

茎頂培養により得たイチゴの *in vitro* における開花と結実

浅尾俊樹・大谷紀之・遠藤啓太・太田勝巳・細木高志

島根大学生物資源科学部 690-11 松江市上本庄町

In vitro Flowering and Fruiting of Strawberry through Shoot Apex Culture

Toshiki Asao, Noriyuki Ohtani, Keita Endo, Katsumi Ohta and Takashi Hosoki

Faculty of Life and Environmental Science, Shimane University, Kamihonjo, Matsue, Shimane 690-11

園芸学会雑誌 第66巻 第2号 別刷

1997年9月15日

Reprinted from Journal of the Japanese Society for Horticultural Science

Vol. 66. No. 2, p. 419-421. 1997

茎頂培養により得たイチゴの *in vitro* における開花と結実

浅尾俊樹・大谷紀之・遠藤啓太・太田勝巳・細木高志

島根大学生物資源科学部 690-11 松江市上本庄町

In vitro Flowering and Fruiting of Strawberry through Shoot Apex Culture

Toshiki Asao, Noriyuki Ohtani, Keita Endo, Katsumi Ohta and Takashi Hosoki

Faculty of Life and Environmental Science, Shimane University, Kamihonjo, Matsue, Shimane 690-11

Summary

A method of inducing *in vitro* flowering and fruiting of strawberry plants obtained by shoot apex culture was investigated. When strawberry plants were cultured in the flask (300 ml), the crown did not enlarge over 3 mm diameter, whereas when cultured in a culture-bottle (100 mm×110 mm×100 mm), the crown enlarged to 5 mm diameter.

A June-bearing type strawberry, 'Toyonoka', and an ever-bearing type, 'Summerberry' with 3 mm crown diameters did not differentiate flower buds, whereas those with 5 mm crown diameters were induced to flower.

The percentages of flower buds differentiated by 'Toyonoka' and 'Summerberry' crowns were 22.2 % and 84.2 %, respectively, whereas only 11.1 % and 36.8 %, respectively, flowered.

Thus, culture-bottle system enabled *in vitro* flowering of strawberry. Using this system, fruits were obtained by artificial pollination.

緒 言

イチゴの花芽分化は主として低温や短日のような環境要因によって起こるが、体内窒素レベルを下げることによって促進されることが知られている(木村, 1972)。しかし、圃場等の実験では圃場環境を自由に調節できない場合が多いことから、これらの諸要因を詳細に検討するのはきわめて難しい。実際、秋冷が早い年には開花が早まり、10～12月が暖かい年には開花が遅延する(木村, 1972)。また、無仮植育苗した場合、仮植苗より肥効がよく、生育が旺盛になりやすいことから定植後の花成が安定しないなどイチゴの花芽分化が齊一に行われない(桜井, 1986)。一方、*in vitro*での培養は、温度および光条件の調節が比較的容易であると同時に、培地へ添加した物質の効果を確認することもできる(谷本, 1989)。

従来、イチゴの花芽分化に関する要因について検討された研究は多いが、*in vitro*での開花および結実に関する報告は少ない。Kano・Asahira (1978)は、開花1日前のイチゴ果実の*in vitro*培養を試み、植物生

長調節物質を添加することにより成熟した果実を得た。また、Perkins・Huber (1992)は、圃場で50～60%成熟したイチゴ果実を培養した結果、果実重は小さくなるが、果実色は圃場と同程度になったと報告している。両試験とも、すでに発達した花や果実を*in vitro*培養したものであり、茎頂を外植体として培養した個体で、花芽分化、花芽の発育、開花・結実について調べていない。本研究では、茎頂培養により得たイチゴの無菌植物体が開花および結実するための培養器などについて検討し、*in vitro*での開花、結実が可能かどうか調査した。

材料および方法

供試品種は、一季成り性品種'とよのか'および四季成り性品種'サマーベリー'を用いた。

両品種のイチゴのランナーは島根大学生物資源科学部附属農場の圃場より採取し、クリーンベンチ内で70%エタノールに5秒間、有効塩素濃度0.5%次亜塩素酸ナトリウムに10分間浸漬して殺菌した。これらのランナーを滅菌水で洗浄した後、約0.5mmの大きさに茎頂部を摘出し、培地10mlを含む直径25×高さ150mmの試験管で無菌的に培養、増殖した。増

殖用培地は、 N^6 -benzyladenine (BA) $0.5 \text{ mg liter}^{-1}$ を添加した MS 基本培地 (Murashige・Skoog, 1962) を用いた。微量要素およびビタミン類は Ring・Nitsch (1968) 処方に準じた。ほかにショ糖 40 g liter^{-1} および寒天 8 g liter^{-1} を添加した。培地の pH は、5.5 とした。培地は、オートクレーブで、 120°C 、20 時間滅菌した。培養は 25°C 、5500 ~ 6000 lx、16 時間日長下で行った。

茎頂培養開始 3 ~ 4 ヶ月後、300 ml 培養フラスコに BA を除いた MS 基本培地を 100 ml 入れ、増殖した植物体を 1 株ずつ移植し、クラウンの肥大をはかった。また、さらにクラウンを肥大させるため、300 ml 培養フラスコより容量の大きいカルチャーボトル (ポリカーボネイト製、100 mm (W) × 110 mm (D) × 100 mm (H)) を用いた (第 1 図)。カルチャーボトルのキャップには、通気をよくするために通気フィルター (直径 8 mm, 最大孔径 $0.02 \mu\text{m}$ の極微細孔フィルター) を 2 枚貼り付けた。植物体の支持材としてロックウール (25 mm (W) × 30 mm (D) × 30 mm (H), 以下, R. W.) を用い、寒天培地 (寒天のみ, 8 g liter^{-1}) 100 ml で固定した。カルチャーボトルを滅菌後、材料を R. W. に固定し、液体培地 (MS 基本培地, ショ糖 40 g liter^{-1}) を入れ、培養した。

供試個体数は、300 ml 培養フラスコで培養した場合、両品種とも 20 株、カルチャーボトルで培養した場合 'とよのか' は 9 株、'サマーベリー' は 19 株とした。

'とよのか' および 'サマーベリー' の培養小植物体の花芽分化を促進するため、各々 15°C 、10 時間日長 (伏原, 1995)、 15°C 、16 時間日長 (高野・常松, 1991) の条件下で 4 週間生育させた。花芽誘導処理後、300 ml 培養フラスコで培養した植物体は、新たな同一組成の培地に移植し、カルチャーボトルで培養した植物体については、ボトル内の液体培地を全量更新して培養を継続した。処理後の培養条件は両品種とも 25°C 、16 時間日長、5500 ~ 6000 lx とした。また、開花時に白金耳で無菌的に人工受粉を行った。調査は、出蕾数、処理後の出蕾日数、開花後および処理後の開花日数について行った。

結果および考察

300 ml 培養フラスコでは 'とよのか'、'サマーベリー' ともクラウン径が 3 mm 以上肥大しなかったが、カルチャーボトルでは約 5 mm まで肥大した。なお、展開葉数はクラウン径、品種にかかわらず 11 枚前後であった。

クラウン径約 3 mm の場合、両品種とも処理終了後 60 日経過しても出蕾がみられなかったが、クラウン径約 5 mm の場合、出蕾および開花が確認された (第 1 表) ことから、これらの品種での *in vitro* 培養では、クラウン径が 5 mm 程度まで生長しなければ出蕾・開花の可能性が少ないと考えられる。今後、他の品種についても同様にクラウン径がある程度肥大しないと開花しないのかどうかさらに検討が必要である。両品種でクラウン径を約 5 mm まで生長させるためには、300 ml フラスコに寒天培地を入れた培養系では困難であったが、フラスコより容量の大きいカルチャーボトルを用い、植物体を固定したまま培地の交換が容易な培養系で可能となった。

Boswell (1929) は、キャベツ苗の茎の太さが 6 mm 以上大きくなると低温に感受せず、花芽分化しないことを、また、Davies・Jones (1944) は、タマネギの苗の太さが 10 mm を越えると急に抽台が多くなることを報告した。一季成り性イチゴのランナー株の場合もクラウン径が 8 mm 以上で低温に敏感に感受することが明らかにされており (伊東, 1963)、'とよのか' ではクラウン径が 10 mm であれば夏季の低温暗黒処理によっても開花率が 60 % に達することが確認されている (伏原, 1990)。

本実験では、クラウン径約 5 mm の場合、出蕾率は、'とよのか' では約 20 % と低く、'サマーベリー' では約 80 % と高かった。出蕾株当たりの出蕾数は 3 前後で品種による大きな差はみられなかった。処理終了後の出蕾日数は、'とよのか' で 35 日、'サマーベリー' で 25 日と 'サマーベリー' が 10 日短かった。また、開花率は、'とよのか' で約 11 %、'サマーベリー' で約 37 % と 'サマーベリー' が高かった (第 2 図)。開花率が出蕾率より低下したのは、両品種とも出蕾しても途中で褐変し、開花しない蕾がみられたためである。開花株当たりの開花数は 'とよのか' で 1 個、'サマーベリー' で 2 個であったが、'サマーベリー' の場合、株により開花数に差がみられた。処理後の開花日数は 'とよのか' で 56 日、'サマーベリー' で 34 日と 'サマーベリー' が 20 日以上短かった。

本実験の結果では、'とよのか' と比べて 'サマーベリー' の出蕾率および開花率が高かったが、これは 'サマーベリー' が四季成り性品種であることと、花芽誘導のために行った今回の処理条件 (温度、日長、期間) が本品種に適していたことが考えられる。しかし、出蕾しても褐変した個体が多く、出蕾率と比べて開花



Fig. 1. View of strawberry grown in the culture-bottle system. Air filter (A), Rock-wool cube (B), Liquid medium (C), Agar (D).



Fig. 2. *In vitro* flowering of strawberry 'Summerberry'.



Fig. 3. *In vitro* fruiting of strawberry 'Summerberry'.

Table 1. Flower bud emergence and flowering in *in vitro* cultured strawberry plants with different crown-diameter.^z

Cultivar	Crown diameter (mm)	Percentage of plants with flower buds (%)	No. of flower buds per plant	No. of days to flower bud emergence in culture	No. of flowering plants (%)	No. of flowers per plant	No. of days to flowering in culture
'Toyonoka'	3	0.0	—	—	0.0	—	—
	5	22.2	3.5 ± 0.7 ^y	35.5 ± 4.9 ^y	11.1	1.0	56.0
'Summerberry'	3	0.0	—	25.5 ± 5.1	0.0	—	—
	5	84.2	2.6 ± 1.7	—	36.8	2.1 ± 1.2	33.6 ± 3.2

^z Rated at 60 days after the treatment.^y Mean ± S.D.

率は約 37% と必ずしも高くなかったことから、今後、出蕾後から開花までの培地条件を検討する必要がある。また、'とよのか'の出蕾率および開花率ともに低かったのは、本試験における培地条件が適当でなかったことや、伏原 (1990) が指摘しているようにクラウン径が 10 mm 以上の苗でないとか開花率が低下することなどから、植物体の大きさ、すなわちクラウン径が小さかったことによると考えられる。今後、'とよのか'の出蕾および開花率を上げるためには培地条件を含めてクラウン径を大きくする方法を検討する必要がある。

開花したすべての花に白金耳で人工的に自家授粉を行った結果、1 花開花した'とよのか'では 1 個結実がみられ、'サマーベリー'では開花した半数である 8 個が結実した (第 3 図)。結実数が少なかったのは、培養器の中の湿度が高かったため、花粉の活性が低下したことによると考えられる。

今後、本研究で得られたイチゴの *in vitro* の実験系を用いて、開花促進のために植物生長調節物質の添加や窒素含量および窒素形態などの培地条件について検討していく必要がある。

摘 要

茎頂培養により得たイチゴの *in vitro* における開花および結実の方法について検討した。イチゴを 300 ml フラスコで培養すると、クラウン径は 3 mm 以上大きくならなかった。一方、カルチャーボトルでイチゴを培養すると、クラウン径が 5 mm まで大きくなった。

一季成り性品種'とよのか'および四季成り性品種'サマーベリー'ともクラウン径約 3 mm では出蕾しなかったが、クラウン径約 5 mm では出蕾および開花した。出蕾率は'とよのか'の場合 22.2%、'サマーベリー'の場合 84.2% であった。開花率は'とよのか'の場合 11.1%、'サマーベリー'の場合 36.8% であった。

以上より、カルチャーボトルを用いることで *in vit-*

ro におけるイチゴの茎頂培養からの開花が可能になり、人工授粉によって果実の結実もみられた。

引用文献

- Boswell, U. R. 1929. Studies of premature flower formation in winterd-over cabbage. Maryland Agr. Exp. Sta. Bull. 31.
- Davies, G. N. and H. A. Jones. 1944. Experiments with the transplant onion crop in California. California Agr. Exp. Sta. Bull. 682.
- 伏原 肇. 1990. とよのかの夏期低温処理育苗. p. 461-469. 農業技術体系, 野菜編 3 イチゴ, 農文協. 東京.
- 伏原 肇. 1995. イチゴ栽培を再考する(11) イチゴ苗の花芽分化条件について. 施設園芸. 37(5) : 60-63.
- 伊東秀夫. 1963. 苺の花芽分化促進と温度及び日長の関係. 農及園. 38 : 291-294.
- Kano, Y. and T. Asahira. 1978. Effects of some plant growth regulators on the development of strawberry fruits *in vitro* culture. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 47 : 195-202.
- 木村雅行. 1972. 花芽の分化と発育. p. 33-54. 農業技術体系, 野菜編 3 イチゴ. 農文協. 東京.
- 高野 浩・常松定信. 1991. 四季成り性イチゴの作型に関する研究 (第 2 報) 一年生苗の花芽分化に及ぼす窒素レベルの影響. 園学雑. 60 (別 1) : 378-379.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays and tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15 : 437-497.
- Perkins, V. P. M. and D. J. Huber. 1992. Development and evaluation of an *in vitro* system to study strawberry fruit development. J. Exp. Bot. 43 : 495-501.
- Ring, F. and J. P. Nitsch. 1968. Conditions leading to flower formation on excised *Begonia* fragments cultured *in vitro*. Plant Cell Physiol. 9 : 639-652.
- 桜井雍三. 1986. イチゴの無仮植育苗. p. 47-59. イチゴ品種と新技術. 誠文堂新光社. 東京.
- 谷本静史. 1989. *In vitro* 培養での花芽分化. 植物細胞工学. 1 : 125-131.