培養器外直接発根法における光強度および培養液濃度が イチゴ小植物体の生長に及ぼす影響

林 真紀夫・白坂真由美・佐藤公哉・山元隆義

東海大学開発工学部 410-03 沼津市西野 317

Effects of Light Intensity and Concentration of Culture Solution on the Growth of Strawberry
Plantlets Rooted by the Direct *Ex-vitro* Rooting Method

Makio HAYASHI, Mayumi SHIRASAKA, Kimiya SATO and Takayoshi YAMAMOTO

*School of High-Technology for Human Welfare, Tokai University
Nishino 317, Numazu, Shizuoka 410-03, Japan*

Abstract

The effects of the photosynthetic photon flux density (PPFD) and concentration of culture solution on the growth of strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch. cv. Houkokuwase) plantlets rooted by the direct *ex-vitro* rooting method were examined. In the direct *ex-vitro* rooting method, the shoot elongation, rooting, and acclimatization of the plantlets are simultaneously achieved in the controlled environment. In this study, explants of micropropagated shoots were directly inserted into the rockwool plugs and cultured inside the environmental control unit by hydroponics using a culture solution at three different concentrations (0.5U : 1/2 strength of Enshi (Hori, 1966) component of culture solution for hydroponics, 0.2U : 1/5 strength of Enshi component, 0/0.2U : 0(0-10th days) and 1/5 (11-30th days) strength of Enshi component) under high and low PPFDs (high PPFD : $180\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$, low PPFD : $70\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$).

After 30 days in culture, dry and fresh weights, leaf area, number of leaves, and dry weight ratio of the plantlets were measured. All these parameters were greater in a high PPFD than in a low PPFD. The shoot/root ratio was larger in a low PPFD than in a high PPFD. In a high PPFD, growth (dry and fresh weights, etc.) of plantlets was in the order of $0.5\text{U} > 0.2\text{U} > 0/0.2\text{U}$. In a low PPFD, the effect of the concentration of culture solution on the growth of plantlets was not as obvious as that in a high PPFD.

緒 言

組織培養苗生産において、その生産過程での省力化・省資材化、生産期間の短縮、および苗質向上は重要な課題である。とりわけ株数が大量となる苗生産の最終段階(シュート伸長・発根ステージおよび順化ステージ)でこれらのことが重要となる。このような観点から、培養器の大型化や光独立栄養培養に関する研究がなされている(例えば、文献1, 2, 3など)。同様の観点から筆者らは、培養器を用いないで環境制御を行うことにより、光独立栄養生長条件下で組織培養由

1996年10月23日受付

1996年11月22日受理

来の外植体の発根から小植物体の順化までを同時達成する、培養器外直接発根法を提案し、これに関する試験を行っている⁴⁻⁶⁾。この方法では、環境制御法が小植物体の生長や苗質に及ぼす影響が大きく、これに関連するいくつかの報告⁴⁻⁷⁾はあるものの、好適管理法についての検討は不十分である。そこで今回、小植物体の生長促進に対する影響が大きいと考えられる光強度および培養液濃度が、イチゴ小植物体の生長に及ぼす影響について試験したので報告する。

材料および方法

試験区は表1に示すように、光強度および培養液濃度の高低を組み合わせた計6区とした。試験には環境制御装置を用い、装置内栽培棚面上の光合成有効光子束密度(PPFD)が $180\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 区(高PPFD区)と $70\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 区(低PPFD区)の2区を設けた。光源にはメタルハライドランプ(東芝ライテック社製、D 250)を用い、光源から栽培棚面までの距離をかえることで光強度を調整した。明期時間は16時間とした。培養液には園試処方⁸⁾(大塚化学㈱B処方)培養液を用い、濃度については0.5単位区(基準濃度の1/2, 0.5 U区), 0.2単位区(0.2 U区)および試験開始後10日目までは0単位(蒸留水)それ以降0.2単位とする区(0/0.2 U区)の3区を設けた。なお、培養液は蒸留水で作成した。

供試植物はイチゴ(*Fragaria* × *Ananassa* Duch. cv. Houkouwase)とした。慣行法により継代培養⁹⁾したイチゴ小植物体の根を切除し、葉が2枚以上ついている株に切り分け、生体重が $50\pm 5\text{mg}$ の範囲のシュートを外植体として供試した。これを各試験区の所定濃度培養液に1日以上つけておいたロックウール培地(GRODAN 社製、縦 2.5cm ×横 2.5cm ×高さ 4cm)に挟み込むように植え付け、セル成形苗用トレイ(新農耕産業製、縦18穴×横9穴を縦9穴×横9穴に切断したもの)に入れた。この時の栽植密度は $1246\text{株}/\text{m}^2$ である。この成形トレイを手製の平底トレイに入れ、環境制御装置内の棚面に配置した。培養液については、試験期間中、ロックウール培地の下部約 $1\sim 1.5\text{cm}$ が常時浸るように培養液を補給した。

環境制御装置内の循環風が直に小植物体にあたるのを避けるために、上部に通気用穴を開けた透明ポリエチレンフィルムで、小植物体を植え付けたトレイ全体をトンネル状に覆った。なお、高PPFD区および低PPFD区の光強度は、ポリエチレンフィルムで覆った状態での値である。

環境制御装置内の気温および相対湿度については、培養時の培養器内条件から外気条件に近づけるため、日数経過に伴い日較差が徐々に増大するように制御⁴⁾した。すなわち、試験開始日から10日間の気温は 22°C 、相対湿度は95%の一定とし、その後徐々に変化をつけ、試験終了日の気温は日最高 25°C ・日最低 15°C 、相対湿度は日最高85%・日最低60%とした。

表1 試験区の概要
Table 1 Description of the treatment.

Treatment	PPFD* ($\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	Concentration of culture solution**
High PPFD・0.5U	180	0.5
High PPFD・0.2U	180	0.2
High PPFD・0/0.2U	180	0(Days 0-10), 0.2(Days 11-30)
Low PPFD・0.5U	70	0.5
Low PPFD・0.2U	70	0.2
Low PPFD・0/0.2U	70	0(Days 0-10), 0.2(Days 11-30)

*: Photosynthetic photon flux density on the empty culture shelf.

** : Strength of Enshi (Hori, 1966) component of nutrient solution for hydroponics.

試験開始日を0日目とし、30日間試験を行い、10日おきに小植物体の生計計測を行った。

結 果

1. 乾物重、生体重およびS/R比

図1に生育試験から得られた各試験区的全乾物重の経日変化を示す。また、表2に30日目における部位別の生体重および乾物重を示す。

乾物重はいずれの試験区においても日数経過に伴い増加した。30日目における全乾物重は、高PPFD・0.5U区で最大となった。同一培養液濃度区においては、高PPFD区>低PPFD区となった。0.5U区において高PPFD区と低PPFD区の差異は顕著であり、高PPFD区的全乾物重は、低PPFD区のその3.7倍であった。一方、0/0.2U区においては、2.5倍であった。

高PPFD区内においては20日目を除けば、0.5U区>0.2U区>0/0.2U区となり、培養液

図1 全乾物重の経日変化

Fig. 1 Time course of total dry weight of the plantlets (For treatment, see Table 1. Vertical bars indicate standard deviation.)

図2 地下部乾物重の経日変化

Fig. 2 Time course of root dry weight of the plantlets (For treatment, see Table 1. Vertical bars indicate standard deviation.)

表2 30日目における生体重、乾物重、および乾物重 S/R 比
Table 2 Fresh and dry weights, and shoot/root dry weight ratio (S/R ratio) of the plantlets after 30 days in culture. (For treatment, see Table 1.)

Treatment	Fresh weight (mg plantlet ⁻¹)			Dry weight (mg plantlet ⁻¹)			S/R ratio
	Shoot	Root	Total	Shoot	Root	Total	
High PPFD・0.5U	1161 a	593 a	1754 a	193.4 a	44.0 a	237.4 a	4.4
High PPFD・0.2U	724 b	468 a	1192 b	121.7 b	34.9 a	156.6 b	3.5
High PPFD・0/0.2U	523 c	290 b	813 c	93.7 b	22.2 b	115.9 b	4.2
Low PPFD・0.5U	418 d	97 c	514 d	56.9 c	7.5 c	64.4 c	7.6
Low PPFD・0.2U	362 de	88 c	450 d	47.6 cd	6.7 c	54.3 c	7.1
Low PPFD・0/0.2U	310 e	84 c	394 d	41.1 d	6.2 c	47.3 c	6.6

Means followed by the same letter in each column are not significantly different at the 5% level by LSD test.

濃度の高い試験区ほど全乾物重は大であった。一方、低 PPFD 区内においては、培養液濃度の高い試験区ほど全乾物重は大となる傾向はみられたものの、試験区間の違いは高 PPFD 区に比べると小さく、有意差(有意水準 5%、以下同様)はみられなかった。なお、全乾物重の大きい試験区ほど、標準偏差が大きくなり、個体間差が大であった。また、全乾物重増加が最大であった高 PPFD・0.5 U 区においてのみ枯死がみられ、30 日目までに枯死した小植物体の比率は 6% であった。なお、枯死の兆候は初期段階で多くみられた。

図 2 に地下部乾物重の経日変化を示す。10 日目では、高 PPFD 区および低 PPFD 区ともに 0/0.2 区の値が他の試験区に比べ小さく、未発根の株数も他の試験区よりも多かった。20 日目および 30 日目における試験区間の大小関係は、全乾物重のそれと同様であった。ただし、同じ培養液濃度区における高 PPFD 区と低 PPFD 区間の差異は、全乾物重の場合よりも顕著であり、30 日目の 0.5 U 区における高 PPFD 区の地下部乾物重は、低 PPFD 区のその 5.9 倍となった。

表 2 で示した 30 日目における全生体重、地下部生体重および地上部生体重の試験区間の大小関係は、全乾物重のそれと同様であった。また、30 日目における乾物重 Shoot/Root 比(S/R 比)は、高 PPFD 区<低 PPFD 区となり、培養液濃度に係わらず、高 PPFD 区において地下部乾物重割合が高かった。

2. 葉面積、葉枚数、草丈および乾物率

表 3 に示す 30 日目における 1 株当たりの葉面積に関する試験区間の大小関係は、全乾物重のそれと同様であった。葉枚数は、同じ培養液濃度区においては高 PPFD 区>低 PPFD 区となった(表 3)。高 PPFD 区においては 0.5 U 区が 10.1 枚/株の最大値を示し、0.2 U 区および 0/0.2 U 区との差が大であった。低 PPFD 区においても 0.5 U 区の葉枚数が、他の 2 区に比べ大であ

表3 30日目における葉面積、葉枚数、平均葉面積、草丈、および乾物率
Table 3 Leaf area, number of unfolded leaves per plantlet, average leaf area per leaf, plant height, and percentage of dry weight after 30 days in culture. (For treatment, see Table 1.)

Treatment	Leaf area (cm ² plantlet ⁻¹)	Number of leaves (plantlet ⁻¹)	Average leaf area (cm ² leaf ⁻¹)	Plant height (mm)	Dry matter (%)
High PPFD・0.5U	51.1 a	10.1 a	5.1	97.3 a	13.5
High PPFD・0.2U	34.5 b	7.9 b	4.3	88.6 a	13.1
High PPFD・0/0.2U	26.9 c	7.1 c	3.8	70.7 b	14.2
Low PPFD・0.5U	24.7 d	8.1 d	3.0	76.6 c	12.5
Low PPFD・0.2U	21.6 d	6.5 e	3.3	82.6 c	12.1
Low PPFD・0/0.2U	18.7 d	6.3 e	3.0	77.0 c	12.0

Means followed by the same letter in each column are not significantly different at the 5% level by LSD test.

表4 全乾物重より求めた相対生長速度(RGR)
 Table 4 Relative growth rate (RGR) on a dry weight basis.
 (For treatment, see Table 1.)

Treatment	RGR* (d ⁻¹)		
	Days 0-10	Days 10-20	Days 20-30
High PPFD・0.5U	0.089	0.126	0.114
High PPFD・0.2U	0.074	0.145	0.068
High PPFD・0/0.2U	0.020	0.142	0.095
Low PPFD・0.5U	0.045	0.096	0.057
Low PPFD・0.2U	0.042	0.072	0.066
Low PPFD・0/0.2U	0.017	0.085	0.065

*: $RGR = \{\ln(W_2) - \ln(W_1)\} / (T_2 - T_1)$, where W_1 and W_2 denote the total dry weight on days T_1 and T_2 , respectively.

った。葉面積を葉枚数で割って求めた平均葉面積の試験区間の大小関係は、全乾物重のそれと同様であった。

草丈に関しては、試験区間の差はみられたものの、乾物重、生体重および葉面積に比べると試験区間の差異は比較的小さかった。

乾物率に関しては、高 PPFD 区 > 低 PPFD 区となった。高 PPFD 区内および低 PPFD 区内での試験区間差は比較的小さかった。

3. 相対生長速度(RGR)

全乾物重より算定した10日間毎のRGRを表4に示す。すべての試験区で10~20日目のRGRが最大となり、次いで20~30日目、0~10日目の順であった。すなわち日数経過に伴い、RGRは上昇した後、下降した。また、いずれの期間においても高PPFD区 > 低PPFD区となった。

0~10日目においては、高PPFD区および低PPFD区とも、0/0.2U区のRGRが0.2U区および0.5U区に比べ顕著に小さかった。この期間の0/0.2U区の培養液濃度は0単位、すなわち無機成分を含んでいなかった。

考 察

生育試験の結果から、低PPFD区よりも高PPFD区において小植物体の乾物重、生体重、葉面積などの増加が大きく、生長促進がみられた。高PPFD区では特にS/R比が小さく、地上部よりも地下部の生長促進がみられた。このことから、ある程度までは光強度を高めることによって蒸散促進による養分吸収の増加・光合成の促進が生じ、全体の生長が促進され、特に根部の生長が促進されると考えられる。また、乾物率が低PPFD区より高PPFD区で高くなったのも、養分吸収量の違いや光合成速度の違いが関係していると思われる。

高PPFD区では培養液濃度の高い試験区ほど生長促進がみられたのに対し、低PPFD区では培養液濃度による生長差は比較的小さかった。このことから、培養液濃度が小植物体の生長に及ぼす影響は、光強度によって異なり、光強度が高くなるほど培養液濃度の影響が大きくなると推察される。したがって、好適な培養液濃度は光強度との関係で検討される必要があろう。

全試験区中で高PPFD・0.5U区の乾物重、生体重、葉面積などの増加が最大であったが、この試験区においては初期段階で枯死する株がみられた。これは、光強度が高いことにともなう蒸散量過多による水ストレスの発生が主原因と考えられる。しかし、高PPFD区においても、0.2

U区および0/0.2 U区では枯死が見られなかったことから、培養液濃度が高かったことも枯死に関係していると推察される。

10日目までの生長は、0/0.2区が他の試験区に比べて顕著に劣っていた。一般の挿し木繁殖では、肥料分を含まない培土がよいとされており⁹⁾、このことからほぼ発根が完了すると予想した10日目までの培養液濃度を0単位とするこの試験区を設定した。しかし、培養器外直接発根法においては、今回の試験結果からは、無機成分を含んだ培養液の方が生長がよいことが分かり、発根時期も早まる傾向がみられた。

以上のことを勘案すると、枯死をなくし、かつ生長を促進させるためには、以下の方法が望ましいと考えられる。すなわち、初期段階から無機成分を与える。また、培養された植物は環境ストレス、特に水ストレスを受け易いことから、初期段階での光強度は枯死が生じない程度に維持し、発根前後から段階的に高めていくのがよいと考えられる。いずれの試験区でも、10～20日目のRGRに比べ20～30日目のRGRが低下しているが、20～30日目の期間の光強度を本試験の値よりも高くすれば、さらに生長が促進され、RGRの低下を抑制できたものと推察する。この点についてはさらに試験する必要がある。

本試験結果では、生長促進の大きい試験区ほど同一試験区内の個体差が大きくなった。本試験では、一定範囲の生体重の外植体を供試したが、同じ生体重でも葉面積や葉数、形態などには違いがあったこと、さらに生長促進の大きい高PPFD区は環境ストレスを受け易い環境条件であったことから、これらに起因する初期の生育個体差が生じ、これが生長速度の大きい試験区ほどその後の個体間の生長差の増大につながったためと推察される。外植体の形態に関しては、パレイショやカーネーションのように節で切り分けて外植体を得る植物⁹⁾に比べ、株で切り分ける植物では形態までそろえることは難しく、節性植物よりも個体差が大きくなるのはやむを得ないと考えられる。環境条件に関しては、前述のような光強度の制御をすることによって、環境ストレスを減少できると考える。

まとめ

培養器外直接発根法における、光強度および培養液濃度がイチゴ小植物体の生長に及ぼす影響について試験し、以下の結果が得られた。

- (1) 低PPFDに比べ、高PPFD区で生長(生体重、乾物重、葉面積、葉数など)が促進された。乾物率は高PPFD区の方が大きかった。
- (2) 低PPFD区では培養液濃度の違いによる生長差は比較的小さかったのに対し、高PPFD区では培養液濃度が高い試験区ほど、生長促進が大きかった。ただし、高PPFD区の培養液濃度が最も高い試験区では枯死がみられた。
- (3) 発根前の生育初期において、無機成分を添加した試験区が無添加の試験区に比べ根部乾物重が大きくなった。

謝 辞

本研究は、文部省科学研究費補助金一般研究C(No. 07660349)によって行われた。関係各位に深謝する。

引用文献

- 1) Fujiwara, K., Kozai T. and Watanabe I.: Development of a photoautotrophic tissue culture system for shoots and/or plantlets at rooting and acclimatization stages. *Acta Horticulturae*. 230 : 153~158(1988)
- 2) Kozai, T.: Micropropagation under photoautotrophic conditions. (In *Micropropagation: Technology and Application*, eds Debergh, P. and Zimmerman, R.) Kluwer Academic Publishers (Dordrecht) : 447~469(1991)
- 3) Jeong B. R., Fujiwara K. and Kozai T.: Carbon dioxide enrichment in autotrophic micro-propagation: Method and advantages. *HortTechnology*. 3(3) : 332~334. (1993)
- 4) Hayashi M., Nakayama M. and Kozai T.: An application of the acclimatization unit for growth of carnation explants, and for rooting and acclimatization of the plantlets. *Acta Horticulturae*. 230 : 189~194(1988)
- 5) 林 真紀夫・古在豊樹・渡辺一成・渡部一郎: 培養器外直接発根法において CO₂ 施用および高日射量がバレイショ小植物体の生長に及ぼす効果, *生物環境調節*, 28 : 147~154(1990)
- 6) 林 真紀夫・小紙直樹・高辻正基・本條 毅: 環境制御装置を利用した培養器外直接発根法におけるイチゴ小植物体の生長, *植物工場学会誌*, 9 : 67~71(1997).
- 7) Zimmerman, R.H.: Micropropagation of woody plants: Post tissue culture aspects. *Acta Horticulturae*. 227 : 489~499(1988).
- 8) 堀 裕: *そ菜・花きのれき耕栽培*, 養賢堂: pp. 210(1966).
- 9) 町田英夫: *さし木のすべて*, 誠文堂新光社: pp. 261(1985).