の炭酸ガスを施用することにより、苗の新鮮重が重くなり、乾物率が高まり、エピッククラックス量が増加し、順化後の活着率が向上することを報告している。このように今後は、培地中の糖濃度を高めたり、高濃度の炭酸ガスを施用することにより植物体の生育を促進し、発根培地での培養期間の短縮について検討を行う必要がある。また、液体振とう培養法(高山ら, 1985b; 小田ら, 1993; 米津ら, 1993)は、増殖効率、培養密度が共に高いこと等から、組織培養苗生産の低コスト化の上で注目されており、このような増殖法の場合にも順化操作の不要化の検討が望まれる。

摘 要

イチゴ組織培養苗の順化操作を不要とする条件について検討した。

増殖培養に続く発根培地での培養後、イチゴ組織培養苗を小型育苗ポットに鉢上げし、順化操作を行わずに棚式育苗システムで如露による灌水で直接育苗した。発根培地での培養期間が長い苗ほど活着率が高く、54日間培養したものでは活着率は95または100%に達した。発根培地での培養が35日間の場合でも、葉数5枚以上もしくは根長40mm以上の苗は、100%の割合で活着した。

増殖後54日間発根培地で培養した苗を、鉢上げ適期と想定される4月下旬から6月上旬に鉢上げし、順化操作を行わずに寒冷紗を掛けた棚式育苗システムでスプリンクラーによる灌水で育苗したところ、活着率はいずれも96~100%であった。以上のことから、発根培地で十分に養成した組織培養苗を用いることにより、順化操作を不要にできると考えられた。

引用文献

- 荒井 滋・浅尾浩史・小畠 博. 1991. イチゴ培養苗の生育と苗質における炭酸ガス施用効果. 奈良農試研報. 22: 9-16.
- Boxus, P., C. Damiano and E. Brasseur. 1984. Strawberry. p.453-486. In: P. V. Ammirato, D. A. Evans, W. R. Sharp and Y. Yamada (eds.). Handbook of plant cell culture. 3. Crop Species. Macmillan Publishing Company, New York. Collier Macmillan Publishers, London.
- 伏原 肇・林 三徳・柴戸靖志・山下 満・宮崎虎男. 1995. イチゴ棚式育苗システムの開発. (第1報)器材の開発. 福岡農総試研報. 14: 57-60.
- 石原良行・植木正明・四方田純一・高野邦治・大谷晴美. 1994. セル成型苗利用によるイチゴ育苗の省力化. 栃木農研報. 42: 65-77.
- 小林 保・小林尚武. 1995. イチゴ育苗の管理委託を目的としたセル成型苗による2段階仮植育苗法. 園学雑. 64(別1): 346-347.
- 駒嶺 穆・小島邦彦・三川 潮・庄野邦彦・原田 宏・日向康吉・藤村達人・山口彦之編. 1990. 植物バイオテクノロジー事典. p.125. 朝倉書店. 東京.
- Kozai, T., K. Iwabuchi, K. Watanabe and I. Watanabe. 1991. Photoautotrophic and photomixotrophic growth of strawberry plantlets in vitro and changes in nutrient composition of the medium. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 25: 107-115.
- 松尾孝則・大串和義・田中龍臣. 1995. 促成イチゴの省力的育苗技術の開発. (第2報)セル成型トレイ育苗におけるセルの形状および密度が生育、収量に及ぼす影響. 園学雑. 64(別1): 117-118.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497.
- 小田文明・北野智一・米津雄一・寺島俊彦. 1993. 組織培養利用によるイチゴ苗生産に関する研究. (第1報)液体培地によるイチゴの大量増殖. 園学雑. 62(別2): 32-33.
- 織田弥三郎. 1996. 培地中のBAおよび糖濃度が培養容器内のCO₂濃度とイチゴ小植物体の成長に及ぼす影響. 園学雑. 65(別1): 318-319.
- 小野 誠. 1994. イチゴの小型ポットにおける育苗. 園芸学会九州支部研究集録. 3: 115-116.
- Sobczykiewicz, D. 1979. Heat treatment and meristem culture for the production of virus-free strawberry plants. Acta Horticulturae 95: 79-82.
- 高野邦治. 1990. 野菜の種苗増殖の実際 <A> 栄養繁殖性野菜 2. イチゴ. p.93-100. 最新バイオテクノロジー全書編集委員会編. 最新バイオテクノロジー全書②野菜の組織・細胞培養と増殖. 農業図書. 東京.
- 高山真策. 1989. クローン増殖と人工種子. p.128-129. オーム社. 東京.
- 高山真策・天羽孝子・深野真弓・大沢勝次. 1985a. ジャーファーマンターによるイチゴの大量繁殖に関する研究. (第1報)無菌培養系の確立と低温培養による系統保存. 園学要旨. 昭和60春: 218-219.
- 高山真策・元川寛子・天羽孝子・深野真弓・大沢勝次. 1985b. ジャーファーマンターによるイチゴの大量繁殖に関する研究. (第2報)液体培養法の検討ならびに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. 昭和60春: 220-221.
- 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. 昭和59春: 240-241.
- 米津雄一・北野智一・小田文明・寺島俊彦. 1993. 組織培養利用によるイチゴ苗生産に関する研究. (第2報)イチゴの大量増殖におけるコスト低減について. 園学雑. 62(別2): 34-35.