LARGE SCALE PROPAGATION OF *FRAGARIA ANANASSA* PLANTLETS THROUGH SHAKE CULTURE; THE EFFECT OF CYTOKININ AND ABSCISIC ACID(ABA) ON SHOOT GROWTH

液体振とう培養によるイチゴ (*Fragaria ananassa*) の大量増殖に関する研究
—シュートの成育におよぼすサイトカイニンとABAの影響—

Naoko Tsumaki and Shinsaku Takayama

School of High Technology for Human Welfare
Department of Biological Science and Technology, Tokai University
317 Nishino, Numazu, Shizuoka 410-03, Japan
TEL:0559-68-1111(Ext.2104) FAX:0559-68-1151

(Received 26, November 1992 Accepted 11, March 1993)

ABSTRACT

The effects of different cytokinin levels on multiplication of axillary shoots during culture on agar medium and subsequent growth of shoots in liquid shake culture were examined. The number of axillary shoot buds was highest (about 100) in culture medium containing 1mg/l of 4PU (one kind of cytokinin).

Tissue segments with multiple shoot buds thus obtained were further grown in liquid medium by shake culture. The growth of shoot buds into plantlets in shake culture was examined for liquid media containing 0, 0.1 and 1 mg/l 4PU in combination with 0, 0.1, 0.3 and 1mg/l ABA. The growth was most favorable in the medium containing 1.0mg/l 4PU in combination with 0.1 mg/l ABA. Individual shoots grown under this condition were easily separated by hands, transplanted, and established satisfactorily in soil.

KEY WORDS: *Fragaria ananassa*, strawberry, tissue culture, propagation.

1. はじめに

イチゴはランナーによる栄養繁殖が主体であるため、ウイルスの感染による品質の低下が問題になってきた。これに対する対策として、植物組織培養によりイチゴのウイルスフリー株を繁殖させ、土壌に移植して苗として供給するシステムが Boxusら(Ref.1)、Damiano(Ref.2)によって報告され、組織培養によるイチゴの繁殖が容易になった。しかし、これらはいずれも寒天培地上での繁殖であるため、増殖効率が決して高くない。植物組織培養によって増殖したイチゴのウイルスフリー個体を、圃場での栽培に直接利用できるようにするためには、イチゴの苗を省力化したプロセスで大量増殖することが必要である。そのための手段として、著者らによって液体振とう培養による大量増殖が検討されている。その結

果によると、培養容器内で増殖した植物体の成育が必ずしも良好ではなく、種苗を効率良く生産するためにはさらに改良が必要である。そこで、本研究では特に液体振とう培養による植物体の成育促進による種苗の生産効率を高めることを目的に、サイトカイニンとABAの添加効果について検討し、所期の成果を得たので、その結果を以下に報告する。

2. 材料および方法

宝交早生を常法によって茎頂培養し、無菌培養株を作成した。本株をMS改変培地(MS成分のうちの NH_4NO_3 、 KNO_3 、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ を1/2に減量した培地にショ糖30g/l、添加したもの)に継代増殖し、実験に供した。実験はMS改変培地を基本とし、

寒天培養を 24×125 mm の試験管、液体培養を 300 ml 容三角フラスコで行った。培養条件は 25°C 、 2500 ルクス連続照明とした。

3. 結果および考察

3. 1 サイトカイニンによる芽の分化促進

サイトカイニンとしてカイネチン（和光純薬製、Lot No. ALL7879）、6-ベンジルアデニン（和光純薬、Lot No. ECE2561：以下BA）、4-ピリジルフェニル尿素（協和醸酵：以下4PU）をそれぞれ0、1、3、 10 mg/l の濃度で添加し、芽の増殖に対する影響を寒天培地上で調べた。その結果、芽の増殖効率は4PUを 1 mg/l 添加した時に最も良く、約 100 本の芽が形成された。ついでBA 1、3、 10 mg/l では $50 \sim 100$ 本の芽が形成された（Fig. 1A）。形成された芽の伸長は、カイネチン添加区ではいずれの濃度でも抑制されなかったが、4PU、BA添加区では 1 mg/l で顕著な抑制がみられた（Fig. 1B）。芽の重量は4PU 1 mg/l 、BA 3 mg/l 、カイネチン 10 mg/l で促進され、4PU 10 mg/l で

抑制された他は、無添加とほとんど変らなかった（Fig. 1C）。根の成長は、カイネチン添加区ではほとんど抑制されなかったが、4PU、BA添加区では顕著に抑制された（Fig. 1D）。

以上の結果より、寒天培地上では4PUを 1 mg/l 添加して培養することにより、芽の分化数、培養株当たりのシュート重を増加させることができた。

3. 2 液体振とう培養における4PUとABAのシュートの成育に対する影響

芽の分化・成育はサイトカイニンを添加すると促進されるが、植物体の水分含量が増加し、土壌への活着率が低下する傾向がある（高山ら、未発表）。この問題点を解決するために、成育促進効果を有するサイトカイニンとともに、植物体のハードニングを促進する傾向を有するアブシジン酸（SIGMA、Lot No. 41F-3810：以下ABA）を組み合わせて添加して成育ならびに土壌への活着について検討した。

培養は 300 ml 容三角フラスコにMS改変培地（MS成分のうちの NH_4NO_3 、 KNO_3 、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ を $1/2$ に減量し、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 KH_2PO_4 を2倍にした培地にショ糖 30 g/l 、添加したもの）に4PUを0、0.1、 1.0 mg/l 、ABAを0、0.1、0.3、 1.0 mg/l の濃度でそれぞれ組み合わせて添加した。測定は液体培地に移植して20日目に行った。その結果、フラスコ当たりの新鮮重は4PU 0.1、 1.0 mg/l 添加区ではABAを 0.1 mg/l 組み合わせて添加することにより増加した。特に4PU 1.0 mg/l 、ABA 0.1 mg/l 添加区ではその傾向が顕著でフラスコ当たり約 30 g となり、他の試験区に比べ2倍～3倍となった。ABAが 0.3 mg/l 以上になると成育が顕著に抑制された（Fig. 2A）。また乾物比率は、成育が最も良好であった4PU 1.0 mg/l 、ABA 0.1 mg/l 添加区のみで低くなった（Fig. 2B）。シュートの数も4PU 1.0 mg/l 、ABA 0.1 mg/l 添加区で最も多く、約 140 本得られ

Fig. 1. Effect of cytokinins on differentiation and growth in *Fragaria ananassa* in tissue culture. Symbols: ○=4PU △=BA □=kinetin

Fig.2. Effect of 4PU and ABA on differentiation and growth in *Fragaria ananassa* in tissue culture.
4PU concentration:
○=0 mg/l, ●=0.1mg/l, △=1.0mg/l

た (Fig. 2C)。シュートの高さは、4PUが0、0.1mg/lの時はABAの影響があまり見られなかったが、4PU1.0 mg/l添加区ではABA濃度が0.3mg/l以上になると抑制される傾向があった (Fig. 2D)。発根は、ホルモンフリーの時とABAのみを0.1mg/l添加した時には観察されるが、ホルモンフリーの区と比べるとABA 0.1mg/l添加区でも発根数が減少し、根の伸長が抑制された。それ以外の試験区ではほとんど発根が見られなかった。

また、形成された植物体の特性を明らかにするために、クロロフィル含量を測定した。その結果、植物ホルモンを添加するとクロロフィルa+b含量に変化がみられ、クロロフィルa+bの含量は4PUが高濃度になるにしたがって減少した (Fig. 3A)。このクロロフィル含量の減少が、土壌への活着率の低下の原因のひとつであると考えられる。

以上の結果より、液体振とう培養によりシュートを育成させる時には4PU1.0 mg/lとABA 0.1mg/lを組み合わせて添加することにより成育量、シュート数を増加させることができた。本

実験で増殖した植物体を土壌に移植し順化栽培を行った結果、4PU1.0 mg/lとABA0.1mg/lの組合せ添加によって育成したシュートの順化活着は良好であった。

Fig.3. Effect of 4PU and ABA on chlorophyll content in *Fragaria ananassa* in tissue culture.
4PU concentration:
○=0 mg/l, ●=0.1mg/l, △=1.0 mg/l

4. おわりに

液体振とう培養によりシュートを大量増殖して、苗を農家に安定供給することは、イチゴの品質を向上させるうえで重要である。今回の実験により、液体振とう培養の材料となる寒天培地上での芽の増殖は、MS改変培地に4PUを1mg/l添加することにより良好となった。また、液体振とう培養でシュートを効率よく増殖するためには、4PU1.0 mg/l、ABA 0.1mg/lを添加すると良いことがわかった。土壌への活着率も、ABAを添加した試験区で良好な結果が得られている。

REFERENCES

- ¹Boxus, P. and Quoirin, M., Laine, J.M. : Large scale propagation of strawberry plants from tissue culture, In: Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue, and organ culture. :pp.130-143 (1977)
- ²Damiano, C. and Laneri, U., Arias, E. J. : Nitrate and ammonium in strawberry micro propagation preliminary results, Ann Ist Sper Fruttic 10:35-42(1979)